

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE: 2020

THESE 2020 / TOU3 / N°2043

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par

CHLOE TIRAND

Étude du rôle de S100A4 dans l'échappement à la
sénescence chimio-induite

25/09/2020

Directeur de thèse : Mr Daniel Pouliquen

JURY

Président : Verhaeghe Pierre

1er assesseur : Boutet-Robinet Elisa

2ème assesseur : Pouliquen Daniel

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 2 mars 2020

Professeurs Emérites

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
M. GAIRIN J.E.	Pharmacologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SIE P.	Hématologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
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 BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CESTAC P. (*)	Pharmacie Clinique
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C.	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS 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 MONFERRAN S.	Biochimie
M. OLICHON A.	Biochimie
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELENDT M.	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

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

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme LARGEAUD L.	Immunologie
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S	Biophysique

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique
--------------	--------------------

A Mamie Denise

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier Monsieur Daniel Pouliquen, pour avoir supervisé et encadré mon stage de master 2 ainsi que ma thèse de pharmacie. Je vous remercie de m'avoir permis de participer à ce projet et d'avoir permis qu'il se réalise malgré cette épidémie qui nous aura empêché de faire tout ce que l'on souhaitait. J'ai beaucoup appris au cours de cette dernière année, tant sur le plan professionnel que personnel. Merci pour votre compréhension, pour l'autonomie que vous m'avez donnée, et surtout pour votre grande gentillesse.

Je tiens également à adresser ma gratitude au Pr. Olivier Coqueret pour m'avoir accueillie au sein de l'unité INSERM U1232. Merci de m'avoir permis de réaliser ma thèse de pharmacie lors de mon année de master 2 dans votre laboratoire.

Aux Pr. Elisa Boutet-Robinet et Pierre Verhaeghe, je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail en tant qu'examineurs, ainsi que pour votre présence à ma soutenance de thèse.

Un grand merci aux thésards du laboratoire, Amandine, Amine, Coralie et Jordan. Merci pour votre disponibilité, votre présence et vos conseils éclairés. Coralie et Amine, mes colocataires de bureaux, un grand merci pour vos blagues, vos chansons, votre soutien. Et surtout merci de m'avoir présenté vos amis lors de mon arrivée sur Angers, vous m'avez permis de m'acclimater plus facilement dans cette ville qui est restée pluvieuse pendant de longs mois, et qui grâce à vous commence à s'illuminer.

Et enfin un grand merci à tous les membres de l'équipe de l'ICO, Alice, Cécile, Eric, Catherine, Bertrand pour votre accueil. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous et surtout de partager de bons moments et autres délices aussi bien sucrés que salés !!

Parce que tout a commencé lors de mon stage de M1, j'ai une grosse pensée pour Magdalena Pohorecka et Claire Médale-Giamarchi, qui ont été mes premières formatrices à la paillasse, et m'ont donné le goût de la recherche. La bonne humeur de votre équipe reste un souvenir inoubliable !

Aux Pharmas. C'est fini ces jolies années d'études sous le soleil Toulousain, qui auront eu le mérite de nous réunir. Bien qu'on ne les ai pas forcément choisies ou aimées au début, on a finalement toutes trouvé notre place... aux quatre coins de la France ! Ça laisse présager de jolis week-ends en perspective, qui je l'espère, seront aussi inoubliables que ceux qu'on a pu passer jusque-là. Merci Manon, ma binôme, qui m'a vu évoluer depuis le premier jour, nous formions une équipe de choc digne des plus grands duos ! Morgane, ton surnom ne te fait pas honneur mais il est finalement bien adapté puisque je n'imagine pas qu'on s'éloigne un jour. Juliette, notre amitié a commencé avant la pharma, depuis ce premier jour de fac où tu m'as demandé s'il y a quelqu'un à côté de moi... je te remercierai jamais assez d'avoir fait ce premier pas ! Merci pour ta patience, pour avoir toujours été là, pour nos discussions à toute heure, nos kébabs post-yoga, pour toutes ces choses qu'on a partagées (même sans le vouloir) et pour être allées à l'autre bout du monde ensemble. Merci également pour tes incroyables compétences d'Air Piano qui ont largement égayé nos Road-trips. Ton dévouement et ta générosité sont sans limites, tout le monde devrait prendre exemple sur toi. Cám ơn.

A ma sœur. Tu t'es battue pour tes rêves avec plus de courage et d'acharnement que beaucoup d'entre nous, et tu as réussi en beauté ! Tu as su bâtir une belle famille et une aide précieuse pour donner la parole à ceux qui ne l'ont plus. Tu es un exemple pour beaucoup de personnes et j'espère que tu entraineras de nombreux orthophonistes sur ta belle voix. Je remercie intérieurement le confinement pour nous avoir réunies plus qu'on aurait pu l'imaginer. Juliette et Léo, merci d'avoir partagé votre salle de classe improvisée pour l'écriture de ma thèse ! Merci Julien pour être le meilleur beau-frère que je puisse imaginer.

A mon frère, ingénieur dans les étoiles et directeur du musée des dinosaures. Venir faire mes études sur Toulouse nous a énormément rapprochés, et j'en suis très heureuse. 20 ans d'écart ce n'est pas rien, et tu as toujours su me considérer comme ton amie, ta sœur, parfois ta confidente. Je me suis toujours sentie acceptée, partout où je te suivais, parce que pour toi c'était normal, je devais être là, j'étais là. Tu n'as jamais fait de différence. Merci big brother.

A mes parents, merci de ne pas m'avoir bridée et de m'avoir offert la liberté que je souhaitais en me poussant et en me soutenant dans mes choix de partir, d'abord dans une autre ville, puis dans un autre pays. Merci pour cette si belle éducation, vous m'avez appris plein de

choses, vous m'avez donné le gout du voyage, du partage et de la découverte, mais aussi l'amour de nos terres et de notre patrimoine. Même si je n'ai pas atteint tous mes objectifs, merci pour votre soutien et votre présence sans faille même à des milliers de kilomètres. Trouvez dans ces quelques mots toute ma gratitude et ma reconnaissance pour tout ce que vous m'avez apporté, me permettant de parcourir mon petit bonhomme de chemin qui jusque-là s'est avéré être d'une grande beauté. A mon tour de vous soutenir : partir vers une autre terre et un autre peuple demande beaucoup de courage, et vous avez toute mon admiration pour ce choix parfois difficile encore.

A ma famille, Tatie Claude et Tonton Michel, pour être toujours là quand mes parents ne le sont pas, Tatie Arlette et Papy.

To my foster families. Ewa and John in Toronto, an unforgettable encounter, dziękuję. Jane, Murray, with whom I spent six incredible months in New Zealand, and where I felt like part of your family, it was wonderful, I learned so much from you and your culture. Tēnā koutou. I hope I will have the opportunity, on a future trip, to see you all again one day, as I think of you often.

ABREVIATIONS

ADA : Agents de Dégradation de l'ADN
ADN : Acide Désoxyribo Nucléique
AKT : Protéine Kinase B
ATM : ataxia telangiectasia mutated
Bcl : B Cell Lymphoma
BRAF : B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
BSA : Bovine Serum Albumin
CD-8 : Cluster de Différenciation 8
CMP : Cellules Mésothéliales Péritonéales
CSC : Cellule Souche Cancéreuse
CTC : Cellule Tumorale Circulante
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DNA-SCARS : DNA Segments with Chromatin Alterations Reinforcing Senescence
E2F :
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
FAC : Fibroblastes Associés au Cancer
H2AX : H2A histone family member X
HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
IL-1 : InterLeukine 1
KLF4 : Krüppel-like factor 4
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MEC : Matrice Extra Cellulaire
mTor : Mammalian Target Of Rapamycine
NF- κ B : Nuclear Factor-Kappa B
OMS : Organisation Mondiale De La Santé
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PI3K: phosphatidyl inositol 3-OH-kinase
pRb : Protéine du Rétinoblastome
PSAS : Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence
RAF :
RAS :
RCPG : Récepteur Couplé à la Protéine G
RDA : Réponse Aux Dommages à l'ADN
SA- β -gal : Senescence Associated Béta-Galactosidase
SAHF : Senescence-Associated Heterochromatin Foci
SDS : Sodium DodécylSulfate
SIC : Sénescence Induite par la Chimiothérapie
SVF : Sérum de Veau Fœtal
TBS : Tris Buffer Saline
TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF : Transforming growth factor
TSP1 : thrombospondine 1
VEGF : Vascular endothelial growth factor
Wnt : Wingless-related integration site
ZEB : Zinc finger E-box-binding homeobox

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	4
ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION	10
I. Généralités sur le cancer	10
A. Spécificités	10
1. Autosuffisance vis-à-vis des facteurs de croissance et insensibilité aux signaux antiprolifératifs.....	10
2. Instabilité génomique & mutations	11
3. Résistance à la mort cellulaire – immortalité	12
4. Rôle du système immunitaire.....	12
5. Hétérogénéité, CSCs & Microenvironnement tumoral	13
B. Progression du cancer : processus métastatique	15
1. Transition épithélio-mésenchymateuse – résistance à l’anoïkis	15
2. Formation de niches pré-métastatiques	16
3. Extravasation des CTCs & colonisation	17
C. Les chimiothérapies	18
1. Agents chimio thérapeutiques induisant des dommages à l’ADN.....	18
2. Réponse aux dommages à l’ADN.....	19
3. Mécanisme de mort cellulaire.....	20
D. Chimiorésistance	22
II. Sénescence	23
A. Découverte du concept de sénescence cellulaire	23
1. Hayflick	23
2. Caractéristiques générales de la sénescence	24
B. Rôles physiologiques de la sénescence	28
1. Embryogénèse.....	28
2. Cicatrisation	28
3. Vieillesse	29
C. Sénescence et cancer	30
1. Mécanisme de suppression tumorale.....	30
2. Facteur pro-tumoral	30
3. Échappement à la sénescence induite par la chimiothérapie	32
D. Rôle bénéfique ou néfaste ?	35
III. S100A4	37
A. La famille S100	37
B. Généralités sur S100A4	38
1. Localisation subcellulaire et distribution	39
2. Régulation transcriptionnelle.....	41
C. Rôle dans les pathologies non tumorales.....	41
1. Système immunitaire.....	41
2. Fibrose	42
D. Rôle dans les cancers	42
1. Pro-métastatique et pro-invasif	42
2. Balance apoptose-sénescence	43
3. Acquisition du caractère souche	44

4. Facteur pronostic.....	44
<i>HYPOTHESE ET OBJECTIFS :</i>	45
<i>MATERIEL ET METHODES</i>	46
A. Culture cellulaire	46
B. Invalidation de gènes par SiRNA :.....	46
C. Traitement des cellules	46
D. Test de Beta-galactosidase.....	47
E. Extraits cellulaires et Western Blotting	47
F. Marquage gamma H2AX et cytométrie de flux	49
<i>RESULTATS</i>	50
A. Implications de S100A4 dans l’invasivité tumorale in vivo	50
B. S100A4 est impliqué dans l’émergence des cellules sénescents in vitro.....	51
C. S100A4 n’exerce pas son rôle via le suppresseur de tumeur p53.....	53
D. S100A4 permet-il l’émergence via les facteurs souches SLUG et Nanog ?.....	54
E. Nouveau modèle.....	55
<i>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</i>	58
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	62

INTRODUCTION

I. Généralités sur le cancer

D'après l'OMS, le cancer est la deuxième cause de décès dans le monde, à l'origine de 8,8 millions de morts en 2015. Ainsi, près d'un décès sur 6 dans le monde est dû au cancer, et cette incidence augmente chaque année en raison du vieillissement de la population. Cependant ce n'est pas uniquement une maladie du sujet âgé, puisque le cancer est désormais la première cause de mortalité avant 65 ans. En effet, l'indice élevé de masse corporelle, la mauvaise alimentation, le manque d'exercice physique, le tabagisme et la consommation d'alcool sont les principaux facteurs de risques de cette maladie. Malgré une prise en charge de plus en plus précoce grâce à de nombreux progrès médicaux en termes de dépistage et de traitements, de nombreux types de cancer demeurent difficiles à traiter en raison de la génération de métastases plus agressives via la dissémination de cellules cancéreuses, et de la résistance et l'adaptation des cellules tumorales aux traitements. L'évolution épidémiologique et l'agressivité de cette maladie en font une des principales préoccupations en termes de santé publique dans les pays développés.

A. Spécificités

La transformation néoplasique est induite par l'accumulation de nombreuses altérations génétiques, conférant alors des avantages sélectifs de croissance et de survie [1]. C'est donc un tissu complexe qui se développe en acquérant des capacités biologiques permettant le maintien d'une signalisation proliférative, la résistance aux mécanismes de mort, l'organisation du microenvironnement en sa faveur ainsi que l'activation de l'invasion. De nombreux progrès ont permis de mettre en lumière de nouvelles caractéristiques, et permettent dorénavant de qualifier cette maladie comme un "organe" à part entière [2].

1. Autosuffisance vis-à-vis des facteurs de croissance et insensibilité aux signaux antiprolifératifs

Contrairement des tissus normaux, les cellules cancéreuses sont capables de générer et libérer leurs propres signaux de croissance (par exemple le TGF- α) de façon non contrôlée,

réduisant ainsi leur dépendance à la stimulation du microenvironnement tissulaire normal [3]. Ces facteurs de croissance, en se liant à leurs récepteurs extracellulaires vont activer des voies de signalisation intracellulaires dont le rôle est la régulation du cycle et de la croissance cellulaire [4]. Ces voies vont donc être constitutivement activées et permettre notamment de potentialiser d'autres voies cellulaires telles que la survie ou le métabolisme énergétique. De même, on retrouve dans de nombreux cancers une surexpression des récepteurs (EGFR, HER2...) à ces facteurs de croissance, ou bien des modifications structurelles des membres des cascades de signalisation, permettant également cette activation constitutive de la prolifération, même sans stimulation continue par leurs régulateurs normaux en amont.

Dans un tissu normal, les signaux antiprolifératifs agissent pour maintenir la quiescence cellulaire et l'homéostasie tissulaire via des inhibiteurs de croissance solubles ou membranaires. Ces signaux inhibiteurs de croissance peuvent bloquer la prolifération cellulaire soit via le passage à l'état de repos (G0), d'où elles peuvent proliférer à nouveau lorsque les signaux extracellulaires le permettent ; soit à l'état post mitotique, associé à la différenciation terminale des cellules. Ces différents états sont régis par l'horloge du cycle cellulaire. La protéine du rétinoblastome (pRb) est impliquée dans la signalisation de ces signaux antiprolifératifs : à l'état hypo phosphorylé, pRb bloque la prolifération en séquestrant les facteurs de transcription E2F qui contrôlent l'expression des gènes essentiels à la progression de la phase G1 à la phase S [5].

Afin de proliférer librement, les cellules cancéreuses naissantes doivent échapper à ces signaux antiprolifératifs. En effet dans les cancers, la voie pRb est perturbée, libère les E2F et permet ainsi la prolifération cellulaire, rendant les cellules insensibles aux facteurs antiprolifératifs qui bloquent normalement la progression dans la phase G1 du cycle cellulaire [2], [6].

2. Instabilité génomique & mutations

Bien que les mutations soient à l'origine de l'évolution, ces dernières confèrent le plus souvent des conséquences délétères sur l'organisme. Les cancers sont dus à l'accumulation de mutations dans des gènes critiques ou nécessaires aux programmes normaux de prolifération, différenciation ou mort cellulaires. Elles peuvent être spontanées ou bien

acquises suite à l'interaction d'agents mutagènes avec l'ADN. Par exemple, dans environ 15% des cancers humains, on retrouve une mutation sur le gène de la protéine RAS, membre de la voie RAS RAF MEK ERK MAPK qui sert de médiateur entre les réponses cellulaires et les signaux de croissance. De même, les mutations somatiques de faux-sens BRAF sont retrouvées dans 66 % des mélanomes malins [7]. Également, la voie PI3K/Akt/mTOR est une voie de signalisation fréquemment mutée dans les cancers humains, notamment au niveau des sous-unités catalytiques des PI3-kinases [8].

3. Résistance à la mort cellulaire – immortalité

La mort cellulaire programmée par apoptose sert de barrière naturelle au développement du cancer. La signalisation oncogénique, hautement stressante pour la cellule, et les dommages à l'ADN induits par l'hyper prolifération aberrante sont inducteurs de l'apoptose. Cependant, il s'avère que cette dernière est atténuée, voir évitée dans les cancers agressifs ou lors de la résistance aux traitements [9]. Les cellules cancéreuses échappent à l'apoptose via l'induction de voies de survie, telles que la perte de fonction du suppresseur de tumeur p53, l'augmentation de l'expression de molécules anti apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL) ou la diminution des facteurs préapoptotiques (Bax, Bim, Puma) [10]. Les cellules cancéreuses peuvent ainsi déjouer la mort, mais elles ont également la capacité de devenir immortelles et se diviser à l'infini en contournant les mécanismes de l'horloge biologique des cellules, par la réactivation des télomérases.

4. Rôle du système immunitaire

Le système immunitaire joue un rôle important, à la fois pro- et anti-tumoral dans la biologie du cancer. Bien qu'aux premiers stades du développement tumoral les cellules cancéreuses les plus immunogènes soient éliminées par les cellules immunitaires cytotoxiques (Natural killers et cellules T CD8+), il s'en suit ensuite un phénomène d'immuno-édition qui va permettre de sélectionner une population cancéreuse invisible à la détection et à la destruction immunitaire [11], [12]. Il s'avère en fait que l'infiltration de tissus néoplasiques par des cellules du système immunitaire sert souvent à favoriser la progression des tumeurs, également grâce à leur activité pro-inflammatoire [13]. En effet, l'inflammation associée au

cancer contribue à l'instabilité génomique et épigénétique, à la stimulation de l'angiogenèse [14] et, finalement, à la dissémination du cancer [11].

Ces connaissances permettent de développer de nouveaux traitements basés sur l'immunothérapie, soit en inhibant ce système délétère soit en réactivant certaines de ces voies alors contournées ou devenues inefficaces dans le contexte du cancer. Certaines thérapies sont basées sur des inhibiteurs de points de contrôle, ou sur des antigènes chimériques greffés sur des cellules T périphériques afin de cibler de manière sélective les antigènes de surface des tumeurs [15].

5. Hétérogénéité, CSCs & Microenvironnement tumoral

Les tumeurs ne peuvent donc pas être réduites aux seules cellules cancéreuses : il s'agit plutôt d'écosystèmes complexes composés de différents types cellulaires (cellules de soutien mésenchymateuses, cellules endothéliales et cellules immunitaires inflammatoires infiltrées) ainsi que d'un microenvironnement de soutien avec lequel elles communiquent, permettant une croissance et une progression de la tumeur efficaces. Parmi ces différentes cellules, on retrouve également les cellules souches cancéreuses (CSC). Le concept de CSC est apparu pour la première fois dans les années 1960, et c'est dans les leucémies que les premières évidences de l'existence d'une telle population ont été apportées [16]. Ce concept suppose la présence de sous-populations minimales de CSC possédant la capacité unique de générer de nouvelles tumeurs lors de l'inoculation dans des souris hôtes réceptrices [17], et repose donc sur l'idée d'une hétérogénéité intra-tumorale [18]. Ces cellules sont caractérisées par une grande capacité d'auto-renouvellement et l'expression de marqueurs qui sont également retrouvés dans les cellules souches normales du tissu, notamment la voie de signalisation Wnt ainsi que *nanog* et *KLF4* [19]. Bien que les origines des CSC au sein des tumeurs n'aient pas été clarifiées, plusieurs études montrent que l'apparition de ces cellules est notamment liée au programme de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM - abordée dans le chapitre suivant) [20]. Ce lien montre également une possible corrélation entre le microenvironnement inflammatoire, dont les signaux peuvent déclencher la TEM, et la création des CSCs. De même, certaines tumeurs acquièrent la capacité de recréer un microenvironnement tumoral adéquat en induisant une transformation de leurs CSCs en cellules stromales, en fibroblastes associés au

cancer (FAC) ou bien en cellules endothéliales selon les besoins, afin de favoriser la néo vascularisation [2].

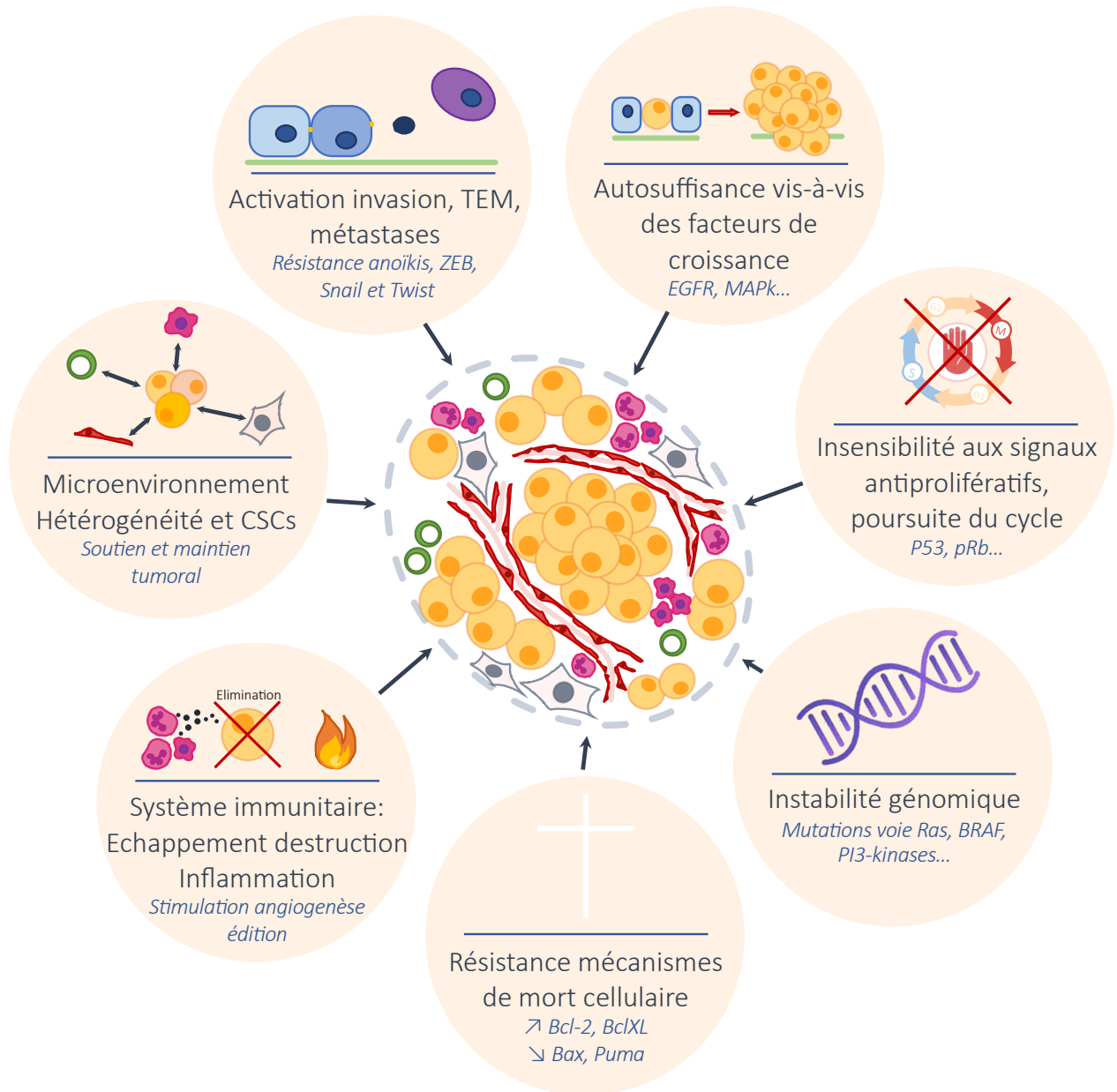


Figure 1 : Résumé des caractéristiques du cancer. Les cancers résultent d'une succession d'altérations génétiques permettant la survie face aux mécanismes de morts cellulaires (apoptose, sénescence), la poursuite de la prolifération grâce à une insensibilité aux facteurs antiprolifératifs et une réponse accrue aux facteurs pro-tumoraux, le tout dans un microenvironnement de soutien favorisant la survie de la tumeur. Ces caractéristiques vont notamment permettre d'échapper au système immunitaire et de favoriser la dissémination métastatique. D'après Hanahan et al. 2011.

La diversité des cellules, tant phénotypique que génétique au sein d'une tumeur, est considérée comme un facteur majeur du développement de la résistance à la thérapie [21].

De plus, les traitements conventionnels éliminent généralement la majeure partie de la population non-CSC tout en épargnant les sous-populations mineures de CSC, laissant ainsi la possibilité d'une rechute de la maladie ou le possible développement de métastases [22].

L'élucidation de toutes les voies mises en jeu dans les caractéristiques générales du cancer permettent de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'améliorer la prise en charge du patient, amenant la médecine personnalisée au premier plan.

B. Progression du cancer : processus métastatique

L'évolution tumorale va se poursuivre par le développement de métastases à distance de la tumeur primaire. Ce processus métastatique se met en place grâce à une cascade d'évènements à la fois anatomiques et cellulaires qui permettent aux cellules de la tumeur primaire de coloniser par voie sanguine ou lymphatique de nouveaux organes. Pour cela, elles échappent à leurs contraintes structurelles en engageant des transformations phénotypiques (cf TEM...) afin de se détacher de leur tissu, migrent vers la circulation, sortent des vaisseaux et colonisent un nouvel organe où elles forment alors une tumeur secondaire. Chacune de ces étapes nécessite l'acquisition de caractéristiques particulières détaillées ci-dessous [23].

1. Transition épithélio-mésenchymateuse – résistance à l'anoïkis

La transition épithélio-mésenchymateuse est une modification importante du phénotype cellulaire qui permet aux cellules épithéliales d'échapper aux contraintes structurelles imposées par l'architecture des tissus, reconnu pour la première fois par Elizabeth Hay [24] comme un processus central dans la morphogénèse embryonnaire précoce. Les cellules qui deviennent métastatiques doivent modifier leur phénotype pour faciliter le mouvement et l'invasion locale, un processus alors similaire à la TEM observée lors du développement embryonnaire. Partant de ce constat, une hypothèse a été émise selon laquelle les cellules cancéreuses subissent une TEM pour faciliter la formation de métastases [25][26].

Bien que de nombreux facteurs de transcription puissent déclencher la TEM, cette reprogrammation est majoritairement orchestrée par trois grands groupes de facteurs de transcription : ZEB, Snail et Twist. L'expression régulée de ces facteurs de transcription réprime notamment l'expression de l'E-cadhérine (protéine d'adhésion participant au maintien de l'intégrité tissulaire [27]), déclenchant une déstabilisation des jonctions adhérentes et du cytosquelette d'actine, permettant ainsi la transformation morphologique des cellules. Le facteur de transcription SLUG, codé par le gène SNAI2, a été initialement caractérisé comme le principal facteur de transcription de la transition épithélio-mésenchymateuse. Il orchestre également les processus biologiques essentiels au développement des cellules souches et/ou progénitrices et à la tumorigénèse ainsi que la réparation des lésions de l'ADN. Le rôle principal du SLUG dans le contrôle de ces processus consiste à faciliter la régulation épigénétique des programmes de transcription et sa dérégulation se manifeste par des défauts de développement et la perturbation de l'homéostasie des tissus. La voie Wnt est également activée, menant à d'importants changements morphologiques et phénotypiques (perte de polarisation basolatérale, induction de l'expression de vimentine, etc.), favorisant ainsi l'acquisition de capacités de migration [28]. ZEB1 permet quant à lui l'inhibition de l'anoïkis. Cette mort cellulaire par apoptose caspase-dépendante est physiologiquement déclenchée lors de la perte d'adhésion avec la matrice extracellulaire [29]. L'acquisition de cette résistance va permettre la survie dans un environnement sans support comme la circulation sanguine ou lymphatique par exemple.

Ces mécanismes, conjoints à la dégradation de la matrice extracellulaire par les cellules ayant subi une TEM, vont permettre l'invasion locale des cellules cancéreuses et l'entrée des cellules dans la lumière d'un vaisseau sanguin, ou intravasation. Ainsi, la transition épithélio-mésenchymateuse est fortement associée à la résistance aux traitements et à la récurrence des tumeurs.

2. Formation de niches pré-métastatiques

Les tumeurs primaires créent des « régions » favorables à distance, les niches pré-métastatiques, dans les organes secondaires pour faciliter la future colonisation des cellules tumorales [30]. La niche pré-métastatique peut être définie comme un microenvironnement

de tissu de soutien subissant une série de changements moléculaires et cellulaires, afin de devenir plus réceptif à la colonisation tumorale [31]. Bien que l'arrêt des cellules tumorales circulantes (CTCs) puisse se faire de manière passive dans les capillaires de petit calibre, il peut au contraire être actif au niveau de ces niches : des mécanismes de reconnaissance spécifiques permettent l'arrêt sur l'endothélium via des protéines d'adhésion membranaires exprimées à la fois par les cellules tumorales et endothéliales. Ce concept explique également l'existence de sites métastatiques préférentiels pour chaque type de cancer. Ce microenvironnement compatible est nécessaire à la survie des cellules à distance.

3. Extravasation des CTCs & colonisation

Une fois les cellules capables de survivre dans la circulation, l'étape suivante à la formation de métastase est l'entrée de ces CTCs dans les organes secondaires et la colonisation des niches métastatiques préalablement formées. Une fois dans leur niche, les cellules cancéreuses peuvent immédiatement constituer une tumeur secondaire, ou bien demeurer quiescentes pendant des mois, voire des années : on parle de dormance métastatique [32]. Cet état explique notamment l'apparition de métastases des années après l'exérèse d'une tumeur primitive chez les patients. Cependant, les mécanismes de sortie de cet état de dormance sont encore méconnus, bien que des hypothèses (interaction avec le système immunitaire ? ou bien perte de l'inhibition du nouveau microenvironnement tumoral ?) soient actuellement à l'étude [33].

Finalement, la formation de métastases est connue pour être un mécanisme peu efficace, puisqu'à terme, seule environ une cellule sur 10^5 se développe en une métastase macroscopique : les différents effecteurs à exprimer ainsi que les environnements hostiles par lesquels elles passent appliquent de fortes pressions de sélection. Pour se développer en métastase, la CTC doit donc posséder des propriétés de combativité et de survie partagées avec les cellules souches : la possibilité de reprojeter après une longue période de quiescence, de subir des changements morphologiques importants ainsi que de s'adapter à des microenvironnements différents. Ces caractéristiques expliquent par ailleurs la résistance accrue des métastases aux traitements [34].

C. Les chimiothérapies

Selon la nature, la sévérité du cancer ainsi que l'état du patient, la stratégie thérapeutique peut faire appel à une ou plusieurs techniques : chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, hormonothérapie, immunothérapie, ou thérapies ciblées. Au début des années 1900, Paul Ehrlich a inventé le terme "chimiothérapie", défini comme l'utilisation de produits chimiques pour traiter les maladies. Bien que ces recherches soient tournées vers l'infectiologie, il est notamment à l'origine des premiers agents alkylants de l'ADN pour le traitement des cancers. De nombreux autres traitements ont vu le jour depuis [35].

Parmi les chimiothérapies, on va retrouver principalement des agents agissant sur l'ADN et la division cellulaire. En amont de l'ADN, il existe les antimétaboliques qui agissent sur la biosynthèse des constituants de l'ADN. Au niveau des agents impliquant directement l'ADN, on va retrouver les agents alkylants, intercalants, scindants et les inhibiteurs de topoisomérase 1 et 2. Pour finir, en aval de l'ADN, on retrouve les poisons du fuseau ou antimitotiques qui inhibent la polymérisation et la dépolymérisation des microtubules et agissent donc sur la division cellulaire [36].

1. Agents chimio thérapeutiques induisant des dommages à l'ADN

L'utilisation d'agents de dégradation de l'ADN (ADA) a commencé de manière empirique au début du 20ème siècle [35] et jusqu'à présent, les radiations et les médicaments endommageant l'ADN sont restés les principaux traitements du cancer. Ces agents vont induire entre autres des cassures double brins. Les dommages à l'ADN de ce type sont des lésions létales pour les cellules, il est donc primordial que les cellules saines aient la capacité de détecter et réparer ces dommages.

Par ailleurs, les cellules cancéreuses expriment des défauts dans ces mécanismes de réparation de l'ADN, ce qui explique leur sensibilité préférentielle aux ADA par rapport aux cellules saines.

2. Réponse aux dommages à l'ADN

Pour se prémunir contre les conséquences catastrophiques des agressions du génome, les cellules eucaryotes ont développé des voies de signalisation complexes qui détectent les lésions de l'ADN, constituant la réponse aux dommages à l'ADN (RDA). Ces voies vont activer des points de contrôle du cycle cellulaire, notamment p53 [37]. Son activation entraîne un arrêt de la croissance cellulaire et permet à la cellule de se diriger vers des réponses telles que la sénescence et l'apoptose (mort cellulaire programmée), ou lorsque cela est possible, la réparation de l'ADN [38].

Par exemple, lorsqu'une cellule normale détecte une cassure double brin à l'ADN, plusieurs protéines dites senseurs, telles que le Complexe MRE11-RAD50-NBS1 (MRN), reconnaissent le dommage et se fixent au site de cassure [39]. L'ATM kinase est alors rapidement recrutée et activée. Ce recrutement déclenche la phosphorylation d'un grand nombre de substrats et attire des facteurs de réparation sur le site des dégâts. L'un des substrats de l'ATM kinase est l'histone H2AX (qui une fois phosphorylée est appelé γ H2AX [40]) : elle permet le recrutement de molécules ATM supplémentaires et ainsi le maintien et la propagation de la RDA. γ H2AX peut être détecté au niveau des cassures doubles brins par immunofluorescence [41] afin de déterminer les niveaux de dommages à l'ADN dans une population cellulaire.

La réparation des cassures de double brin d'ADN peut ensuite être réalisée par recombinaison non-homologue des extrémités (fermeture directe des deux extrémités brisées indépendamment de l'homologie de séquence, pouvant occasionnellement conduire à une perte d'information génétique) ou par recombinaison homologue (réparation précise du lieu endommagé grâce à un modèle, la chromatide sœur par exemple) [42]. Si les dommages ne peuvent être réparés, ou bien s'ils sont trop nombreux, la cellule optera alors pour un arrêt définitif du cycle cellulaire via l'entrée en apoptose ou bien en sénescence afin de préserver l'intégrité du génome.

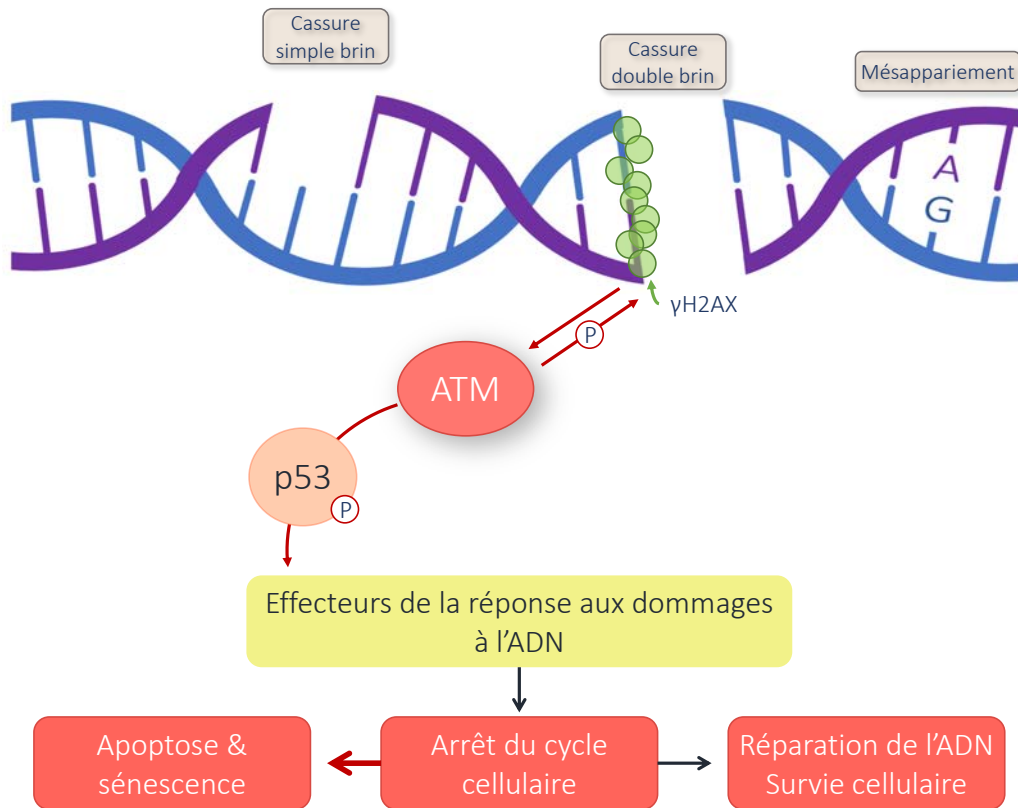


Figure 2 : Mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN. Les cassures simple- ou double-brin de l'ADN vont être détectées par des senseurs qui recrutent l'ATM kinase, phosphorylant les histones H2AX. L'ATM kinase va également activer p53, ce qui permet de recruter les effecteurs de la RDA et induire un arrêt du cycle cellulaire. Si les lésions peuvent être réparées, la cellule survit. Si ce n'est pas le cas, la cellule va entrer en mort cellulaire (apoptose ou sénescence). Les traitements chimiothérapeutiques induisant des dommages à l'ADN vont privilégier cette réponse de mort cellulaire, puisque les mécanismes de réparation sont altérés dans les cellules cancéreuses.

3. Mécanisme de mort cellulaire

Les dommages à l'ADN n'activent pas immédiatement la mort cellulaire car ces derniers sont générés en permanence de manière physiologique, la cellule favorisant alors la réparation lorsque cela est possible. En fait, lors de l'exposition à des ADA par exemple, la mort cellulaire induite par les dommages à l'ADN est une réponse retardée, observée seulement après quelques heures et parfois quelques jours d'exposition [16].

a) Apoptose

L'apoptose est un programme de mort cellulaire programmée hautement conservé au cours de l'évolution, impliqué dans de nombreux processus physiologiques, tels que le développement embryonnaire normal ou l'élimination de cellules défectueuses chez l'adulte

[43]. Lorsqu'elle est activée, elle provoque la condensation et la fragmentation de l'ADN et des compartiments cellulaires en corps apoptotiques, alors éliminés par les phagocytes.

Dans la RDA, l'activation de l'apoptose est p53-dépendante. La stabilisation de p53 va promouvoir la transcription de protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 telles que Bax, Noxa et PUMA, qui entraînent la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et la libération de facteurs apoptogènes mitochondriaux, notamment le cytochrome C. Le cytochrome C libéré permet la formation d'un complexe de poids moléculaire élevé, l'apoptosome, qui est constitué notamment de la caspase 9. Cette dernière active ensuite les caspases effectrices, telles que les caspases 3 et 7, clivant à leur tour des dizaines de protéines afin de provoquer les caractéristiques distinctes de la mort apoptotique [44], [45].

b) Sénescence

La sénescence est une forme irréversible d'arrêt de la prolifération, et représente, avec l'apoptose, une des réponses cellulaires mise en place suite aux dommages à l'ADN induits par les thérapies anticancéreuses. La sénescence sera décrite en détail dans le chapitre suivant.

Ainsi, en réponse aux traitements génotoxiques, ces deux mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire peuvent être induits. Cependant, l'expression de p53 provoquée par la RDA est aussi bien nécessaire à l'apoptose qu'à la sénescence. Or les cellules en apoptose ont une plus forte expression de p53 que celles en sénescence. Cela suggère que le niveau de p53, et donc la nature de la lésion de l'ADN ainsi que sa gravité, peut déterminer et moduler le choix apoptose-sénescence [46].

Bien que de déterminer la finalité du choix entre l'apoptose et la sénescence est nécessaire, nous pouvons nous demander pourquoi ces mécanismes ont évolué, pourquoi les cellules choisissent entre eux et, en fin de compte, comment nous pouvons utiliser ce choix pour trouver de nouveaux traitements aux réponses plus adaptées dans le contexte de la chimiothérapie.

D. Chimiorésistance

L'efficacité des chimiothérapies est cependant contrée par les phénomènes de résistance. Des décennies de résultats cliniques indiquent que les ADA ont permis de guérir de nombreux cancers [47], mais que leur toxicité cellulaire est souvent temporaire à cause de l'émergence de cellules cancéreuses résistantes aux ADA. En effet, après la destruction des cellules cancéreuses par ces agents, certaines cellules malignes survivent, s'adaptent et reprennent leur prolifération, contournant ainsi l'effet toxique de la chimiothérapie [16] : on parle de résistance acquise. D'autres activent de nouvelles voies afin de contrer les mécanismes de morts cellulaires mis en jeu. Et finalement, l'arrêt du cycle cellulaire induit par la RDA permettrait une survie à l'état de dormance. Après l'arrêt du traitement, certaines cellules sortent de cette dormance et contribuent à la rechute de la maladie [48].

Ces mécanismes de résistance aux chimiothérapies sont une des principales préoccupations lors de la prise en charge des patients, puisque les tumeurs malignes ayant rechuté sont souvent plus agressives et difficiles à traiter.

II. Sénescence

La sénescence a été décrite pour la 1ère fois en 1961 par Hayflick et Moorhead [49] comme un simple arrêt de division cellulaire. C'est aujourd'hui un domaine de recherche en constante évolution et sa définition se retrouve alors enrichie et complexifiée : de nombreuses autres caractéristiques ont été mises en évidence et sont utilisées pour identifier et comprendre la biologie des cellules sénescents. Il s'avère que les cellules sénescents apparaissent tout au long de la vie et jouent tantôt un rôle bénéfique (par exemple dans des processus physiologiques tels que l'embryogenèse, l'immunité de l'hôte ou la cicatrisation des plaies), tantôt un rôle pathologique par leur accumulation avec l'âge, dans l'obésité ou le diabète par exemple [50]. Cette dualité de la sénescence questionne, et bien qu'il y ait de nombreuses avancées scientifiques dans ce domaine, plusieurs aspects restent encore mal définis. De plus, c'est un état difficile à étudier étant donné que les mécanismes sous-jacents peuvent être différents d'un tissu à l'autre et les marqueurs de sénescences utilisés (Beta-galactosidase, foci..) ne sont pas spécifiques de ce processus [51][52].

A. Découverte du concept de sénescence cellulaire

1. Hayflick

Le concept de sénescence cellulaire fut décrit pour la première fois en 1961 par Hayflick et Moorhead. Ces derniers ont observé que les fibroblastes primaires humains en culture cessaient de proliférer après un nombre défini de divisions cellulaires : ils entrent alors dans un état définitif d'arrêt du cycle cellulaire. Cet état ne peut pas être reversé par l'ajout de facteurs de croissance, ce qui le différencie de la quiescence cellulaire [53]. Ils ont également observé que cet arrêt prolifératif était accompagné de changements à la fois morphologiques et physiologiques. Ces observations ont permis de mettre en évidence le concept de sénescence répllicative et de limite de Hayflick, qui se définissent respectivement comme l'arrêt stable de la division cellulaire [54] et le nombre maximal de divisions cellulaires précédant l'entrée en sénescence.

Plus tard, cet état de sénescence répllicative a été décrit comme étant la conséquence de l'érosion télomérique (perte graduelle des extrémités chromosomiques) à une longueur

critique : on parle d'horloge moléculaire. En effet, à chaque division, les ADN polymérase unidirectionnelles ne peuvent pas « primer » l'extrémité des chromosomes et il en résulte une perte de quelques bases. Cette perte peut être compensée par la présence de télomérases, capable de synthétiser de novo ces télomères, uniquement dans certains types cellulaires [55]. Les télomères érodés vont également être responsables de l'apparition et du maintien d'une réponse aux dommages à l'ADN [56]. En fait, il s'avère que la sénescence peut également se produire sans érosion télomérique, par exemple suite à un stress ou l'activation d'oncogènes [57].

De nombreuses études ont ensuite montré que cet état ne concernait pas seulement les fibroblastes, mais que l'on retrouvait ce processus dans différents tissus et types cellulaires de l'organisme, lorsqu'ils sont stimulés de façon appropriée [57].

2. Caractéristiques générales de la sénescence

La caractéristique majeure de la cellule sénescence est son incapacité à progresser dans le cycle cellulaire, cependant cette caractéristique n'est pas suffisante à elle seule pour déterminer qu'une cellule est sénescence. En effet, les cellules différenciées peuvent stopper leur croissance de façon physiologique sans pour autant être sénescence. C'est pourquoi, pour déterminer qu'une cellule est entrée en sénescence, il existe plusieurs caractéristiques et marqueurs qui nous permettent de décrire un « phénotype sénescence » [58].

a) Arrêt du cycle cellulaire (p53, p21, p16)

L'arrêt de la croissance cellulaire constaté lors de la sénescence est lié à l'activation d'important régulateurs du cycle tels que p53, p21, pRb et p16INK4A [58]. Cet arrêt du cycle peut être caractérisé *in vitro* par différentes techniques [59].

Suite aux dommages génomiques ou à l'érosion télomérique, la signalisation RDA va être mise en place et induire l'arrêt du cycle cellulaire via p53. Ce dernier va permettre l'arrêt en augmentant l'expression de l'inhibiteur de la kinase cycline-dépendante p21 ; p21 permet à son tour la phosphorylation et l'activation de pRb qui participe au maintien de l'arrêt cellulaire. De même, les cellules humaines qui perdent la fonction p53 et pRb sont

généralement réfractaires aux stimuli induisant la sénescence. La plupart des cellules sénescents expriment également p16INK4a, un suppresseur de tumeur qui est induit tardivement par le stress de culture ou les dommages chromosomiques de l'ADN. La perte de p16(INK4a) est l'un des événements les plus fréquents dans les tumeurs humaines et permet aux lésions précancéreuses de contourner la sénescence [60].

b) Modifications morphologiques & nucléaires

Les cellules sénescents vont acquérir de nouvelles caractéristiques morphologiques : on va retrouver une augmentation de la taille de la cellule ainsi que de sa granularité [54]. Les avancées des connaissances sur la sénescence ont permis de mettre en évidence de nombreuses autres caractéristiques.

- SA- β -gal :

Le biomarqueur le plus largement utilisé pour caractériser les cellules sénescents est la bêta-galactosidase associée à la sénescence (SA- β -gal). Cette enzyme est présente dans les vésicules lysosomales, alors augmentées lors de la sénescence. Son activité peut être mesurée par coloration enzymatique in situ, uniquement à pH acide (pH 6). La SA- β -gal n'a pas de rôle direct dans la sénescence, son augmentation est plutôt une conséquence de l'arrêt de la division cellulaire et de l'augmentation de la masse lysosomale en résultant [61].

- SAHF :

L'activation des voies p53-p21 et p16-Rb induit une régulation à la baisse de la cycline/cdk et une inhibition de l'E2F. E2F est un facteur de transcription impliqué dans la synthèse de l'ADN et la progression dans le cycle cellulaire. La répression des gènes cibles de E2F repose sur la formation de structure hétéro-chromatidiques qui s'accumulent dans les cellules sénescents, nommées « Foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence » (SAFH). Les SAFH sont donc formés par l'association entre des protéines d'hétérochromatine, Rb et E2F [62]. Ces structures génèrent des agglomérats d'ADN denses et lumineux, visibles en microscopie après marquage au DAPI, et sont donc généralement utilisés comme marqueurs de la sénescence [63].

- DNA-SCARS :

Il représente un autre marqueur de la sénescence couramment utilisé. Les dommages à l'ADN des cellules sénescents vont provoquer une RDA [64]. Cela se visualise dans les cellules sénescents par l'apparition de foci nucléaires persistants, nommés « segments d'ADN avec altérations chromatiniennes renforçant la sénescence » (DNA-SCARS). Ces foci d'ADN sont constitués d'histones modifiées (principalement γ H2AX) et de protéines recrutées pour le remodelage de la chromatine. Les DNA-SCARS vont permettre de renforcer et maintenir la RDA active, entretenant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire p53-dépendant [65].

- Perte des lamines :

Les cellules sénescents sont également caractérisées par une perte de l'intégrité de leur membrane nucléaire. Cette modification est associée à l'augmentation de l'activité autophagique qui est mise en place lors de l'entrée en sénescence. Les lamines B sont de petites protéines tapissant la membrane interne nucléaire, impliquées dans le maintien de la forme des noyaux. Dans la sénescence, l'expression de ces lamines B est régulée négativement et leur dégradation est favorisée via la protéine d'autophagie LC3B. Ceci va induire une augmentation de la perméabilité membranaire nucléaire et l'extrusion de petits fragments de chromatine cytoplasmiques. Dans le cytoplasme, ils sont détectés par la voie de détection de l'ADN cGAS-STING, entraînent l'activation de la voie NF- κ B et la production d'un sécrétome spécifique connu sous le nom de phénotype sécrétoire associé à la sénescence [66][67].

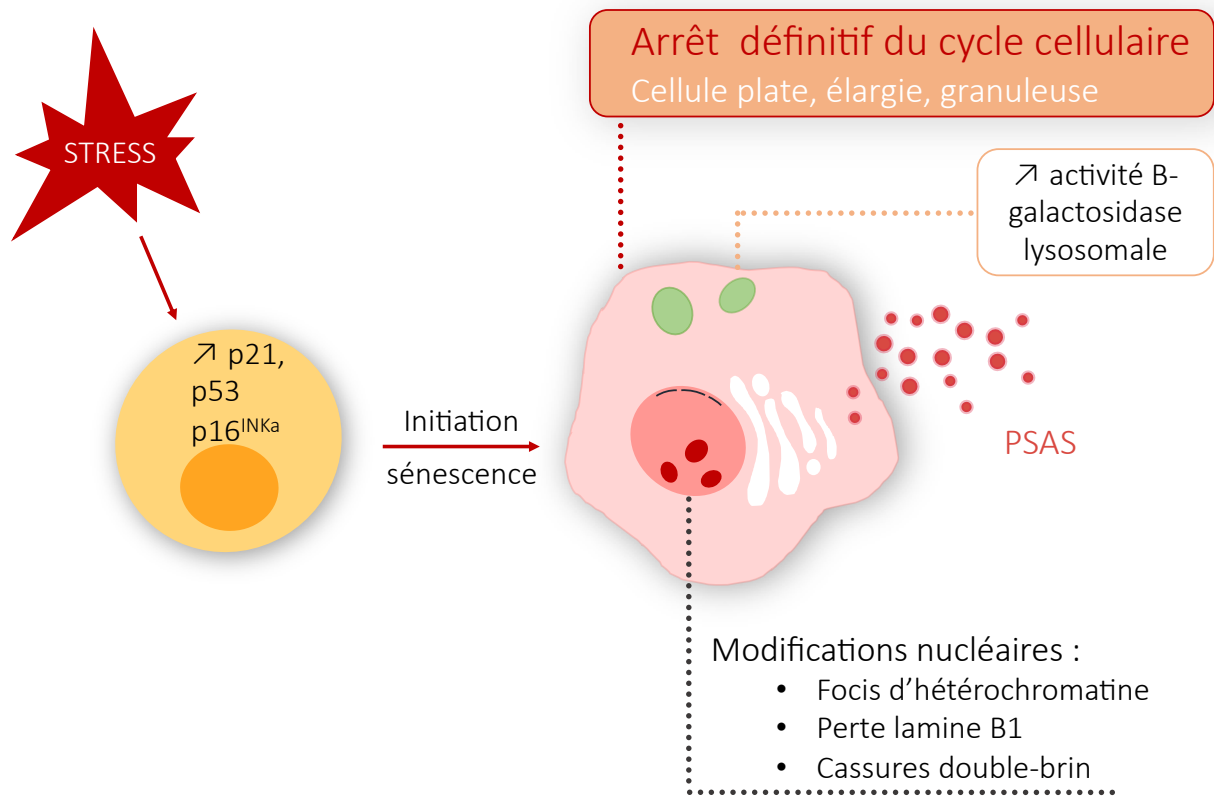


Figure 3: Les caractéristiques des cellules sénescents. Suite à un stress ou un traitement chimio thérapeutique, les cellules peuvent entrer en sénescence, un état d'arrêt du cycle cellulaire caractérisée par des modifications transcriptionnelles, morphologiques, nucléaires, et métaboliques avec notamment la sécrétion d'un certain nombre de protéines associées à la sénescence (PSAS). Adapté de [58].

c) *Sécrétome des cellules sénescents*

Bien que les cellules sénescents ne prolifèrent pas, elles restent métaboliquement actives et développent un sécrétome nommé « phénotype sécrétoire associé à la sénescence » (PSAS), qui présente des activités autocrines et paracrines. La composition du PSAS a été largement déterminée via l'utilisation d'approches protéomiques sur des fibroblastes et des cellules endothéliales par Coppé en 2008 [68] : on retrouve de nombreuses cytokines (telles que les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 entre autres), des protéases et des facteurs de croissance. C'est donc un ensemble de molécules complexe qui diffère selon les stimuli et le tissu d'origine des cellules sénescents, et des outils puissants permettant de mieux le définir ont récemment vu le jour, tels que le « SASP Atlas » [69].

Certains des composants du PSAS renforcent l'arrêt cellulaire et permettent de maintenir la sénescence de manière autocrine [70] ou régulent la surveillance immunitaire

[71], tandis que d'autres permettent de promouvoir la croissance et les capacités migratoires des cellules tumorales [72]. Également, il y aurait un impact du maintien ou non de ce sécrétome. En effet, exprimé de manière transitoire il permet de restaurer l'homéostasie tissulaire tandis que lorsqu'il devient trop important ou constant, il est médiateur d'une inflammation chronique [73]. De part ces rôles antagonistes, l'impact positif ou négatif du PSAS reste ambigu.

B. Rôles physiologiques de la sénescence

La sénescence se produit dans plusieurs tissus au cours de différents processus physiologiques tels que l'embryogénèse, le remodelage tissulaire, la cicatrisation des blessures et le vieillissement. C'est donc un mécanisme pro-régénératif et morphogénique important [74].

1. Embryogénèse

Les cellules sénescents sont nécessaires au bon développement de l'embryon, en favorisant le renouvellement des cellules, le remodelage des tissus et, de manière paradoxale, la croissance [75]. La sénescence se produit au cours du développement embryonnaire au niveau de plusieurs localisations, mais elle est indépendante des dommages causés à l'ADN ou de p53. En effet, dans ce cas de figure elle repose uniquement sur p21, et est régulée par les voies TGF- β SMAD et PI3K/FOXO. Elle est ensuite suivie par l'infiltration des macrophages, la clairance des cellules sénescents et le remodelage des tissus. La perte de sénescence due à l'absence de p21 peut être partiellement compensée par l'apoptose, mais cela entraîne cependant des anomalies de développement importantes [76].

2. Cicatrisation

Une activité pro-morphogénique de la sénescence, similaire à celle retrouvée lors de l'embryogénèse, a été suggérée pour agir pendant la cicatrisation. Des cellules sénescents semblent apparaître au niveau des sites des plaies après une blessure pour aider à promouvoir une cicatrisation optimale [77] [78].

Plusieurs études montrent le rôle bénéfique de ces cellules dans les processus de cicatrisation ou de régénération tissulaire. Par exemple, l'amputation des nageoires chez les poissons Zebra adultes a entraîné l'apparition de cellules sénescents à l'endroit de la lésion, caractérisées par l'augmentation du marquage beta-galactosidase, et leur élimination a inhibé la régénération efficace des tissus [74].

Également, lors de lésions hépatiques aiguës chez la souris, les cellules stellaires hépatiques prolifèrent et sécrètent des composants de la matrice extracellulaire (MEC), afin de constituer une cicatrice fibrotique qui finit par se résorber. Il s'avère que les cellules stellaires entrent en sénescence et sécrètent de nombreuses métalloprotéases permettant la dégradation des protéines de la MEC et ainsi la résolution accélérée de la cicatrice fibrotique [79]. Cette idée a été validée puisque les cellules stellaires ayant des capacités d'entrée en sénescence compromises (en raison de déficiences en p53 ou p16INK4a) ont induit le développement d'une fibrose sévère.

En fait, on retrouve dans la composition du PSAS de nombreux constituants qui ont un rôle important dans la réparation des tissus : des facteurs de croissance et des protéases participant à la cicatrisation des blessures, des chimiokines attirant les cellules immunitaires et des protéines mobilisant les cellules souches ou progénitrices. Ainsi, il s'avère que le PSAS permet de communiquer les dysfonctionnements et les dommages cellulaires aux tissus environnants et de stimuler la réparation lorsque cela est nécessaire [80].

3. Vieillesse

Le vieillissement est une caractéristique universelle des organismes, marqué par un déclin progressif des fonctions cellulaires et tissulaires pouvant être à l'origine de pathologies dégénératives. En effet, l'augmentation du stress oxydatif avec l'âge, l'attrition des télomères à chaque cycle, qui induit une instabilité des chromosomes ; ainsi que l'accumulation de mutations au cours de la vie, provoquent l'apparition de cellules endommagées. La sénescence est alors un processus bénéfique et physiologique permettant de provoquer un arrêt définitif des cellules compromises [81] et endiguer leur prolifération. Ainsi, les cellules sénescents s'accumulent dans divers tissus et organes avec le vieillissement [82].

Cependant, bien que la sénescence soit un processus physiologique essentiel, elle peut avoir des conséquences néfastes lors de l'accumulation de cellules sénescents ou bien de l'altération de leur homéostasie : elle peut alors favoriser le dysfonctionnement tissulaire et promouvoir des pathologies liées à l'âge, ainsi que le développement des tumeurs [59][83].

C. Sénescence et cancer

La sénescence cellulaire semblerait donc être un important mécanisme agissant comme une barrière naturelle au cancer. De même, lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations appropriées, la plupart des traitements génotoxiques provoquent la sénescence des cellules tumorales [84] suite à la RDA. Par conséquent, la sénescence induite par la chimiothérapie (SIC), comme l'apoptose, a été initialement considéré comme un résultat favorable de la chimiothérapie. Cependant, au vu de récentes études, des interrogations se posent quant aux bénéfices de cet état.

1. Mécanisme de suppression tumorale

La sénescence restreint la prolifération des cellules altérées qui risquent de subir une transformation néoplasique en imposant un arrêt de croissance à priori irréversible. En effet, comme vu précédemment, cet état survient après l'activation de gènes suppresseurs de tumeurs comme p53 et Rb [85][86] suite à la détection de cassures d'ADN double brin générées par le stress de réplication [87]. De nombreuses études, à la fois chez l'homme et la souris, montrent que la sénescence est donc un frein contre le cancer en imposant un bloc cellulaire à la prolifération des cellules oncogéniques endommagées [88] et que sa perte augmente l'incidence du cancer chez l'homme et la souris. De plus, certains membres du PSAS des cellules tumorales sénescents attirent les cellules immunitaires, ce qui favorise leur élimination et permet une régression tumorale efficace.

2. Facteur pro-tumoral

La sénescence est donc fréquente dans les lésions pré-tumorales, et la progression vers la malignité nécessite donc d'éviter la sénescence. Mais malgré ces fonctions suppressives

avérées, certaines actions pro-tumorales exercées par les cellules sénescentes ont été mises en évidence.

a) Niche

Les cellules sénescentes créent un environnement favorable au cancer en induisant des modifications de la matrice extracellulaire et la néo-angiogenèse. Cette caractéristique a été démontrée dans le cancer ovarien. La propagation intrapéritonéale de la maladie est influencée par les interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules mésothéliales péritonéales (CMP) et l'activité pro-tumorale de ces CMP augmente lorsqu'elles deviennent sénescentes. En fait, les CMP sénescentes stimulent la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses ovariennes *in vitro*, cet effet est lié à la fois à l'activité des constituants du PSAS libérés dans l'environnement et au contact direct entre cellules. Les CMP sénescentes qui s'accumulent créent ainsi une niche métastatique facilitant l'expansion intrapéritonéale du cancer [89].

b) Sécrétome

Certains constituants du PSAS vont avoir des rôles préjudiciables sur le microenvironnement tumoral, à la fois sur les cellules cancéreuses et la MEC, ce qui pousse ainsi à considérer le PSAS comme facteur pro-tumoral. En effet, les fibroblastes sénescents acquièrent la capacité de stimuler la prolifération des cellules pré-tumorales voisines via la sécrétion d'amphiréguline et de chimiokines « oncogène lié à la croissance » (GRO) dans les modèles de culture cellulaire [90]. De plus, ils sécrètent du VEGF qui stimule la migration et l'invasion des cellules endothéliales permettant alors de stimuler l'angiogenèse nécessaire au développement de la tumeur. Également, la plupart des composants de la MEC sont des cibles enzymatiques de protéases retrouvées dans le PSAS. Par conséquent, la sénescence pourrait affecter les propriétés physiques de la structure des tissus autour des cellules, diminuant le rôle de soutien de la MEC et l'élasticité des tissus. Ceci a notamment été mis en évidence dans le contexte du cancer du sein, où des fibroblastes entrés en sénescence après avoir été traités par la Bléomycine ont été co-greffés avec des cellules tumorales mammaires chez des souris immunodéficientes, provoquant une augmentation de la croissance tumorale via la sécrétion de protéines de remodelage de la matrice et de facteurs de croissance [91].

Les cellules sénescents sécrètent également des niveaux élevés de métalloprotéases matricielles [90], d'interleukine 6 (IL-6) et d'IL-8, stimulant alors les cellules malignes à envahir la membrane basale [68]. La structure tissulaire détendue et les capacités migratoires augmentées pourraient alors aider les cellules tumorales à migrer et à envahir la MEC, favorisant ainsi la formation de métastases [90].

Enfin, suite au stress génotoxique induit par la chimiothérapie, une population de cellules géantes polyploïdes peut apparaître, présentant les caractéristiques de la sénescence avec notamment la sécrétion d'un PSAS pro-tumoral, influençant les cellules avoisinantes en activant des cascades de signalisation qui favorisent la chimiorésistance [92] ainsi que la reprogrammation en cellule souches [93].

La composition du PSAS est donc variable, duale, et peut donc être modifiée par l'expression de différents facteurs oncogéniques ou suppresseurs. Il a été émis comme hypothèse que la modification et l'amplification de ce PSAS, le rendant plus oncogène, serait liée à l'inactivation du suppresseur de tumeur p53. En effet, l'augmentation de son expression (via l'utilisation d'antagonistes de mdm2, molécule favorisant sa dégradation) permet de limiter l'invasivité et l'induction de la TEM par les cellules sénescents [68]. Au contraire, l'augmentation de l'expression de mTOR favoriserait le développement d'un phénotype sécrétoire aux caractéristiques pro-oncogéniques [94].

3. Échappement à la sénescence induite par la chimiothérapie

Parmi les voies favorisant l'échec thérapeutique ainsi que la progression tumorale, on retrouve comme vu précédemment l'altération des voies de mort cellulaire et notamment pro-apoptotiques. Et bien que les paramètres des cellules sénescents puissent être détectés dans les cellules malignes traitées, ces critères ne sont pas suffisants pour conclure que la sénescence est efficiente et que la prolifération des cellules cancéreuses est définitivement arrêtée. En effet, dans ce contexte, la sénescence est bien plus complexe. Et comme pour les voies apoptotiques, les mécanismes impliqués sont potentiellement modifiés ou altérés, amenant la sénescence comme un dispositif « d'hibernation » en attendant un moment plus propice pour proliférer à nouveau et échapper au traitement.

En effet, plusieurs laboratoires ont montré que dans le contexte du cancer, cette réponse est parfois incomplète et que les populations arrêtées persistantes semblent utiliser la sénescence comme une voie adaptative, afin d'échapper à cet arrêt considéré comme définitif, et devenir alors plus agressives. L'équipe de Beauséjour a montré que la sénescence était réversible dans des cellules mammaires lors de l'inactivation de p53 [95], et ces résultats ont également été montrés dans le cancer du poumon [96]. Également, dans les nævus, la perte de PTEN ou de p16INK4a entraîne un échappement à la sénescence et une progression du mélanome [97].

De même, mon laboratoire d'accueil a montré, grâce à différents modèles expérimentaux, que les cellules cancéreuses entrent en sénescence en réponse à la chimiothérapie, mais que certaines d'entre elles, nommées "émergentes" sont capables d'échapper à cet arrêt suppressif. L'émergence repose notamment sur des fonctions non canoniques de Bcl-xL et Mcl-1, activés lors de la sénescence induite par la chimiothérapie (SIC), en absence d'apoptose [98]. Cette émergence est régulée par des protéines du PSAS et notamment la thrombospondine 1 (TSP1), une protéine produite par les cellules sénescents qui prévient l'échappement de la sénescence.

a) Hétérogénéité des cellules sénescents

Ainsi, la sénescence est plus complexe dans les cellules cancéreuses, elle peut être non définitive et donc hétérogène. CD47, un récepteur de la TSP1, peut par exemple servir à identifier ces sous-populations. En effet, les cellules exprimant peu CD47 sont sujettes à l'émergence car elles sont peu sensibles à l'effet inhibiteur de la TSP1 [99]. Au contraire, la population qui exprime fortement CD47 reste arrêtée.

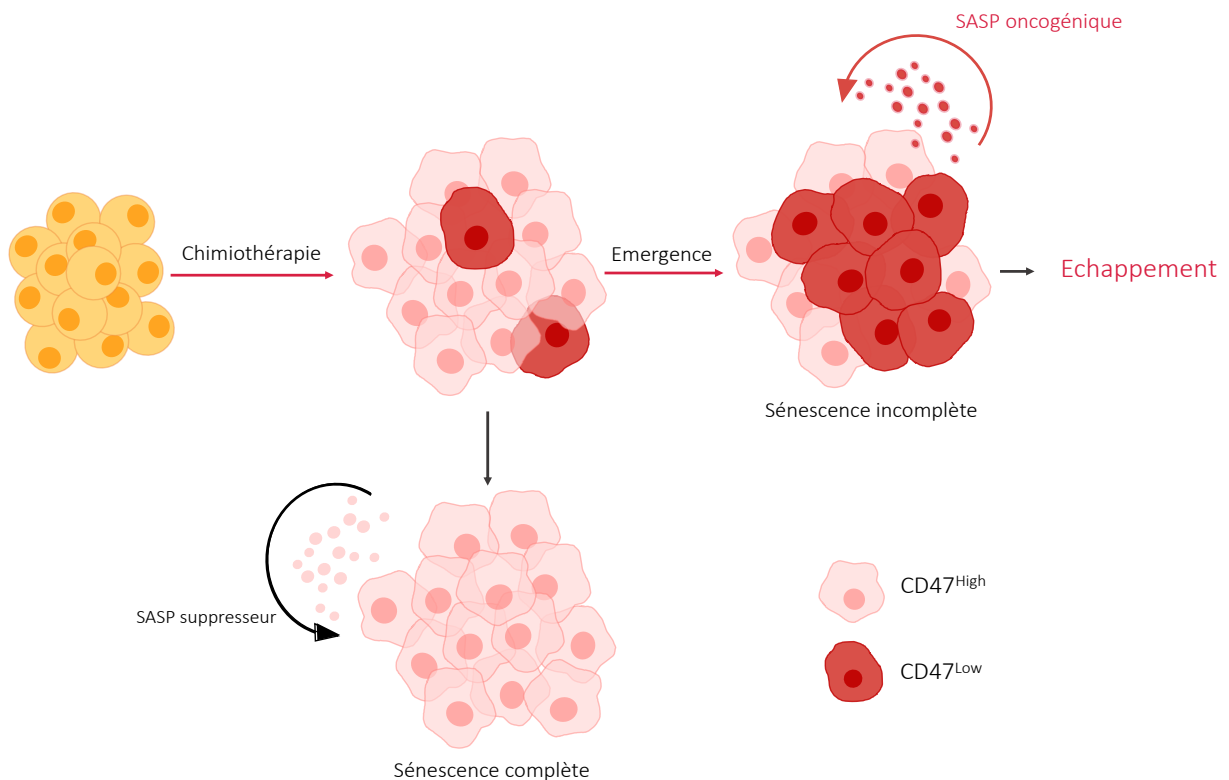


Figure 4: Modèle du laboratoire. Les cellules cancéreuses, suite à une chimiothérapie, peuvent entrer en sénescence. Cette population est hétérogène, avec une sous-population exprimant fortement CD47, répondant à la TSP1 et maintenant ainsi le phénotype sénescents, et une sous population exprimant faiblement CD47, répondant plutôt à un sécrétome pro tumoral et utilisant ainsi la sénescence comme un mécanisme d'adaptation oncogénique permettant l'émergence et l'échappement.

De même, l'équipe de Hoare et al. a montré qu'une sous population de cellules sénescents exprimait plus fortement Notch, induisant la production d'un PSAS différent, notamment comportant moins de cytokines pro-inflammatoires. En conséquence, ces cellules transmettent un arrêt prolifératif aux cellules voisines, mais avec une surveillance immunitaire diminuée, pouvant avoir un impact positif sur la progression du cancer. Au contraire, la sous-expression de Notch favorise la clairance des cellules cancéreuses sénescents par la modulation de la surveillance immunitaire [100].

b) Sélection d'une population plus agressive

L'échappement à la sénescence conduit à l'émergence de clones plus transformés qui sont capables d'induire la formation de tumeurs, résistent à l'anoïkis et sont plus envahissantes grâce à un potentiel de migration accru [99], [101]–[103]. *In vivo*, ces cellules émergentes ont un potentiel d'initiation de tumeurs et de métastases plus élevé que les cellules initiales. Cette augmentation de l'agressivité des tumeurs passerait notamment par

l'acquisition de propriétés de cellules souches : les cellules échappant à la sénescence reprennent leur cycle cellulaire avec un potentiel de croissance clonogénique accru et dépendant de Wnt. Ainsi, les voies de signalisation cellulaire activées sont similaires entre les cellules émergentes et les cellules souches. Cette transformation en CSCs est autonome chez les cellules émergentes et nécessite un état de sénescence préalable pour que ce processus se produise [104].

Ces résultats ont été validés sur des souris transgéniques et des modèles de leucémies [105] dans lesquels ils ont montré que les lymphomes B échappant à la sénescence sont plus transformés en raison d'une dédifférenciation des cellules sénescents en cellules souches. Les données récentes du laboratoire confirment cette observation, les facteurs souches KLF4 et nanog sont induits lors de la sénescence et leur surexpression par un système inductible favorise l'échappement. Il a également été récemment démontré qu'une sous-population de cellules sénescents exprimant p21 est capable d'échapper à cet arrêt suppressif, émergeant avec une instabilité génomique, une agressivité et une chimiorésistance accrues [106].

D. Rôle bénéfique ou néfaste ?

Ainsi, il semblerait que la sénescence ait un rôle ambigu et pléiotropique dans le contexte du cancer.

Cela soulève de nombreuses questions sur cet état : Est-elle réellement un mécanisme suppressif lorsqu'elle est activée en réponse à la chimiothérapie ? Les mutations des cellules cancéreuses sont-elles à l'origine de la réversion de la sénescence ? Est-ce un modèle de dormance permettant une survie prolongée, afin de s'adapter aux conditions stressantes et ainsi contourner l'apoptose [48] ? Y a-t-il un intérêt pour l'utilisation des sénolytiques dans les thérapies anticancéreuses [107] ? Le laboratoire dans lequel j'ai effectué mon stage de Master 2 cherche justement à répondre à ces questions et caractériser les mécanismes qui permettent aux cellules d'échapper à la sénescence.

Étant donné la dualité de la sénescence et sa complexité dans le contexte du cancer, il est important de mieux caractériser l'hétérogénéité de cette population afin d'identifier les clones spécifiques qui utilisent la sénescence comme voie d'adaptation. Ainsi, on aura une

meilleure connaissance des mécanismes de résistance aux traitements chimio thérapeutiques afin d'améliorer la prise en charge des patients, et ainsi pouvoir prévoir les éventuelles rechutes de la maladie. La protéomique est, par exemple, un outil puissant nous permettant de caractériser les signatures des différentes populations retrouvées dans ce contexte [108]. L'intérêt de la protéomique quantitative a été démontré avec la découverte de TSP1 qui peut être dorénavant utilisé comme marqueur prédictif de l'échec de la chimiothérapie chez les patientes souffrant d'un cancer du sein triple négatif.

Ces outils ont également permis d'identifier S100A4 parmi les protéines exprimées par les cellules sénescentes.

III. S100A4

A. La famille S100

Les membres de la famille S100 sont un groupe similaire de petites protéines liant le calcium (Ca^{2+}) d'une masse moléculaire de 10-12kDa. Ces protéines sont nommées ainsi à cause de leur solubilité dans une solution saturée de sulfate d'ammonium.

Les premiers membres de la famille ont été découverts dans le cerveau par B.W. Moore en 1965 [109], et désormais 25 protéines appartenant à cette famille ont été identifiées [14]. La plupart d'entre elles se trouvent sur le chromosome humain 1 (1q21). Les protéines appartenant au groupe S100 sont des homo- ou hétérodimères. Chaque protéine S100 est constituée de deux motifs structurels dits « main EF » formés de deux hélices alpha disposées dos à dos et reliées par une boucle flexible. Cette structure enserre l'ion calcium. Ces motifs, classiquement retrouvés sur les protéines liant le Ca^{2+} sont habituellement constitués de 12 résidus. En revanche, les protéines S100 constituent un ensemble unique de membres de la famille des « mains EF », puisque l'un des motifs EF de la paire (appelé pseudo-main ou main S100) comporte non pas 12 mais 14 résidus. Ce dernier est situé sur l'extrémité N-terminale des protéines S100 et comporte moins d'affinité pour l'ion calcium que le motif à 12 résidus [110].

Les protéines de la famille S100 sont normalement retrouvées dans les cellules dérivant de la crête neurale et sont impliquées dans une grande variété de processus intracellulaires ou extracellulaires. Elles ne possèdent aucune activité enzymatique intrinsèquement, mais exercent leurs effets en interagissant avec d'autres protéines et en modulant leur activité. Au niveau intracellulaire, les protéines S100 peuvent avoir des rôles très variés : elles sont impliquées dans les processus de différenciation, prolifération, migration cellulaire, dans l'apoptose, l'homéostasie du Ca^{2+} , le métabolisme énergétique (etc..) via des interactions avec diverses protéines cibles telles que des enzymes, des protéines du cytosquelette, des récepteurs ou encore des protéines impliquées dans la transcription.

Ces protéines ont également des rôles extracellulaires, de manière autocrine ou paracrine via l'activation de récepteurs surfaciques (RCPG ou protéoglycanes) pour activer des

voies de prolifération, différenciation, survie et migration des cellules dans des conditions physiologiques ou pathologiques [111].

Également certaines protéines S100 sont retrouvées dans le sérum des patients et leurs niveaux d'expression modifiés peuvent être utilisées comme marqueurs de pathologies, dans les traumatismes crâniens [112], affections dégénératives et processus inflammatoires [113] par exemple. La protéine S100A4, en particulier, a fait l'objet d'une attention croissante en raison de ses propriétés métastatiques.

B. Généralités sur S100A4

La protéine S100A4 a été isolée et caractérisée pour la première fois par Ebradlize et ses collègues en 1989 [114], nommée alors métastatin-1 puisqu'elle était exprimée par différentes cellules métastatiques.

Le gène de S100A4 a ensuite été cloné par différents groupes qui l'ont nommé "fibroblast-specific protein" (FSP1), 18A2, pEL98, p9Ka, 42A, CAPL et calvasculin [115]. Ces clonages ont permis notamment d'identifier S100A4 comme un transcrite hautement exprimé dans des cellules cultivées stimulées [116], lors de la transition épithélio-mésenchymateuse [117] ainsi que lors de la transformation oncogénique [118]. S100A4 est surtout connue pour son implication dans les processus métastatiques, *in vitro* ainsi que dans plusieurs modèles expérimentaux, et son expression est donc associée au mauvais pronostic des patients dans un certain nombre de tumeurs.

S100A4 est localisée dans le noyau, le cytoplasme et l'espace extracellulaire et possède un large éventail de fonctions biologiques, telles que la régulation de l'angiogenèse, la survie des cellules, la motilité et l'invasion [119], et c'est pourquoi on le retrouve dans de nombreux types cellulaires.

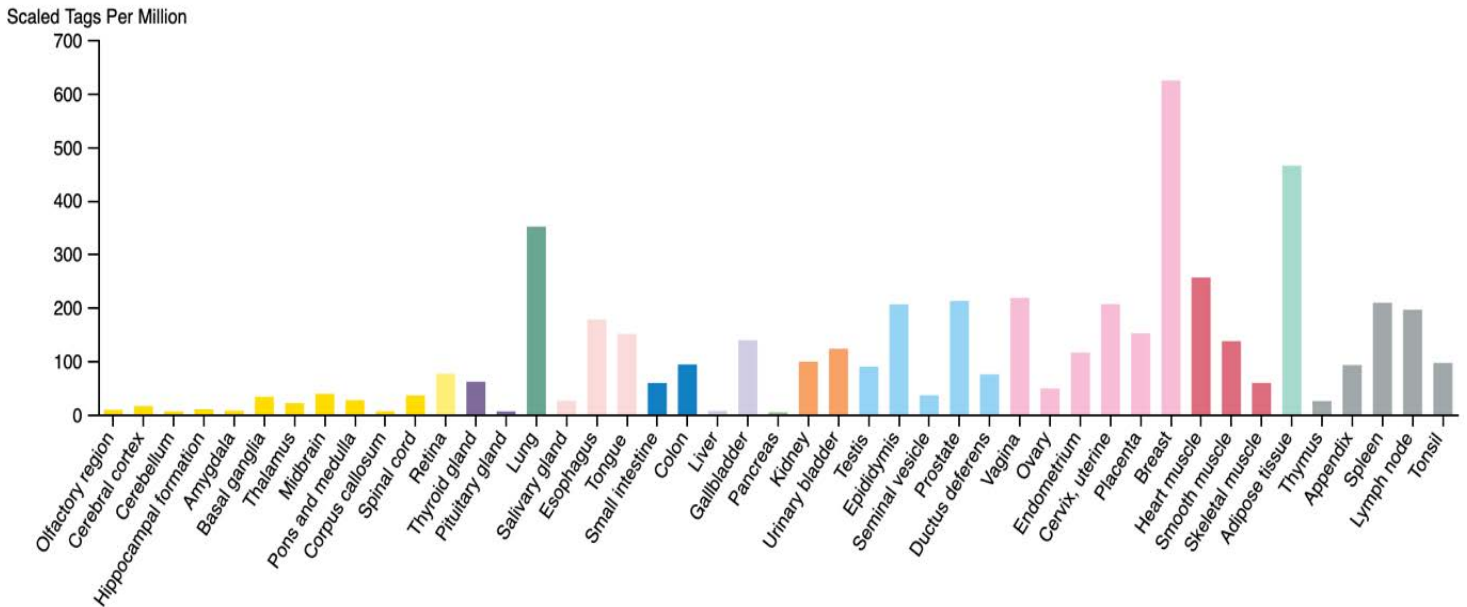


Figure 5 : Synthèse de l'expression de l'ARN de S100A4, tirée du projet FANTOM5 : Les données sur l'expression de l'ARN dans les différents tissus sont obtenues par analyse de l'expression de gènes (CAGE). Le codage couleur est basé sur des groupes de tissus, chacun étant constitué de tissus ayant des caractéristiques fonctionnelles communes. Ces données sont issues de l'Human Protein Atlas.

1. Localisation subcellulaire et distribution

a) Intracellulaire

Au niveau intracellulaire, S100A4 interagit avec des protéines cytosquelettiques telles que la chaîne lourde de myosine non musculaire (CMNM) IIA, la tropomyosine et l'actine [111]. Ces interactions sont notamment à l'origine des processus de migration cellulaire. Par exemple, l'équipe de TM Ismail a proposé d'attribuer un rôle direct de S100A4 dans la progression métastatique sur la base de son interaction avec les CMNM IIA [120]. Les phénothiazines inhibent cette interaction en induisant l'oligomérisation de S100A4 [121], et diminuent ainsi la formation de métastases.

Également, S100A4 interagit avec la protéine suppresseur de tumeur p53 dans le noyau, et permettrait notamment sa dégradation, régulant alors sa fonction transcriptionnelle [122]. En conséquence, les gènes cibles de p53 (p21, bax, TSP1 et mdm-2) sont exprimés de façon différentielle [123]. De même, l'interaction de S100A4 avec certaines annexines a été mise en évidence : les annexines sont des protéines intracellulaires situées sur la face cytosolique de la membrane plasmique, et peuvent parfois être exprimés sur le versant

extracellulaire des cellules endothéliales [124]. L'expression intracellulaire de S100A4 a aussi été associée à la régulation transcriptionnelle des métalloprotéases de la matrice (MMP) et de la E-cadhérine, ce qui favorise le processus métastatique.

b) Extracellulaire :

Bien que son mécanisme de sécrétion soit encore inconnu, S100A4 possède des fonctions extracellulaires. S100A4 est sécrétée par les fibroblastes en culture, et stimule de manière autocrine sa propre libération lorsque les fibroblastes sont cultivés en présence de cellules tumorales [123]. Dans l'espace extracellulaire, S100A4 interagit avec les récepteurs de surface cellulaire, le récepteur des produits de glycation (RAGE) et l'annexine II, ainsi qu'avec les protéoglycanes d'héparane sulfate [119]. La liaison au récepteur RAGE va permettre le remodelage de la matrice extracellulaire, via l'augmentation de la sécrétion de plusieurs métallopeptidases de la matrice (MPM-1, 3, 9 et 13) ; ainsi que l'angiogenèse [125] via l'interaction avec l'annexine 1 sur la face externe des cellules endothéliales et l'activation du plasminogène.

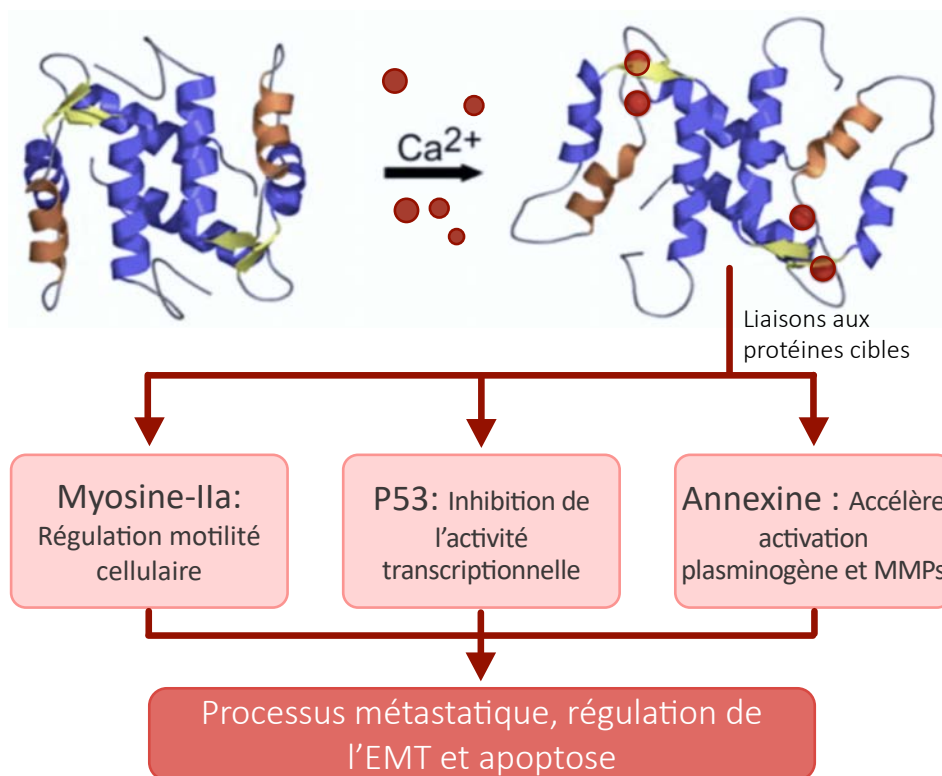


Figure 6: Schématisation de la structure quaternaire de S100A4 dans sa forme native et liée au calcium. La deuxième partie de la figure indique les différents rôles de S100A4 lorsqu'il se lie à ses protéines cibles principales (adapté de Garret et al).

2. Régulation transcriptionnelle

La régulation transcriptionnelle de S100A4 a principalement été étudiée sur des lignées cellulaires murines : dans les cellules d'adénocarcinome de souris, une région enhancer située dans le premier intron contrôle la transcription de S100A4 [126]. Cependant, cet enhancer est relativement faible et serait donc plus sensible à la répression totale médiée par la méthylation de l'ADN [127].

Dans les cellules humaines, l'expression de S100A4 est notamment modulée par la méthylation de l'ADN, la caténine ainsi que par les facteurs extracellulaires.

C. Rôle dans les pathologies non tumorales

En plus d'être exprimé dans les cellules tumorales, S100A4 est retrouvé dans de nombreux types cellulaires, notamment dans les cellules immunitaires, vasculaires et les cellules dérivées de la moelle osseuse, et donc cette protéine est impliquée dans des processus non tumoraux.

1. Système immunitaire

Des recherches ont suggéré que S100A4 est un acteur puissant des voies pro-inflammatoires. Les fonctions biologiques intra et extracellulaires du S100A4 induisent une inflammation pathologique dans divers troubles auto-immuns, tels que la polyarthrite rhumatoïde (via l'augmentation de la sécrétion des MMP), le psoriasis ou bien la maladie de Crohn. En effet, la dégradation de la MEC ainsi que l'expression de molécules aberrantes peuvent être stimulés par S100A4, qui, ainsi, joue un rôle important dans le soutien de la réponse inflammatoire chronique au niveau du site affecté.

De même, en interagissant avec les molécules cibles associées au cytosquelette intracellulaire, S100A4 facilite le remodelage des filaments de myosine, améliorant ainsi la motilité cellulaire et la chimiotaxie. Il exerce donc un rôle chimio-attractant pour les cellules immunitaires qui vont alors stimuler la sécrétion de chimiokines impliquées par exemple dans l'allergie (éotaxine-2). Également, S100A4 agit comme un modulateur important de la migration des cellules T lors des réponses immunitaires [128].

Hors l'inflammation chronique est reconnue comme étant une des caractéristiques importantes de la cancérogénèse, tant dans l'initiation du cancer que dans la progression métastatique.

2. Fibrose

Étant fortement exprimé par les fibroblastes, S100A4 est souvent utilisé pour prédire et surveiller la fibrose tissulaire, notamment lors de la fibrose hépatique ou pulmonaire [129]. Des études ont mis en évidence que S100A4 était impliquée dans la transformation des cellules épithéliales ou endothéliales en fibroblastes, notamment au niveau du rein, des poumons, du foie, et du cœur. Lors de la déplétion sélective des cellules exprimant S100A4, on observe une réduction conséquente de la fibrose hépatique suite à une lésion.

Également, un rôle extracellulaire pour S100A4 dans la fibrose a été mis en évidence : lorsqu'il est libéré par les macrophages, il favorise la fibrose pulmonaire par l'activation des fibroblastes pulmonaires, générant ainsi des cellules progénitrices de composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène ou l'élastine, constituants essentiels des tissus fibrotiques [130]. Sa sécrétion augmente également l'activation des cellules stellaires du foie, permettant la formation de niches pro-inflammatoires et le remodelage de la MEC en faveur du processus fibrotique. Par ailleurs, lors de la déplétion sélective des macrophages en S100A4, on observe une réduction conséquente de la fibrose.

D. Rôle dans les cancers

De nombreuses études ont révélé que le S100A4 est impliqué dans la progression du cancer en affectant une variété de fonctions biologiques.

1. Pro-métastatique et pro-invasif

Bien que S100A4 soit établi comme un régulateur du processus métastatique, les mécanismes par lesquels il favorise un phénotype invasif ne sont pas entièrement décrits.

Ces dernières années, on a émis l'hypothèse que certaines des actions pro-métastatiques de S100A4 pourraient s'expliquer par son rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse. Le premier lien entre S100A4 et la TEM a été montré par Strutz [116] : la transfection de S100A4 dans des cellules épithéliales tubulaires proximales murines a induit une TEM, alors que lorsque l'expression de S100A4 est abolie, les cellules n'entrent pas en TEM. Également, l'expression de S100A4 est plus élevée sur les fronts d'invasion, indiquant un rôle de cette protéine dans ce processus.

Des données récentes obtenues par le laboratoire, en collaboration avec l'équipe de Joelle S.Nader, ont permis de mettre en évidence la surexpression de S100A4 dans les lignées mésothéliales néoplasiques par rapport aux lignées pré néoplasiques, soulignant son lien avec le processus tumoral. De même, ils ont également montré sa surexpression dans les morphologies cellulaires sarcomatoïdes par rapport aux épithélioïdes, validant son implication dans la TEM. Et pour finir, parmi un panel de protéines surexprimées lors du processus néoplasique, S100A4 est le plus fortement augmenté au niveau des métastases par rapport aux localisations primaires, appuyant son rôle crucial dans l'invasivité et l'agressivité. Ces données confirment l'implication de cette protéine dans la pathogénicité des cancers mésothéliaux [131].

2. Balance apoptose-sénescence

La modulation de l'activité de p53 stimule l'apoptose aux premiers stades du développement de la tumeur. L'équipe de Grigorian *et al.* a émis l'hypothèse que cela contribuerait à accélérer la perte de la fonction sauvage de p53 et ainsi sélectionner un phénotype malin. Par son interaction avec p53, S100A4 favoriserait donc l'apoptose des cellules exprimant p53 sauvage, au profit des p53 mutants. Ainsi à des stades plus avancés, S100A4 contribue à la sélection et au développement d'un phénotype plus agressif permettant la progression de la tumeur [132].

De manière contradictoire, après la chimiothérapie, S100A4 est un facteur de survie en favorisant la chimiorésistance notamment par une inhibition de l'apoptose. Ceci a été confirmé par Mahon *et al.* dans le cancer du pancréas, où l'inhibition de S100A4 augmentait

la réponse au traitement ainsi que les capacités apoptotiques des cellules [133]. En effet, S100A4 serait responsable d'une diminution de l'arrêt du cycle cellulaire p53-dépendant et donc de l'apoptose [122] suite à un traitement chimio thérapeutique.

3. Acquisition du caractère souche

Dans le glioblastome, S100A4 a été identifié comme un nouveau marqueur des CSCs : les cellules enrichies en S100A4 ont des capacités d'initiation de tumeurs et de formation de sphéroïdes, et elles sont situées dans des niches périvasculaires où se trouvent généralement les CSCs. Pour confirmer ce résultat, il a été démontré que l'ablation sélective des cellules exprimant S100A4 est suffisante pour bloquer la croissance des tumeurs *in vitro* et *in vivo* [134]. S100A4 serait donc un régulateur critique du renouvellement des CSCs. Cet effet a également été montré quand le cancer gastrique, où l'inhibition de S100A4 a supprimé les propriétés souches des cellules cancéreuses [135]. Ainsi, on peut se demander si S100A4 pourrait générer des cellules dédifférenciées via l'activation de la voie souche KLF4-nanog.

4. Facteur pronostic

L'association entre l'expression de S100A4 et le processus métastatique a conduit à un certain nombre d'études examinant l'utilité de l'utilisation de S100A4 comme marqueur pronostic dans certains cancers. Chez l'homme, l'expression élevée de S100A4, aussi bien dans les cellules tumorales et stromales que dans le sérum, a été associée à un mauvais pronostic et à une faible survie des patients atteints de cancer. Par exemple, dans le cancer du sein, l'expression de S100A4 est fortement corrélée à la mort du patient [136].

En plus du cancer du sein, il a été démontré que S100A4 est un marqueur pronostic dans les cancers gastriques [137], les cancers du poumon non à petite cellule [138], les cancers colorectaux [139], les cancers ovariens [140] ainsi que les cancers de la prostate [141].

Hypothèse et objectifs :

Les traitements actuels contre le cancer causent des dommages à l'ADN qui déclenchent la RDA. Cette voie moléculaire peut aboutir à différents destins cellulaires : la mort de la cellule par apoptose, sa survie grâce à la réparation des dommages ou encore sa sortie permanente du cycle cellulaire ou sénescence. Cependant, la sénescence induite par la chimiothérapie est hétérogène, elle peut être un évènement délétère favorisant l'émergence d'une population plus agressive, exprimant notamment des caractéristiques de la TEM et des cellules souches. Dans certains cas, elle devient donc une adaptation oncogénique pouvant entraîner la rechute de la maladie. Or en thérapie anticancéreuse, le but est d'éradiquer la masse tumorale en provoquant la mort définitive des cellules malignes. Par conséquent, caractériser les cellules échappant à cette suppression, comprendre l'hétérogénéité de la sénescence et ses effets délétères pourrait nous permettre d'optimiser les traitements chimiothérapeutiques.

De part ces fonctions connues dans le processus métastatique et la TEM, ainsi que la récente identification de S100A4 par approche protéomique dans les cellules sénescents, nous avons émis l'hypothèse que S100A4 pouvait avoir un rôle dans l'émergence. Les résultats préliminaires du laboratoire suggèrent effectivement un rôle dans l'échappement et la colonisation.

Notre hypothèse est que S100A4 pourrait favoriser l'émergence de certaines cellules grâce à la sécrétion d'un PSAS plus oncogénique via la dégradation du suppresseur de tumeur p53 ; ainsi qu'à l'activation de facteurs de la TEM ou souches tels que SLUG et Nanog, respectivement. Cela permettrait notamment de générer la population CD47^{low} dédifférenciée. Ainsi S100A4 serait un des paramètres de l'hétérogénéité de la sénescence, permettant à certaines sous populations d'échapper à ce mécanisme.

S100A4 pourrait ainsi devenir une nouvelle cible thérapeutique, ou un nouveau marqueur de l'échappement à la thérapie dans certains cancers [115].

Matériel et méthodes

A. Culture cellulaire

Toutes les cellules humaines ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC®, Rockville, MD, Etats-Unis). Les lignées cellulaires de cancer colorectal humain LS174T et de mésothéliome malin chez le rat sont cultivées en milieu RPMI contenant 10% de SVF. Elles sont maintenues dans des incubateurs à 37°C, dans une atmosphère humide contenant 5 % de dioxyde de carbone et ont été régulièrement testées pour exclure toute contamination par les mycoplasmes. L'entretien des lignées cellulaires se fait lorsque les cellules ont atteint 80% de confluence. Les cellules sont d'abord rincées au PBS 1X (Dulbecco's®, Sigma) puis décollées de leur support par une solution de trypsine (Dulbecco's®, Sigma). La trypsine est neutralisée en ajoutant du milieu RPMI complété avec 10% de SVF. Les cellules sont réensemencées en les diluant au 1/10ème dans des flasques de 175 cm².

B. Invalidation de gènes par SiRNA :

Les cellules ont été transfectées avec 50nM de petit ARN interférent (siRNA) contre S100A4 (Dharmacon), et avec des siRNA de contrôle pré-validés (Dharmacon, D-001810-10-20) en utilisant DharmaFect-4 (Dharmacon).

C. Traitement des cellules

Selon le type de cellules, les cellules sont ensemencées à une densité de 100 000 à 600 000 cellules par boîte de diamètre 60mm, 24 h avant le traitement. Pour induire la sénescence, les cellules ont été traitées pendant 96 h avec du sn38 (5 ng/ml, LS174T) ou du CisPlatine (2 ng/ml pour les lignées de rat) dans du milieu RPMI-FBS 3%. Pour la génération de cellules persistantes, les cellules LS174T ont été traitées pendant 4 jours avec du sn38 (5 ng/ml) dans du milieu RPMI-FBS 3%, lavées avec du PBS, puis restimulées avec du RPMI-FBS frais à 10% pendant 10 jours. Les cellules cancéreuses colorectales ont été traitées avec le sn38 (Tocris Bioscience 2684), le métabolite actif de l'irinotécan qui est un analogue hémisynthétique de la camptothécine. En tant qu'inhibiteur de la topoisomérase I, ce médicament empêche la

ligation de l'ADN et est responsable des cassures de l'ADN à un ou deux brins. Ces dommages à l'ADN entraînent une sénescence dans nos conditions.

Le cisplatine (Tocris Bioscience 2684) utilisé pour traiter les lignées de rat, est un agent alkylant à base de platine inhibant la réplication en se liant aux bases puriques de l'ADN et induisant la mort cellulaire préférentielle des cellules cancéreuses.

D. Test de Beta-galactosidase

Les cellules ont été fixées pendant 15 minutes (à température ambiante) dans du formaldéhyde à 1%, lavées avec du PBS et incubées à 37°C (sans CO₂) pendant 16 à 20h avec une solution de coloration fraîche : 0.3 mg/mL de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactoside (X-Gal, Fermentas), 40 mM d'acide citrique (Sigma), 40 mM de phosphate de sodium (Sigma) (solution mère (400 mM d'acide citrique, 400 mM de phosphate de sodium) doit être à pH6), 5 mM de ferrocyanure de potassium (Sigma), 5 mM de ferricyanure de potassium (Sigma), 150 mM de NaCl (Sigma), 150 mM de MgCl₂ (Sigma).

E. Extraits cellulaires et Western Blotting

Les extraits cellulaires sont récupérés par action mécanique à l'aide d'un grattoir puis resuspendues dans un tampon FASP (TrisHCl 0.1M, SDS 4% pH 7.6) supplémenté par des inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich) et de phosphatases (Halt phosphatase inhibitor cocktail ; Thermo Scientific). Après sonication, les extraits protéiques sont dosés par la méthode BCA Protein Assay Kit® (ThermoFisher scientific 23225). Après dosage, les échantillons sont mélangés à la solution de bleu de dénaturation SB5X (Tris 0.3M pH=6.8 ; SDS 10% ; Glycérol 40 % ; Bleu de Bromophénol 0.02% ; DTT 100 mM).

25 à 50 µg de protéines sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide à 10%.

Le gel de polyacrylamide préparé contient :

- Un separating gel : voir tableau ci-dessous.
- Un stacking gel : acrylamide 40%, Tris 0.5M pH = 6.8 (Bio- Rad), 0.4%SDS, eau, APS 10% et Temed.

	6%		8%		10%		12%		14%	
	1 gel = 8 mL	2 gels = 16 mL	1 gel = 8 mL	2 gels = 16 mL	1 gel = 8 mL	2 gels = 16 mL	1 gel = 8 mL	2 gels = 16 mL	1 gel = 8 mL	2 gels = 16 mL
H2O	4,2	8,4	3,7	7,4	3,1	6,2	2,7	5,4	2,1	4,2
Acryl/bis 30/1 (4°C)	1,6	3,2	2,1	4,2	2,7	5,4	3,1	6,2	3,7	7,4
Tampon de Running 1X <i>Tris 1,5M 0,4% SDS pH 8,8</i>	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4
APS 10% (4°C)	80µL	160µL	80µL	160µL	80µL	160µL	80µL	160µL	80µL	160µL
TEMED (RT)	16µL	32µL	16µL	32µL	16µL	32µL	16µL	32µL	16µL	32µL

La migration s'effectue sous l'action d'un champ électrique de 90 à 130 Volts dans un tampon de migration (Tris 250 mM, Glycine 1.92 M, SDS 1%, eau).

Les protéines sont ensuite transférées en milieu semi-sec sur une membrane de difluorure de polyvinyle 0.45 µM (PVDF) (GE-Healthcare) préalablement activée par du méthanol 100%, sous l'action d'un champ électrique de 23 Volts pendant 30 à 55 minutes à température ambiante dans un tampon de transfert (Tris 25 mM, Glycine 0.192 mM, méthanol 20%). Ce transfert semi-sec est réalisé sur les appareils Biorad Trans Blot Semi Dry Transfert Cell ou Transblot Turbo.

Les membranes sont ensuite saturées pendant 45 minutes sous agitation à température ambiante dans une solution de TBS-Tween20 0.05% (TBST) contenant 5% de lait écrémé en poudre (Régilait). Elles sont incubées sur la nuit à 4°C sous agitation en présence de l'anticorps primaire dilué dans du TBST, 1% BSA. Les membranes sont ensuite lavées 2 fois pendant 5 minutes dans du TBST, puis incubées 1h à température ambiante en présence d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase puis lavées à nouveau 2 fois 5 minutes dans du TBST.

Anticorps	Milieu de dilution	Dilution	Origine	Référence	Laboratoire
Anticorps Primaires					
KLF4	TBST - 1% BSA	1/1000	Souris	4696	Cell Signaling
Nanog	TBST - 1% BSA	1/1000	Lapin	4377	Cell Signaling
p21	TBST - 1% BSA	1/1000	Lapin	29475	Cell Signaling
p53	TBST - 1% BSA	1/1000	Lapin	3270	Cell Signaling
p-p53(Ser15)	TBST - 1% BSA	1/1000	Souris	sc-7317	Santa-cruz

p62	TBST - 1% BSA	1/1000	Lapin	9165	Cell Signaling
SHC70	TBST - 1% BSA	1/1000	Lapin	7298	Cell Signaling
S100A4	TBST - 1% BSA	1/1000	Souris	Sc-7317	Santa Cruz
SLUG	TBST - 1% BSA	1/1000	Souris	Sc-501	Santa Cruz

Anticorps Secondaires

Anti-Lapin	TBST - 1% BSA	3/10000	Chèvre	7074S	Cell Signaling
Anti-Souris	TBST - 1% BSA	3/10000	Chèvre	7076S	Cell Signaling

La révélation se fait par une réaction de chimioluminescence avec une solution de luminol, acide coumarique (Sigma A8511), tris-ECL et eau oxygénée. Le logiciel d'acquisition utilisé est ImageLab® (Biorad).

F. Marquage gamma H2AX et cytométrie de flux

Fixation et perméabilisation : Les cellules ont été trypsinisées, lavées avec du PBS puis incubées avec 4 % de paraformaldéhyde pendant 10 minutes à 37 °C. Ensuite, les cellules ont été lavées et perméabilisées avec du méthanol froid à 90 % pendant 30 min dans de la glace. Les cellules sont alors lavées et colorées pour les protéines intracellulaires comme décrit ci-dessous. Les solutions de coloration ont été préparées dans du PBS-BSA à 2 %.

Coloration p-H2AX (Ser 139) : Les cellules ont été incubées avec 16 ng d'anti-p-H2AX de souris A488 (Ser 139) (BD Pharmingen, 560445) ou 16 ng d'IgG1K de souris A488 (BD Pharmingen, 557721) pendant 1 h dans l'obscurité à température ambiante.

RESULTATS

A. Implications de S100A4 dans l'invasivité tumorale in vivo

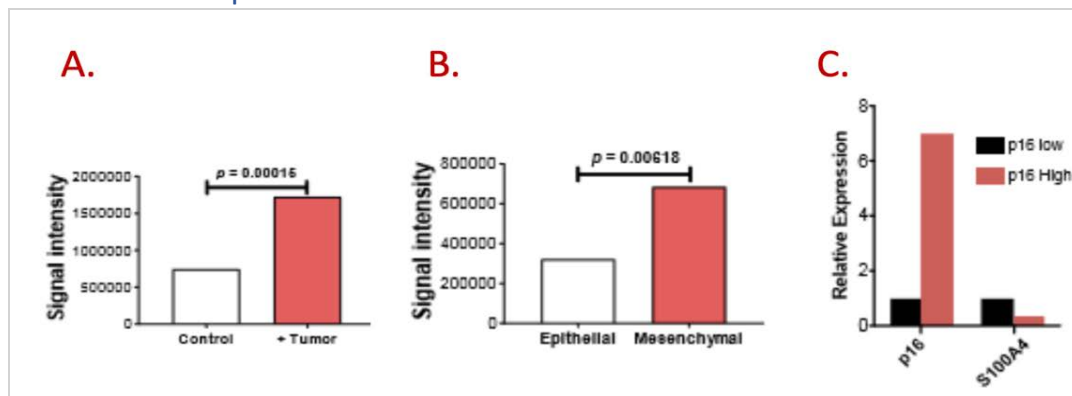


Figure 7 : S100A4 est impliqué dans la sénescence in vivo. L'expression de S100A4 a été analysée par protéomique : dans les métastases de la rate (A) par rapport à des animaux contrôles ; dans des patients atteints de mésothéliome pleural (B) mésenchymal ou épithélial ; dans des tumeurs du sein sénescence (p16high) ou non (p16low) (C).

En parallèle aux investigations fondamentales sur les cellules LS174T in vitro, des données d'analyses protéomique recueillies sur deux autres types de cancers tendent à démontrer l'implication de S100A4 dans le processus métastatique et l'acquisition d'un phénotype tumoral plus invasif. Premièrement, dans le mésothéliome malin (MM), sur un modèle expérimental de MM sarcomatoïde chez le rat, la colonisation métastatique de la rate par les cellules tumorales M5-T1 s'accompagne d'une augmentation d'expression de S100A4 par rapport au tissu sain (Fig. 10A). Deuxièmement, l'analyse protéomique de coupes histologiques de tumeurs des patients porteurs de MM pleural révèle une augmentation de S100A4 dans la forme mésenchymale par rapport à la forme épithéliale (Fig. 10B), sous entendant une implication de S100A4 dans le processus de transition épithélio-mésenchymateuse. Ces deux premiers résultats montrent que S100A4 semble lié à l'acquisition de capacités cellulaires plus agressives. Au contraire, chez des patientes atteintes de cancer du sein, la quantification par spectrométrie montre que l'expression de S100A4 est inversement corrélée à celle de p16INK4 (Fig. 10C), p16INK4 étant surexprimé lors de la sénescence pour maintenir un arrêt prolifératif. Ceci suggère que la sénescence s'accompagne in vivo d'une répression de S100A4 dans les cancers, mais que cette répression est levée lors de l'échappement. Le parallèle entre p16low et l'augmentation de S100A4 observé ici (Fig. 10C) est cohérent avec sa détection observée aussi bien dans les modèles expérimentaux de MM sarcomatoïdes chez le rat que sur les MM de patients [142].

B. S100A4 est impliqué dans l'émergence des cellules sénescentes in vitro

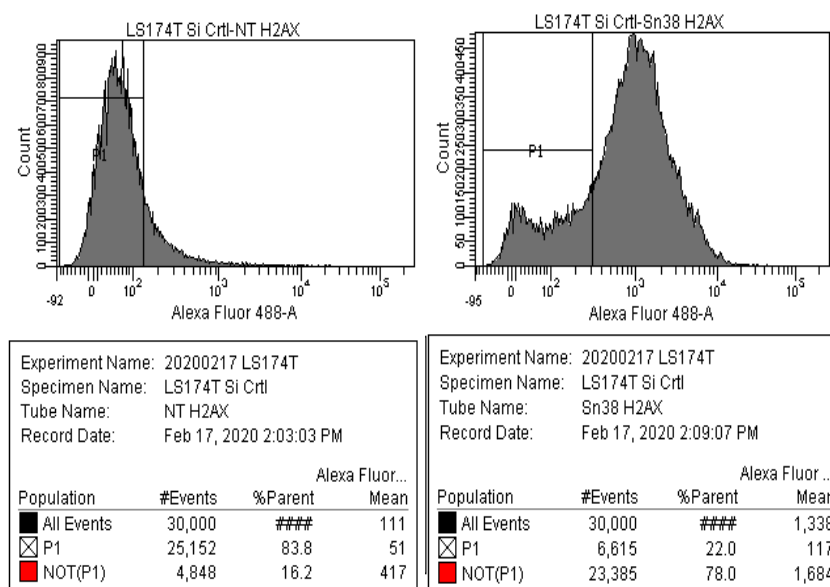


Figure 8 : Le traitement induit des dommages à l'ADN sur la lignée LS174T. Les histones gamma H2AX ont été quantifiées par spectrométrie de flux avant et après traitement des LS174T au Sn38 pendant 96h.

Le modèle de référence d'étude de l'échappement à la sénescence dans le laboratoire est basé sur le traitement chimiothérapeutique de cellules de cancer colorectales LS174T. Le traitement habituel du cancer colorectal est l'irinotécan, un inhibiteur des topoisomérases, qui nécessite d'être métabolisé par le foie avant d'exercer son effet. Nous utilisons donc directement le métabolite actif de l'irinotécan sur nos cellules, nommé Sn38. Dans un premier temps, nous avons souhaité vérifier que le Sn38 induisait bien des dommages à l'ADN sur les cellules de cancer colorectal LS174T, par l'apparition de l'histone gamma-H2AX en spectrométrie de flux. On peut voir que, sous traitement, ce décalage du marquage a bien lieu, témoignant de l'augmentation de la quantité d'histones gamma-H2AX. Le traitement induit donc bien des dommages à l'ADN (Fig. 7). L'équipe a par ailleurs validé que ces dommages induisaient ensuite l'entrée en sénescence en mettant en évidence d'autres caractéristiques telles que l'augmentation du marquage beta-galactosidase (Fig. 9B), ainsi que l'émergence suivant la procédure expérimentale décrite (Fig. 9A). Dans ce modèle d'échappement, l'expression de S100A4 augmente lors de la persistance avec l'apparition de cellules émergentes par rapport à la sénescence, suggérant que cette protéine a bien un lien l'émergence (Fig. C).

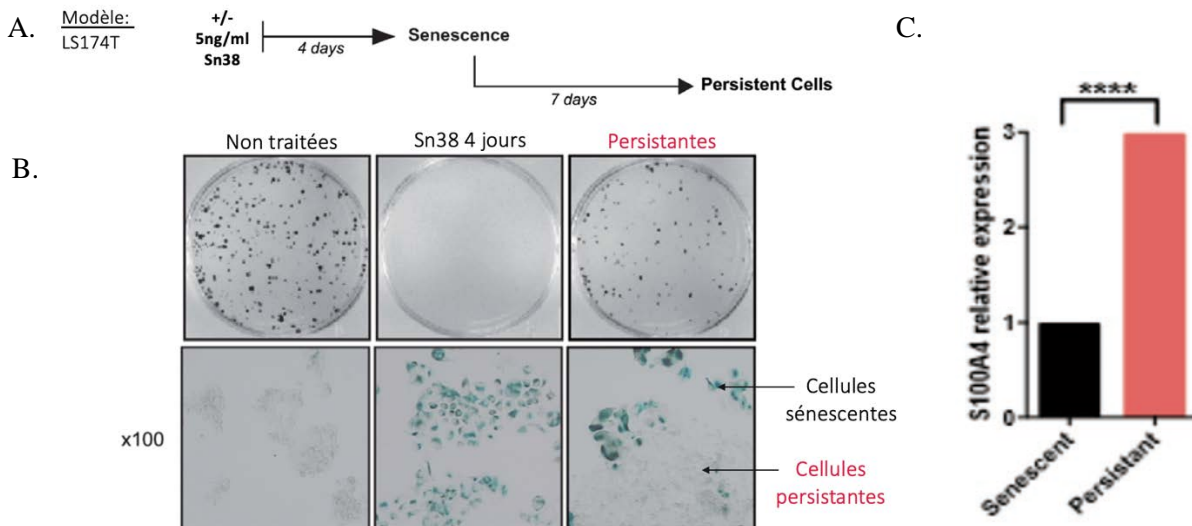


Figure 9 : S100A4 est exprimé par les cellules persistantes. Procédure expérimentale pour générer des cellules LS174T persistantes : après un traitement au sn38 (5 ng/ml, 96 heures), les cellules ont ensuite été lavées et stimulées avec du FBS à 10% pendant 7 à 10 jours pour rétablir la croissance cellulaire (A). La sénescence a été détectée par coloration à la SA- β -galactosidase. Le nombre de clones émergents a été évalué par coloration au cristal violet, et comparé aux cellules après traitement au Sn38 ou en l'absence de traitement. (B) L'expression de S100A4 a été quantifiée par spectrométrie de masse dans des cellules persistantes ou sénescentes, triées par spectrométrie de flux (C).

Nous avons ensuite vérifié le rôle de S100A4 dans l'échappement à la sénescence par sa déplétion par transfection de SiRNA (figure 9), dont l'efficacité a été vérifiée par Western Blot. Nous avons observé que l'expression réduite de S100A4 diminuait significativement l'échappement de la sénescence, d'environ 30%. Au contraire, lorsque les cellules ont été stimulées par la protéine recombinante S100A4 (1 μ g/ml) après l'induction de la sénescence, l'échappement du CIS est significativement augmenté (données non présentées).

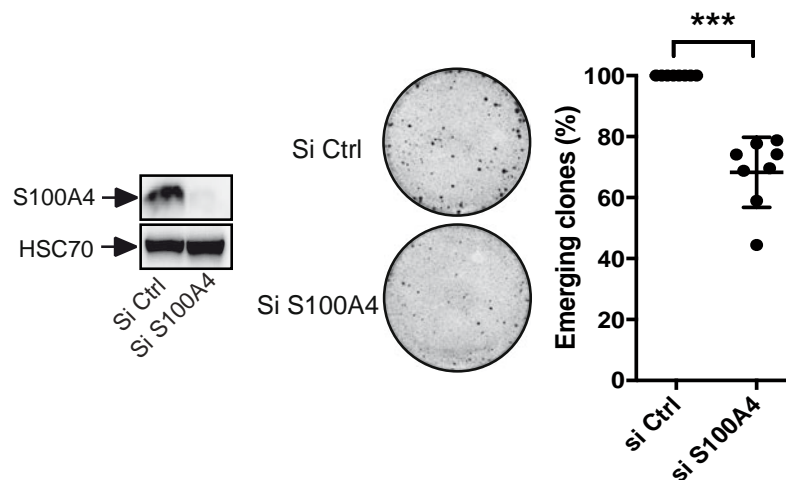


Figure 9 : S100A4 est nécessaire à l'émergence. L'inactivation de S100A4 par SiRNA a été vérifiée par Western blot. Le nombre de clones émergents LS174T a été analysé après l'inactivation de S100A4 (n=8), après coloration au cristal violet (Kolmogorov-Smirnov test, *** = $p < 0.001$).

C. S100A4 n'exerce pas son rôle via le suppresseur de tumeur p53

Nous avons donc émis l'hypothèse que l'émergence des cellules sénescentes pouvait reposer notamment sur S100A4 via la modification de la voie p53/p21. Afin de vérifier cette hypothèse, la lignée de cancer colorectal LS174T a été traitée par Sn38 pendant différents temps (24h et 96h) après inhibition ou non de l'expression de S100A4 par ARN interférence. L'expression de S100A4, de p21, de la forme totale de p53 ainsi que de sa forme phosphorylée a été analysée en Western Blot (Fig. 11 C, D). S100A4 n'a pas été détectée après un traitement de 24h, cependant lors du traitement de 96h, on peut voir que l'inhibition de S100A4 par SiRNA a bien fonctionné.

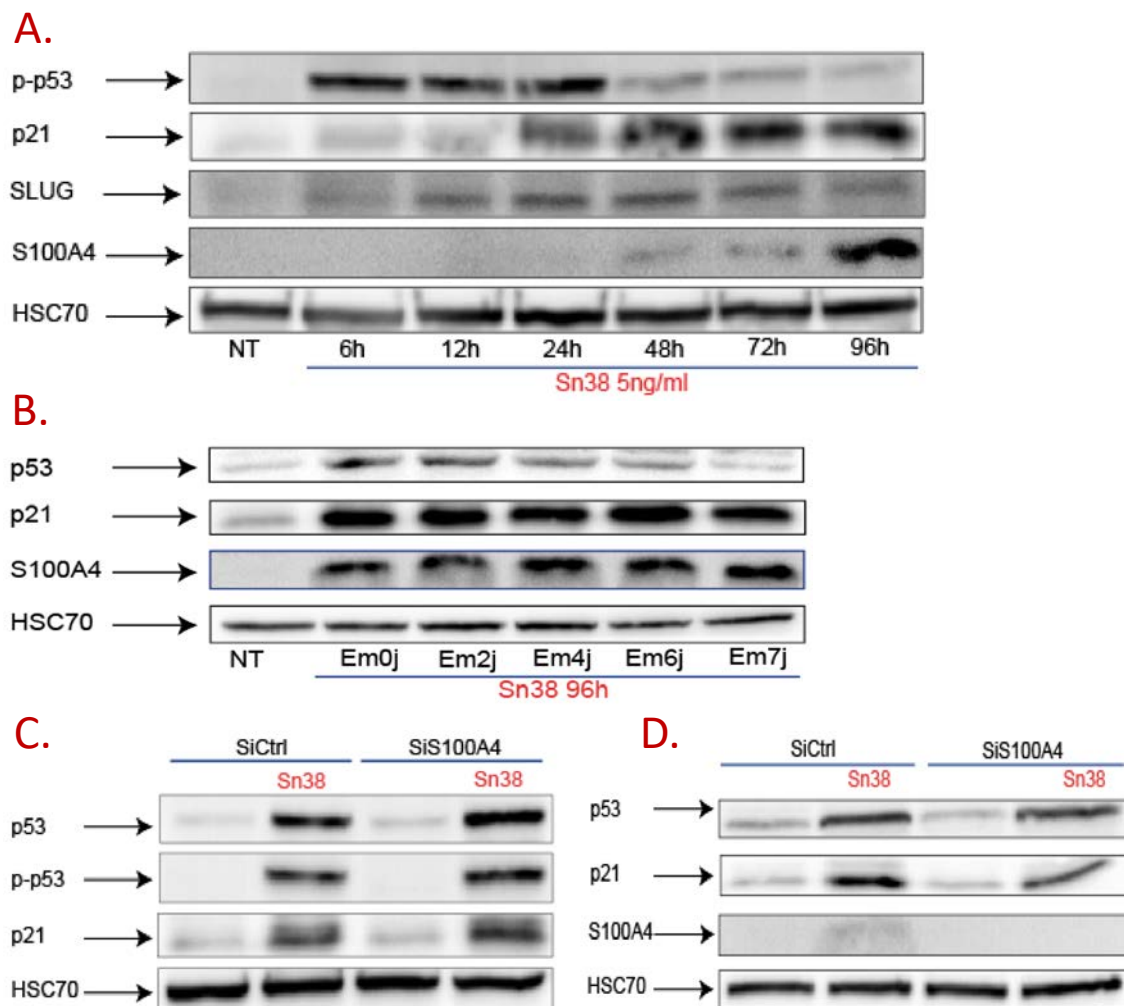


Figure 7: Le Sn38 induit l'expression tardive de S100A4 dans la lignée de cancer colorectal LS174T, et son expression est maintenue lors de l'émergence. Les cellules sont traitées pendant différents temps au Sn38 à 5ng/ml (A), ou bien traitées pendant 96h et incubées sans traitement jusqu'à 7 jours d'émergence (B). La lignée de cancer colorectal LS174T a été traitée pendant 24h (C) ou 96h (D) avec un inhibiteur de topoisomérases (Sn38 à 5ng/ml), après avoir inhibé ou non S100A4 par ARN interférence. L'expression de S100A4, p21 et p53 sont analysées par Western Blot. HSC70 sert de témoin de charge. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Sur la figure ci-dessus, nous observons que les formes de p53 et p21 sont fortement exprimés dans les conditions traitées, donc le traitement chimio thérapeutique a correctement fonctionné et bien induit l'arrêt du cycle cellulaire. Cependant, à 24h comme à 96h, on ne voit pas de modification de la quantité de protéines exprimées : notre hypothèse reposant sur le fait que S100A4 induit la dégradation de p53 pour permettre l'échappement à la sénescence ne semble pas être vérifiée par cette expérience de Western Blot. Il faudrait cependant faire ces mêmes expériences mais analyser l'ARNm de p53 et p21 par RTqPCR pour observer des différences plus sensibles.

Ainsi, afin de connaître le moment de l'induction de l'expression de S100A4, nous avons traité les cellules pendant des temps différents au SN38 et observé l'expression des différentes protéines en Western Blot (figure10A). Nous avons montré que S100A4 est induit dans nos cellules après 72h de traitement par Sn38, ce qui suggère que l'expression protéique de S100A4 est tardive suite à une agression chimio thérapeutique, contrairement à p53 et p21 qui sont exprimés dès les premières heures après le début du traitement. Nous avons réalisé la même expérience de cinétique lors de l'émergence (figure 10B) : après avoir traité les cellules pendant 96h au Sn38, nous avons changé le milieu de culture, et analysé l'expression protéique de p53, p21, S100A4 pendant les 7 premiers jours de l'émergence. On peut ainsi voir que l'expression protéique de S100A4 est forte et stable même après l'arrêt du traitement. Ces résultats confirment que l'expression de S100A4 est maintenue lors de l'émergence.

D. S100A4 permet-il l'émergence via les facteurs souches SLUG et Nanog ?

Notre première hypothèse n'ayant pas été validé, nous avons ensuite souhaité déterminer la relation entre S100A4 et les facteurs SLUG et Nanog, et leur rôle dans l'échappement à la sénescence.

On remarque que suite à l'inactivation de S100A4 par ARN interférence, l'expression de SLUG diminue. De même, l'expression de nanog est diminuée sous SiS100A4. Le rôle de S100A4 dans l'émergence pourrait donc passer par l'activation de facteurs souches, et donc par une dédifférenciation permettant la reprise d'une prolifération sous forme de cellules plus

agressives, mais nécessite d'être plus amplement exploré. De même, SLUG est un facteur de la TEM.

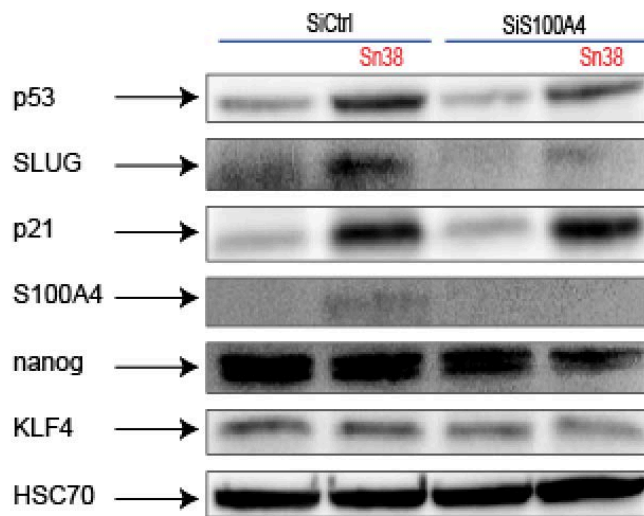


Figure 8: L'inhibition de S100A4 induit une diminution de l'expression de nanog et SLUG. Les cellules LS174T ont été traitées ou non par Sn38 pendant 96h après transfection d'un SiARN dirigé contre S100A4 ou un SiARN contrôle. Les protéines indiquées ont été analysées par western blot.

E. Nouveau modèle

Nos hypothèses n'ont donc pas pu être validées. Cependant, nous avons utilisé qu'un seul modèle tumoral in vitro, et il serait intéressant de tester nos hypothèses dans d'autres modèles.

C'est pourquoi nous avons démarré un projet en parallèle afin d'identifier des lignées cellulaires de mésothéliome de rat capables d'entrer en sénescence suite à un traitement avec des agents de dégradation de l'ADN afin d'en faire de nouveaux modèles d'étude, pour élargir notre vue et renforcer nos résultats préalables. Nous avons obtenu des résultats préliminaires pour deux lignées, qui ont montré des caractéristiques de sénescence suite au traitement par agent de dégradation de l'ADN, en l'occurrence le Cis-platine, couramment utilisé comme traitement de référence du mésothéliome malin [143].

Ces deux lignées (M5T2 et F5T1 – cf [142]) ont présenté un élargissement et un aplatissement de leur morphologie suite au traitement par le cis-platine, ainsi qu'un marquage beta-galactosidase (Fig 13 A, C). Grâce à une gamme de dose, nous avons pu observer qu'avec

l'augmentation de la concentration de traitement, le nombre de cellules survivantes diminuait mais elles étaient alors toutes positives au marquage. Ceci suggère que ces lignées entrent en sénescence suite au traitement de chimiothérapie. Il faudrait cependant rechercher plus de marqueur de cet état pour valider ces premiers résultats. Nous avons voulu ensuite déterminer la faculté d'émergence de ces deux lignées après 6 jours de traitement. Après un relargage dans un milieu sans cis platine pendant 10 jours, on observe l'apparition de clones émergent. Leur nombre est inversement corrélé à la dose utilisée (Fig. 13 B, D).

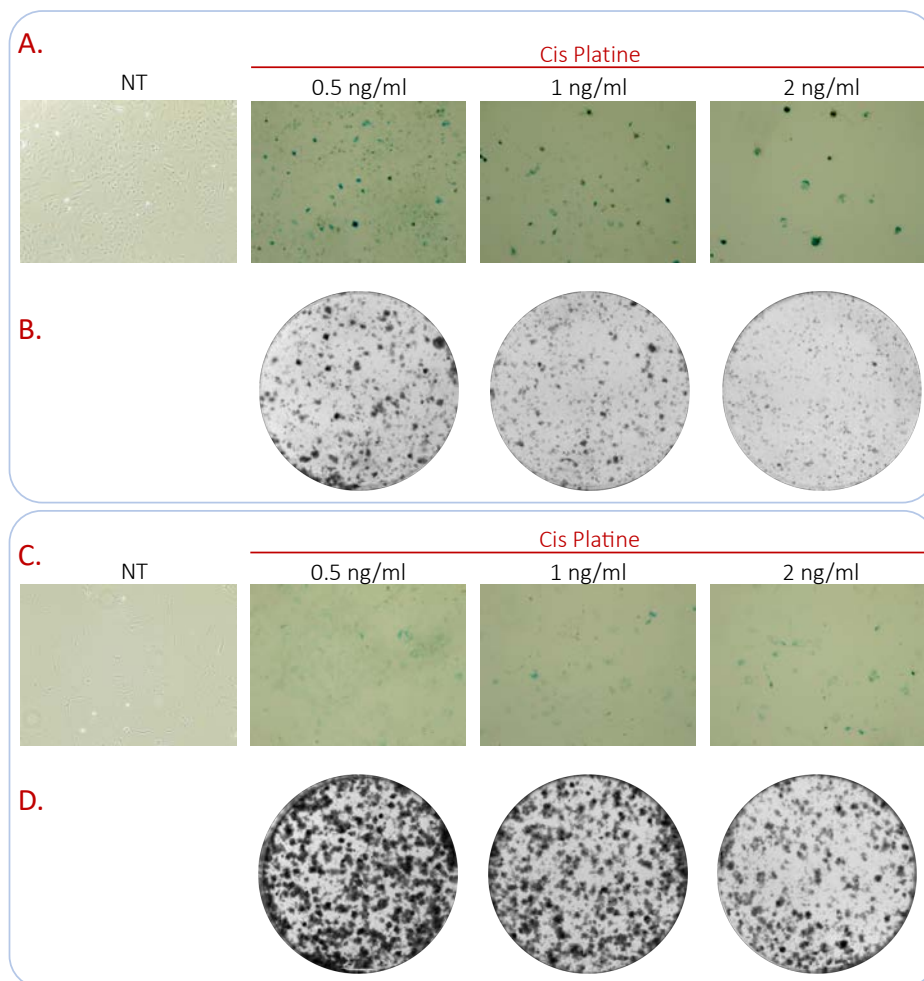


Figure 9: Identification de deux lignées de mésothéliome malin chez le rat F5T1 (A,B) et M5T2 (C,D). Après traitement au Cis platine aux doses indiquées, les lignées de rat ont été analysées par coloration bêta-galactosidase (A,C), et au cristal violet (B,D).

Pour conclure, il semblerait donc que ces deux lignées cellulaires soient des candidats prometteurs pour devenir de nouveaux modèles d'échappement à la sénescence.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Bien que la sénescence soit connue pour être un mécanisme de suppression tumorale bénéfique induit au cours des premières étapes de la transformation cellulaire, cette dernière peut également avoir un rôle néfaste. Comme pour l'apoptose, cette voie est inactivée au cours de la carcinogenèse et, par conséquent, la sénescence induite par la chimiothérapie est un état altéré et incomplet de la sénescence. Ainsi, contrairement à ce qui est admis, il est en fait difficile d'en définir un unique état.

Cette altération de la sénescence peut mener à l'échec thérapeutique : c'est donc un mécanisme d'adaptation qui favorise l'émergence de sous-populations cellulaires.

En effet, notre équipe a précédemment montré que les cellules tumorales colorectales ou mammaires peuvent échapper à la sénescence et émerger en tant que populations plus agressives [144], [98], [103], [102]. Certains facteurs, tels que la TSP1, sont nécessaires au maintien de la sénescence induite par la chimiothérapie, tandis que d'autres, tels que p21waf1 lorsqu'il est augmenté précocement, permettent l'échappement [144], [99]. L'équipe a récemment mis en évidence la présence d'une hétérogénéité au sein de ces cellules persistantes suite au traitement, avec des clones doués de division et d'autres demeurant sénescents [108]. D'autres expériences sont donc nécessaires pour déterminer si la sénescence est effectivement une voie adaptative générale à la chimiothérapie, ou si elle ne concerne qu'un sous-ensemble spécifique de cellules cancéreuses. Il est également nécessaire de déterminer sur quelles voies oncogéniques spécifiques elle repose.

Nous avons identifié S100A4 comme un nouveau facteur régulé à la hausse dans les cellules sénescents et dans les tumeurs plus agressives [145], [131]. Notre étude montre effectivement l'implication de cette protéine lors de l'échappement de la sénescence dans des modèles expérimentaux puisque l'on retrouve une diminution de l'émergence lors de son inactivation.

Nous avons pu relier cette diminution de l'émergence aux facteurs souches SLUG et nanog. SLUG est également un régulateur connu de la transition épithélio-mésenchymateuse,

promouvant l'invasion et la motilité des cellules cancéreuses dans lesquelles il est régulé à la hausse [146]. L'échappement à la sénescence pourrait ainsi reposer entre autres sur l'induction d'une TEM permettant l'émergence et l'augmentation de l'agressivité cellulaire, via l'activation préalable de S100A4. Ces résultats sont cohérents avec nos précédentes études montrant que l'échappement à la sénescence conduit à la dédifférenciation cellulaire ainsi qu'à l'EMT [98]. De plus, une récente étude a mis en évidence le lien entre S100A4 et la transition épithélio-mésenchymateuse [134]. En effet, S100A4 a été identifié comme un nouveau biomarqueur des cellules souches de glioblastomes (GSC), favorisant la TEM. Les cellules enrichies en S100A4 dans les gliomes sont situées dans des niches périvasculaires où se situent généralement les GSC et leur ablation sélective a été suffisante pour bloquer la croissance des tumeurs in vitro et in vivo. S100A4 serait ainsi un régulateur en amont des régulateurs principaux de l'EMT (SLUG et ZEB) dans les glioblastomes.

Nos résultats soulèvent également la question de la régulation de p53 par S100A4 dans le contexte de la sénescence. En effet, contrairement à ce que nous avons pu voir dans la littérature (Grigorian et al., 2001), nous n'avons pas pu confirmer la diminution de p53 suite à l'inactivation de S100A4 : aucune modification de son expression -ou de sa cible p21- n'a pu être mise en évidence. Cependant, il serait peut-être plus judicieux de réitérer ces expériences en ajoutant la protéine recombinante S100A4 à notre modèle, plutôt qu'en l'inactivant, ou bien de rechercher une colocalisation. Le rôle de S100A4 dans ce contexte pourrait également ne passer que via son activité extracellulaire [128]. Comme l'émergence est constituée d'une population hétérogène, la population sénescence pourrait permettre de soutenir et de promouvoir les clones en division via une sécrétion protéique. En effet, les cellules sénescences communiquent avec les cellules voisines par le biais du PSAS. S100A4 est connu pour ces rôles extracellulaires, et bien qu'on ne connaisse pas son mécanisme de sécrétion ni la totalité de ces récepteurs, il pourrait être un membre du PSAS produit par les cellules persistantes. Il est donc nécessaire de vérifier la présence de S100A4 dans le sécrétome de ces cellules afin de vérifier qu'il constitue bien un nouveau membre du PSAS.

Ces résultats ont été obtenus sur des lignées cellulaires de cancer colorectal, cependant ce modèle peut être altéré, ou bien peu invasif (or S100A4 est retrouvé fortement exprimé dans les cancers les plus invasifs [131]), ou encore moins sujet à la transition

épithélio-mésenchymateuse. Il serait donc intéressant de réaliser ces mêmes expériences sur un autre modèle, ainsi que sur des coupes de tumeurs de patients afin de voir si l'induction de S100A4 sous inhibiteurs des topoisomérases est retrouvée. De plus, le laboratoire dispose de modèles organoïdes créés à partir de tumeurs de patients porteurs de cancers du sein de l'Institut de Cancérologie de l'Ouest, cela pourrait donc être intéressant de réaliser des analyses d'immunohistochimie avant traitement, pendant le traitement ou à la rechute après traitement afin de connaître l'implication et la localisation de S100A4 au niveau des tumeurs.

Également, la déplétion de S100A4 par des siARN pourrait induire une sensibilisation des cellules cancéreuses [147] aux inhibiteurs des topoisomérases, en induisant l'apoptose par exemple. Après inhibition de S100A4, on retrouve une diminution de l'émergence : cette diminution pourrait être en faveur d'une augmentation de l'apoptose des cellules traitées. De plus, comme S100A4 semble moduler l'entrée en apoptose [133], sa perte pourrait permettre l'augmentation des réponses apoptotiques par rapport à l'entrée en sénescence. Or, nous avons déjà mis en évidence que l'émergence des cellules pouvait être diminuée lorsqu'on favorise une réponse apoptotique plutôt que sénescence par l'inhibition d'Akt [103]. Il serait donc intéressant de tester cette hypothèse et de vérifier si les marqueurs de l'apoptose sont augmentés lors de l'inhibition de S100A4 dans ce modèle. Ainsi, bien que son rôle ne soit pas encore clairement défini ici, S100A4 pourrait avoir une incidence sur la sensibilité et la réponse des cellules de cancer colorectal au traitement, ce qui pourrait être pertinent en clinique. Cette protéine pourrait donc devenir une nouvelle cible thérapeutique pour prévenir la résistance au traitement dans certains cancers. D'autres expériences sont nécessaires pour déterminer l'avantage de cibler S100A4 dans des sous-types de cancer spécifiques qui peuvent répondre différemment aux traitements génotoxiques, en fonction du niveau de l'induction de la sénescence et de l'émergence.

S100A4 est peu exprimé chez le sujet sain, mais nous avons montré qu'il était surexprimé dans plusieurs cancers pendant le traitement ou à la rechute, témoignant de leur agressivité et de leurs capacités d'invasion, il constituerait donc un bon marqueur. À ce jour, le diagnostic, le pronostic et le traitement de certains cancers agressifs ou résistants aux traitements classiques sont problématiques : il y a un besoin urgent de trouver de nouveaux biomarqueurs prédictifs fiables, afin de mettre en place des concepts thérapeutiques

personnalisés. S100A4 étant un marqueur de mauvais pronostic déjà connu dans plusieurs cancers [136], [139], [141], il serait intéressant, suite à notre étude, de pouvoir relier son augmentation à l'échec de la chimiothérapie chez le patient. D'autres expériences seraient nécessaires pour vérifier cette hypothèse in vivo pour déterminer si la détection de S100A4 peut être utile pour prédire l'apparition d'un cancer colorectal répondant à la chimiothérapie par l'entrée en sénescence, alors néfaste. S100A4 pourrait ainsi avoir un rôle en tant que biomarqueur prédictif dans la thérapie aux agents de dégradation de l'ADN.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] O. M. Sieber, K. Heinemann, et I. P. M. Tomlinson, « Genomic instability — the engine of tumorigenesis? », *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, n° 9, p. 701-708, sept. 2003, doi: 10.1038/nrc1170.
- [2] D. Hanahan et R. A. Weinberg, « Hallmarks of Cancer: The Next Generation », *Cell*, vol. 144, n° 5, p. 646-674, mars 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [3] M. Di Domenico et A. Giordano, « Signal transduction growth factors: the effective governance of transcription and cellular adhesion in cancer invasion », *Oncotarget*, vol. 8, n° 22, p. 36869-36884, mai 2017, doi: 10.18632/oncotarget.16300.
- [4] S. A. Aaronson, « Growth factors and cancer », *Science*, vol. 254, n° 5035, p. 1146-1153, nov. 1991, doi: 10.1126/science.1659742.
- [5] R. A. Weinberg, « The retinoblastoma protein and cell cycle control », *Cell*, vol. 81, n° 3, p. 323-330, mai 1995, doi: 10.1016/0092-8674(95)90385-2.
- [6] D. Hanahan et R. A. Weinberg, « The Hallmarks of Cancer », *Cell*, vol. 100, n° 1, p. 57-70, janv. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- [7] H. Davies *et al.*, « Mutations of the BRAF gene in human cancer », *Nature*, vol. 417, n° 6892, p. 949-954, juin 2002, doi: 10.1038/nature00766.
- [8] T. M. Bauer, M. R. Patel, et J. R. Infante, « Targeting PI3 kinase in cancer », *Pharmacol. Ther.*, vol. 146, p. 53-60, févr. 2015, doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.09.006.
- [9] S. W. Lowe, E. Cepero, et G. Evan, « Intrinsic tumour suppression », *Nature*, vol. 432, n° 7015, p. 307-315, nov. 2004, doi: 10.1038/nature03098.
- [10] J. Plati, O. Bucur, et R. Khosravi-Far, « Dysregulation of Apoptotic Signaling in Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities », *J Cell Biochem*, vol. 104, n° 4, p. 1124-1149, juill. 2008, doi: 10.1002/jcb.21707.
- [11] H. Gonzalez, C. Hagerling, et Z. Werb, « Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression », *Genes Dev.*, vol. 32, n° 19-20, p. 1267-1284, 01 2018, doi: 10.1101/gad.314617.118.
- [12] M. W. L. Teng, J. Galon, W.-H. Fridman, et M. J. Smyth, « From mice to humans: developments in cancer immunoediting », *J. Clin. Invest.*, vol. 125, n° 9, p. 3338-3346, sept. 2015, doi: 10.1172/JCI80004.
- [13] F. Vahidian, P. H. G. Duijf, E. Safarzadeh, A. Derakhshani, A. Baghbanzadeh, et B. Baradaran, « Interactions between cancer stem cells, immune system and some environmental components: Friends or foes? », *Immunol. Lett.*, vol. 208, p. 19-29, 2019, doi: 10.1016/j.imlet.2019.03.004.
- [14] C. Xia, Z. Braunstein, A. C. Toomey, J. Zhong, et X. Rao, « S100 Proteins As an Important Regulator of Macrophage Inflammation », *Frontiers in Immunology*, vol. 8, janv. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2017.01908.
- [15] L. I. Prieto et D. J. Baker, « Cellular Senescence and the Immune System in Cancer », *GER*, vol. 65, n° 5, p. 505-512, 2019, doi: 10.1159/000500683.
- [16] J. Y. J. Wang, « Cell Death Response to DNA Damage », *Yale J Biol Med*, vol. 92, n° 4, p. 771-779, 2019.
- [17] N. A. Lobo, Y. Shimono, D. Qian, et M. F. Clarke, « The biology of cancer stem cells », *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 23, p. 675-699, 2007, doi: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104154.
- [18] T. Shibue et R. A. Weinberg, « EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications », *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 14, n° 10, p. 611-629, oct. 2017, doi: 10.1038/nrclinonc.2017.44.
- [19] F. de Sousa E Melo et L. Vermeulen, « Wnt Signaling in Cancer Stem Cell Biology »,

Cancers (Basel), vol. 8, n° 7, juin 2016, doi: 10.3390/cancers8070060.

- [20] S. A. Mani *et al.*, « The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells », *Cell*, vol. 133, n° 4, p. 704-715, mai 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027.
- [21] R. A. Burrell, N. McGranahan, J. Bartek, et C. Swanton, « The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution », *Nature*, vol. 501, n° 7467, p. 338-345, sept. 2013, doi: 10.1038/nature12625.
- [22] A. Kreso et J. E. Dick, « Evolution of the cancer stem cell model », *Cell Stem Cell*, vol. 14, n° 3, p. 275-291, mars 2014, doi: 10.1016/j.stem.2014.02.006.
- [23] A. Puisieux et S. Ansieau, « La dissémination précoce de cellules métastatiques: Une nouvelle donnée aux conséquences majeures ! », *médecine/sciences*, vol. 25, n° 1, p. 28-30, janv. 2009, doi: 10.1051/medsci/200925128.
- [24] E. D. Hay, « The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it », *Dev. Dyn.*, vol. 233, n° 3, p. 706-720, juill. 2005, doi: 10.1002/dvdy.20345.
- [25] H. Hugo *et al.*, « Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression », *J. Cell. Physiol.*, vol. 213, n° 2, p. 374-383, nov. 2007, doi: 10.1002/jcp.21223.
- [26] J. Yang et R. A. Weinberg, « Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis », *Dev. Cell*, vol. 14, n° 6, p. 818-829, juin 2008, doi: 10.1016/j.devcel.2008.05.009.
- [27] Y. I. Petrova, L. Schecterson, et B. M. Gumbiner, « Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer », *Mol. Biol. Cell*, vol. 27, n° 21, p. 3233-3244, 01 2016, doi: 10.1091/mbc.E16-01-0058.
- [28] E. Sánchez-Tilló *et al.*, « EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 69, n° 20, p. 3429-3456, oct. 2012, doi: 10.1007/s00018-012-1122-2.
- [29] S. M. Frisch et R. A. Screaton, « Anoikis mechanisms », *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 13, n° 5, p. 555-562, oct. 2001, doi: 10.1016/s0955-0674(00)00251-9.
- [30] R. N. Kaplan *et al.*, « VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche », *Nature*, vol. 438, n° 7069, p. 820-827, déc. 2005, doi: 10.1038/nature04186.
- [31] Y. Liu et X. Cao, « Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche », *Cancer Cell*, vol. 30, n° 5, p. 668-681, nov. 2016, doi: 10.1016/j.ccell.2016.09.011.
- [32] K. J. Luzzi *et al.*, « Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases », *Am. J. Pathol.*, vol. 153, n° 3, p. 865-873, sept. 1998, doi: 10.1016/S0002-9440(10)65628-3.
- [33] B. Quesnel, « « Je te tiens, tu me tiens »... Dormance tumorale : un équilibre instable ? », *Med Sci (Paris)*, vol. 24, n° 6-7, p. 575-576, juin 2008, doi: 10.1051/medsci/20082467575.
- [34] I. Malanchi *et al.*, « Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization », *Nature*, vol. 481, n° 7379, p. 85-89, déc. 2011, doi: 10.1038/nature10694.
- [35] V. T. DeVita et E. Chu, « A history of cancer chemotherapy », *Cancer Res.*, vol. 68, n° 21, p. 8643-8653, nov. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6611.
- [36] P. V. Bernardes-Génisson, « Pharmacologie des médicaments anticancéreux - Faculté des sciences pharmaceutiques Toulouse », *Faculté de Pharmacie Toulouse*, p. 50.
- [37] M. Mijit, V. Caracciolo, A. Melillo, F. Amicarelli, et A. Giordano, « Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence », *Biomolecules*, vol. 10, n° 3, mars 2020, doi: 10.3390/biom10030420.

- [38] A. C. Vitor, P. Huertas, G. Legube, et S. F. de Almeida, « Studying DNA Double-Strand Break Repair: An Ever-Growing Toolbox », *Front Mol Biosci*, vol. 7, p. 24, 2020, doi: 10.3389/fmolb.2020.00024.
- [39] B. B. Zhou et S. J. Elledge, « The DNA damage response: putting checkpoints in perspective », *Nature*, vol. 408, n° 6811, p. 433-439, nov. 2000, doi: 10.1038/35044005.
- [40] S. Burma, B. P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa, et D. J. Chen, « ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks », *J. Biol. Chem.*, vol. 276, n° 45, p. 42462-42467, nov. 2001, doi: 10.1074/jbc.C100466200.
- [41] L. Shi et P. Oberdoerffer, « Chromatin dynamics in DNA double-strand break repair », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1819, n° 7, p. 811-819, juill. 2012, doi: 10.1016/j.bbagr.2012.01.002.
- [42] H. H. Y. Chang, N. R. Pannunzio, N. Adachi, et M. R. Lieber, « Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 18, n° 8, p. 495-506, 2017, doi: 10.1038/nrm.2017.48.
- [43] J. F. Kerr, A. H. Wyllie, et A. R. Currie, « Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics », *Br. J. Cancer*, vol. 26, n° 4, p. 239-257, août 1972, doi: 10.1038/bjc.1972.33.
- [44] S. Yogosawa et K. Yoshida, « Tumor suppressive role for kinases phosphorylating p53 in DNA damage-induced apoptosis », *Cancer Sci*, vol. 109, n° 11, p. 3376-3382, nov. 2018, doi: 10.1111/cas.13792.
- [45] M. Schuler et D. R. Green, « Mechanisms of p53-dependent apoptosis », *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 29, n° Pt 6, p. 684-688, nov. 2001, doi: 10.1042/0300-5127:0290684.
- [46] B. G. Childs, D. J. Baker, J. L. Kirkland, J. Campisi, et J. M. van Deursen, « Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? », *EMBO reports*, vol. 15, n° 11, p. 1139-1153, nov. 2014, doi: 10.15252/embr.201439245.
- [47] N. G. Gottardo et A. Gajjar, « Chemotherapy for malignant brain tumors of childhood », *J. Child Neurol.*, vol. 23, n° 10, p. 1149-1159, oct. 2008, doi: 10.1177/0883073808321765.
- [48] T. Saleh, L. Tyutyunyk-Massey, et D. A. Gewirtz, « Tumor Cell Escape from Therapy-Induced Senescence as a Model of Disease Recurrence after Dormancy », *Cancer Research*, vol. 79, n° 6, p. 1044-1046, mars 2019, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3437.
- [49] L. Hayflick et P. S. Moorhead, « The serial cultivation of human diploid cell strains », *Experimental Cell Research*, vol. 25, n° 3, p. 585-621, déc. 1961, doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
- [50] D. Muñoz-Espín et M. Serrano, « Cellular senescence: from physiology to pathology », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, n° 7, p. 482-496, juill. 2014, doi: 10.1038/nrm3823.
- [51] S. He et N. E. Sharpless, « Senescence in Health and Disease », *Cell*, vol. 169, n° 6, p. 1000-1011, juin 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.05.015.
- [52] A. Krtolica, S. Parrinello, S. Lockett, P.-Y. Desprez, et J. Campisi, « Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, n° 21, p. 12072-12077, oct. 2001, doi: 10.1073/pnas.211053698.
- [53] M. Y. Terzi, M. Izmirli, et B. Gogebakan, « The cell fate: senescence or quiescence », *Mol. Biol. Rep.*, vol. 43, n° 11, p. 1213-1220, nov. 2016, doi: 10.1007/s11033-016-4065-0.
- [54] L. Hayflick, « The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains », *Experimental Cell Research*, vol. 37, n° 3, p. 614-636, mars 1965, doi: 10.1016/0014-4827(65)90211-9.
- [55] A. G. Bodnar *et al.*, « Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells », *Science*, vol. 279, n° 5349, p. 349-352, janv. 1998, doi:

10.1126/science.279.5349.349.

- [56] F. Rodier *et al.*, « Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion », *Nature Cell Biology*, vol. 11, n° 8, p. 973-979, août 2009, doi: 10.1038/ncb1909.
- [57] J. Campisi et F. d'Adda di Fagagna, « Cellular senescence: when bad things happen to good cells », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, n° 9, p. 729-740, sept. 2007, doi: 10.1038/nrm2233.
- [58] F. Rodier et J. Campisi, « Four faces of cellular senescence », *The Journal of Cell Biology*, vol. 192, n° 4, p. 547-556, févr. 2011, doi: 10.1083/jcb.201009094.
- [59] A. Hernandez-Segura, J. Nehme, et M. Demaria, « Hallmarks of Cellular Senescence », *Trends Cell Biol.*, vol. 28, n° 6, p. 436-453, 2018, doi: 10.1016/j.tcb.2018.02.001.
- [60] K. M. LaPak et C. E. Burd, « The molecular balancing act of p16(INK4a) in cancer and aging », *Mol. Cancer Res.*, vol. 12, n° 2, p. 167-183, févr. 2014, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0350.
- [61] B. Y. Lee *et al.*, « Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase », *Aging Cell*, vol. 5, n° 2, p. 187-195, avr. 2006, doi: 10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x.
- [62] M. Narita *et al.*, « Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence », *Cell*, vol. 113, n° 6, p. 703-716, juin 2003, doi: 10.1016/s0092-8674(03)00401-x.
- [63] K. M. Aird et R. Zhang, « Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF) », *Methods Mol. Biol.*, vol. 965, p. 185-196, 2013, doi: 10.1007/978-1-62703-239-1_12.
- [64] F. d'Adda di Fagagna *et al.*, « A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence », *Nature*, vol. 426, n° 6963, p. 194-198, nov. 2003, doi: 10.1038/nature02118.
- [65] F. Rodier *et al.*, « DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion », *J Cell Sci*, vol. 124, n° 1, p. 68-81, janv. 2011, doi: 10.1242/jcs.071340.
- [66] A. Ivanov *et al.*, « Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence », *J Cell Biol*, vol. 202, n° 1, p. 129-143, juill. 2013, doi: 10.1083/jcb.201212110.
- [67] Z. Dou *et al.*, « Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer », *Nature*, vol. 550, n° 7676, p. 402-406, oct. 2017, doi: 10.1038/nature24050.
- [68] J.-P. Coppé *et al.*, « Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor », *PLoS Biol.*, vol. 6, n° 12, p. 2853-2868, déc. 2008, doi: 10.1371/journal.pbio.0060301.
- [69] N. Basisty *et al.*, « A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development », *PLoS Biol.*, vol. 18, n° 1, p. e3000599, janv. 2020, doi: 10.1371/journal.pbio.3000599.
- [70] J. C. Acosta *et al.*, « Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence », *Cell*, vol. 133, n° 6, p. 1006-1018, juin 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.03.038.
- [71] T. Kuilman *et al.*, « Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network », *Cell*, vol. 133, n° 6, p. 1019-1031, juin 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.03.039.
- [72] C. Bavik, I. Coleman, J. P. Dean, B. Knudsen, S. Plymate, et P. S. Nelson, « The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms », *Cancer Res.*, vol. 66, n° 2, p. 794-802, janv. 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1716.
- [73] J. Neves, M. Demaria, J. Campisi, et H. Jasper, « Of flies, mice, and men:

- evolutionarily conserved tissue damage responses and aging », *Dev. Cell*, vol. 32, n° 1, p. 9-18, janv. 2015, doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.028.
- [74] S. Da Silva-Álvarez *et al.*, « Cell senescence contributes to tissue regeneration in zebrafish », *Aging Cell*, vol. 19, n° 1, p. e13052, janv. 2020, doi: 10.1111/accel.13052.
- [75] D. Muñoz-Espín *et al.*, « Programmed cell senescence during mammalian embryonic development », *Cell*, vol. 155, n° 5, p. 1104-1118, nov. 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.10.019.
- [76] A. Pérez-Garijo et H. Steller, « The benefits of aging: cellular senescence in normal development », *EMBO J.*, vol. 33, n° 2, p. 99-100, janv. 2014, doi: 10.1002/embj.201387401.
- [77] H. N. Wilkinson et M. J. Hardman, « Wound senescence: A functional link between diabetes and ageing? », *Exp. Dermatol.*, févr. 2020, doi: 10.1111/exd.14082.
- [78] M. H. Yun, « Cellular senescence in tissue repair: every cloud has a silver lining », *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 62, n° 6-7-8, p. 591-604, 2018, doi: 10.1387/ijdb.180081my.
- [79] V. Krizhanovsky *et al.*, « Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis », *Cell*, vol. 134, n° 4, p. 657-667, août 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.06.049.
- [80] M. Demaria *et al.*, « An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA », *Dev. Cell*, vol. 31, n° 6, p. 722-733, déc. 2014, doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.012.
- [81] J. Campisi, « Aging, cellular senescence, and cancer », *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 75, p. 685-705, 2013, doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183653.
- [82] J. M. van Deursen, « The role of senescent cells in ageing », *Nature*, vol. 509, n° 7501, p. 439-446, mai 2014, doi: 10.1038/nature13193.
- [83] R. Shmulevich et V. Krizhanovsky, « Cell Senescence, DNA Damage and Metabolism », *Antioxidants & Redox Signaling*, mars 2020, doi: 10.1089/ars.2020.8043.
- [84] I. B. Roninson, « Tumor cell senescence in cancer treatment », *Cancer Res.*, vol. 63, n° 11, p. 2705-2715, juin 2003.
- [85] M. Braig et C. A. Schmitt, « Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development », *Cancer Res.*, vol. 66, n° 6, p. 2881-2884, mars 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4006.
- [86] J. Campisi, « Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors », *Cell*, vol. 120, n° 4, p. 513-522, févr. 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.02.003.
- [87] J. Bartkova *et al.*, « DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis », *Nature*, vol. 434, n° 7035, p. 864-870, avr. 2005, doi: 10.1038/nature03482.
- [88] M. Collado et M. Serrano, « Senescence in tumours: evidence from mice and humans », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 10, n° 1, p. 51-57, janv. 2010, doi: 10.1038/nrc2772.
- [89] J. Mikuła-Pietrasik *et al.*, « Senescent peritoneal mesothelium creates a niche for ovarian cancer metastases », *Cell Death Dis*, vol. 7, n° 12, p. e2565, 29 2016, doi: 10.1038/cddis.2016.417.
- [90] J.-P. Coppé, P.-Y. Desprez, A. Krtolica, et J. Campisi, « The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression », *Annu Rev Pathol*, vol. 5, p. 99-118, 2010, doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102144.
- [91] D. Liu et P. J. Hornsby, « Senescent Human Fibroblasts Increase the Early Growth of Xenograft Tumors via Matrix Metalloproteinase Secretion », *Cancer Res*, vol. 67, n° 7, p. 3117-3126, avr. 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3452.
- [92] D. Bharadwaj et M. Mandal, « Senescence in polyploid giant cancer cells: A road that leads to chemoresistance », *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 52, p. 68-75, avr. 2020, doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.11.002.
- [93] Z. Dou et S. L. Berger, « Senescence Elicits Stemness: A Surprising Mechanism for Cancer Relapse », *Cell Metabolism*, vol. 27, n° 4, p. 710-711, avr. 2018, doi: 10.1016/j.cmet.2018.03.009.

- [94] R.-M. Laberge *et al.*, « MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation », *Nature Cell Biology*, vol. 17, n° 8, Art. n° 8, août 2015, doi: 10.1038/ncb3195.
- [95] C. M. Beauséjour *et al.*, « Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways », *EMBO J*, vol. 22, n° 16, p. 4212-4222, août 2003, doi: 10.1093/emboj/cdg417.
- [96] R. S. Roberson, S. J. Kussick, E. Vallieres, S.-Y. J. Chen, et D. Y. Wu, « Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers », *Cancer Res.*, vol. 65, n° 7, p. 2795-2803, avr. 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1270.
- [97] L. C. W. Vredevelde *et al.*, « Abrogation of BRAFV600E-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis », *Genes & Development*, vol. 26, n° 10, p. 1055-1069, mai 2012, doi: 10.1101/gad.187252.112.
- [98] S. de Carné Trécesson *et al.*, « Escape from p21-mediated Oncogene-induced Senescence Leads to Cell Dedifferentiation and Dependence on Anti-apoptotic Bcl-xL and MCL1 Proteins », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, n° 15, p. 12825-12838, avr. 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.186437.
- [99] J. Guillon *et al.*, « Regulation of senescence escape by TSP1 and CD47 following chemotherapy treatment », *Cell Death & Disease*, vol. 10, n° 3, mars 2019, doi: 10.1038/s41419-019-1406-7.
- [100] M. Hoare *et al.*, « NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence », *Nat Cell Biol*, vol. 18, n° 9, p. 979-992, sept. 2016, doi: 10.1038/ncb3397.
- [101] M. Le Duff *et al.*, « Regulation of senescence escape by the cdk4–EZH2–AP2M1 pathway in response to chemotherapy », *Cell Death & Disease*, vol. 9, n° 2, févr. 2018, doi: 10.1038/s41419-017-0209-y.
- [102] B. Jonchère *et al.*, « Irinotecan treatment and senescence failure promote the emergence of more transformed and invasive cells that depend on anti-apoptotic Mcl-1 », *Oncotarget*, vol. 6, n° 1, janv. 2015, doi: 10.18632/oncotarget.2774.
- [103] A. Vétillard *et al.*, « Akt inhibition improves irinotecan treatment and prevents cell emergence by switching the senescence response to apoptosis », *Oncotarget*, vol. 6, n° 41, déc. 2015, doi: 10.18632/oncotarget.6126.
- [104] J. P. Medema, « Escape from senescence boosts tumour growth », *Nature*, vol. 553, n° 7686, p. 37-38, 04 2018, doi: 10.1038/d41586-017-08652-0.
- [105] M. Milanovic *et al.*, « Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness », *Nature*, vol. 553, n° 7686, p. 96-100, janv. 2018, doi: 10.1038/nature25167.
- [106] P. Galanos *et al.*, « Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing », *Nat. Cell Biol.*, vol. 18, n° 7, p. 777-789, 2016, doi: 10.1038/ncb3378.
- [107] Y. He *et al.*, « Inhibition of USP7 activity selectively eliminates senescent cells in part via restoration of p53 activity », *Aging Cell*, vol. 19, n° 3, p. e13117, mars 2020, doi: 10.1111/acel.13117.
- [108] C. Petit *et al.*, « Proteomics Approaches to Define Senescence Heterogeneity and Chemotherapy Response », *PROTEOMICS*, vol. 19, n° 21-22, p. 1800447, nov. 2019, doi: 10.1002/pmic.201800447.
- [109] B. W. Moore, « A soluble protein characteristic of the nervous system », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 19, n° 6, p. 739-744, juin 1965, doi: 10.1016/0006-291x(65)90320-7.
- [110] G. Fritz, H. M. Botelho, L. A. Morozova-Roche, et C. M. Gomes, « Natural and amyloid self-assembly of S100 proteins: structural basis of functional diversity: Natural and amyloid self-assembly of S100 proteins », *FEBS Journal*, vol. 277, n° 22, p. 4578-4590, nov.

- 2010, doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07887.x.
- [111] R. Donato *et al.*, « Functions of S100 Proteins », p. 59, 2013.
- [112] J. L. Beaudoux, C. Soler, et M. J. Foglietti, « Physiopathologie de la protéine S-100 β : intérêt de son dosage en biologie clinique », *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, vol. 17, n° 5, p. 280-286, oct. 2002, doi: 10.1016/S0923-2532(02)01210-3.
- [113] M. Schneider, J. L. Hansen, et S. P. Sheikh, « S100A4: a common mediator of epithelial-mesenchymal transition, fibrosis and regeneration in diseases? », *J. Mol. Med.*, vol. 86, n° 5, p. 507-522, mai 2008, doi: 10.1007/s00109-007-0301-3.
- [114] A. Ebralidze *et al.*, « Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺-binding protein family. », *Genes & Development*, vol. 3, n° 7, p. 1086-1093, juill. 1989, doi: 10.1101/gad.3.7.1086.
- [115] S. C. Garrett, K. M. Varney, D. J. Weber, et A. R. Bresnick, « S100A4, a Mediator of Metastasis », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, n° 2, p. 677-680, janv. 2006, doi: 10.1074/jbc.R500017200.
- [116] F. Strutz *et al.*, « Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. », *The Journal of Cell Biology*, vol. 130, n° 2, p. 393-405, juill. 1995, doi: 10.1083/jcb.130.2.393.
- [117] H. Endo, « a Calcium Binding Protein », *J. Biochem.*, vol. 103, n° 1, p. 6, 1988.
- [118] K. Takenaga, Y. Nakamura, H. Endo, et S. Sakiyama, « Involvement of S100-related Calcium-binding Protein pEL98 (or mts1) in Cell Motility and Tumor Cell Invasion », *Japanese Journal of Cancer Research*, vol. 85, n° 8, p. 831-839, 1994, doi: 10.1111/j.1349-7006.1994.tb02955.x.
- [119] K. Boye et G. M. Mælandsmo, « S100A4 and Metastasis », *Am J Pathol*, vol. 176, n° 2, p. 528-535, févr. 2010, doi: 10.2353/ajpath.2010.090526.
- [120] T. M. Ismail, D. G. Fernig, P. S. Rudland, C. J. Terry, G. Wang, et R. Barraclough, « The basic C-terminal amino acids of calcium-binding protein S100A4 promote metastasis », *Carcinogenesis*, vol. 29, n° 12, p. 2259-2266, déc. 2008, doi: 10.1093/carcin/bgn217.
- [121] V. N. Malashkevich *et al.*, « Phenothiazines inhibit S100A4 function by inducing protein oligomerization », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, n° 19, p. 8605-8610, mai 2010, doi: 10.1073/pnas.0913660107.
- [122] L. M. Orre *et al.*, « S100A4 interacts with p53 in the nucleus and promotes p53 degradation », *Oncogene*, vol. 32, n° 49, p. 5531-5540, déc. 2013, doi: 10.1038/onc.2013.213.
- [123] B. Schmidt-Hansen *et al.*, « Functional Significance of Metastasis-inducing S100A4(Mts1) in Tumor-Stroma Interplay », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n° 23, p. 24498-24504, avr. 2004, doi: 10.1074/jbc.M400441200.
- [124] A. Semov *et al.*, « Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation », *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n° 21, p. 20833-20841, mai 2005, doi: 10.1074/jbc.M412653200.
- [125] J. L. Hernández *et al.*, « Therapeutic targeting of tumor growth and angiogenesis with a novel anti-S100A4 monoclonal antibody », *PLoS ONE*, vol. 8, n° 9, p. e72480, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0072480.
- [126] E. Tulchinsky, E. Prokhortchouk, G. Georgiev, et E. Lukanidin, « A κ B-related Binding Site Is an Integral Part of the mts1 Gene Composite Enhancer Element Located in the First Intron of the Gene », *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n° 8, p. 4828-4835, févr. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.8.4828.
- [127] M. A. Cohn, I. Hjelmso, L.-C. Wu, P. Guldborg, E. M. Lukanidin, et E. M. Tulchinsky, « Characterization of Sp1, AP-1, CBF and KRC binding sites and minisatellite DNA as functional elements of the metastasis-associated mts1/S100A4 gene intronic enhancer », *Nucleic Acids Res*, vol. 29, n° 16, p. 3335-3346, août 2001.

- [128] F. Fei, J. Qu, C. Li, X. Wang, Y. Li, et S. Zhang, « Role of metastasis-induced protein S100A4 in human non-tumor pathophysiology », *Cell & Bioscience*, vol. 7, n° 1, déc. 2017, doi: 10.1186/s13578-017-0191-1.
- [129] M. L. Louka et M. M. Ramzy, « Involvement of fibroblast-specific protein 1 (S100A4) and matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) in CCl4-induced reversible liver fibrosis », *Gene*, vol. 579, n° 1, p. 29-33, mars 2016, doi: 10.1016/j.gene.2015.12.042.
- [130] Y. Li *et al.*, « S100A4+ Macrophages Are Necessary for Pulmonary Fibrosis by Activating Lung Fibroblasts », *Front Immunol*, vol. 9, p. 1776, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01776.
- [131] J. S. Nader *et al.*, « S100A4 is a Biomarker of Tumorigenesis, EMT, Invasion, and Colonization of Host Organs in Experimental Malignant Mesothelioma », *Cancers*, vol. 12, n° 4, p. 939, avr. 2020, doi: 10.3390/cancers12040939.
- [132] M. Grigorian *et al.*, « Tumor Suppressor p53 Protein Is a New Target for the Metastasis-associated Mts1/S100A4 Protein: FUNCTIONAL CONSEQUENCES OF THEIR INTERACTION », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, n° 25, p. 22699-22708, juin 2001, doi: 10.1074/jbc.M010231200.
- [133] P. C. Mahon *et al.*, « S100A4 contributes to the suppression of BNIP3 expression, chemoresistance, and inhibition of apoptosis in pancreatic cancer », *Cancer Res.*, vol. 67, n° 14, p. 6786-6795, juill. 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0440.
- [134] K.-H. Chow *et al.*, « S100A4 Is a Biomarker and Regulator of Glioma Stem Cells That Is Critical for Mesenchymal Transition in Glioblastoma », *Cancer Res.*, vol. 77, n° 19, p. 5360-5373, 01 2017, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1294.
- [135] J. Guo, Y. Bian, Y. Wang, L. Chen, A. Yu, et X. Sun, « S100A4 influences cancer stem cell-like properties of MGC803 gastric cancer cells by regulating GDF15 expression », *Int. J. Oncol.*, vol. 49, n° 2, p. 559-568, août 2016, doi: 10.3892/ijo.2016.3556.
- [136] A. M. Platt-Higgins *et al.*, « Comparison of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9ka) with other prognostic markers in human breast cancer », *International Journal of Cancer*, vol. 89, n° 2, p. 198-208, mars 2000, doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(20000320)89:2<198::AID-IJC16>3.0.CO;2-L.
- [137] Y. Yonemura *et al.*, « Inverse expression of S100A4 and E-cadherin is associated with metastatic potential in gastric cancer », *Clin. Cancer Res.*, vol. 6, n° 11, p. 4234-4242, nov. 2000.
- [138] K. Kimura *et al.*, « Clinical significance of S100A4 and E-cadherin-related adhesion molecules in non-small cell lung cancer », *Int. J. Oncol.*, vol. 16, n° 6, p. 1125-1131, juin 2000, doi: 10.3892/ijo.16.6.1125.
- [139] U. Stein *et al.*, « Diagnostic and Prognostic Value of Metastasis Inducer S100A4 Transcripts in Plasma of Colon, Rectal, and Gastric Cancer Patients », *The Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 13, n° 2, p. 189-198, mars 2011, doi: 10.1016/j.jmoldx.2010.10.002.
- [140] G. M. Mælandsmo, V. A. Flørenes, M. T. P. Nguyen, K. Flatmark, et B. Davidson, « Different Expression and Clinical Role of S100A4 in Serous Ovarian Carcinoma at Different Anatomic Sites », *TBI*, vol. 30, n° 1, p. 15-25, 2009, doi: 10.1159/000199447.
- [141] M. Saleem *et al.*, « S100A4 accelerates tumorigenesis and invasion of human prostate cancer through the transcriptional regulation of matrix metalloproteinase 9 », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 103, n° 40, p. 14825-14830, oct. 2006, doi: 10.1073/pnas.0606747103.
- [142] D. Roulois *et al.*, « Characterization of preneoplastic and neoplastic rat mesothelial cell lines: the involvement of TETs, DNMTs, and 5-hydroxymethylcytosine », *Oncotarget*, vol. 7, n° 23, juin 2016, doi: 10.18632/oncotarget.8970.
- [143] N. J. Vogelzang *et al.*, « Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma », *J. Clin. Oncol.*, vol.

21, n° 14, p. 2636-2644, juill. 2003, doi: 10.1200/JCO.2003.11.136.

[144] A. Vigneron, I. B. Roninson, E. Gamelin, et O. Coqueret, « Src Inhibits Adriamycin-Induced Senescence and G₂ Checkpoint Arrest by Blocking the Induction of p21^{waf1} », *Cancer Research*, vol. 65, n° 19, p. 8927-8935, oct. 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0461.

[145] J. S. Nader *et al.*, « Characterization of increasing stages of invasiveness identifies stromal/cancer cell crosstalk in rat models of mesothelioma », *Oncotarget*, vol. 9, n° 23, mars 2018, doi: 10.18632/oncotarget.24632.

[146] F. N *et al.*, « The Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Regulatory Factor SLUG (SNAI2) Is a Downstream Target of SPARC and AKT in Promoting Melanoma Cell Invasion », *PloS one*, 2012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22911700/> (consulté le mai 20, 2020).

[147] G. Mahmoodi Chalbatani *et al.*, « Small interfering RNAs (siRNAs) in cancer therapy: a nano-based approach », *Int J Nanomedicine*, vol. 14, p. 3111-3128, mai 2019, doi: 10.2147/IJN.S200253.

Résumé en français

La sénescence est un arrêt irréversible du cycle cellulaire, qui exerce des fonctions suppressives contre les cellules anormales, mais peut aussi avoir des fonctions prolifératives. En particulier, dans le contexte du cancer, nous avons montré que certaines sous-populations de cellules peuvent échapper à la sénescence induite par la chimiothérapie et recommencer à proliférer. Les cellules émergentes sont plus transformées, plus agressives et plus invasives. La sénescence est donc beaucoup plus hétérogène qu'on ne le pensait auparavant. Il est donc nécessaire de trouver de nouveaux marqueurs capables de discriminer une réponse bénéfique ou délétère à la chimiothérapie. En utilisant un modèle *in vitro* d'échappement de la sénescence, nous avons analysé le rôle de S100A4, une petite protéine de liaison du calcium, dans l'échappement de la sénescence. Nos résultats suggèrent que S100A4 est un biomarqueur d'une réponse précaire à la chimiothérapie, qui peut également moduler la stabilité de la sénescence.

Titre et résumé en Anglais :

Study of S100A4 role in chemotherapy-induced senescence escape.

Senescence is an irreversible arrest of the cell cycle, which exerts suppressive functions against abnormal cells, but can also have proliferative functions. In particular, in the context of cancer, we have shown that some subpopulations of cells can escape chemotherapy-mediated senescence and restart proliferation. Emerging cells are more transformed, aggressive and invasive. The senescence is therefore much more heterogeneous than previously thought. It is thus necessary to find new markers capable of discriminating a beneficial or deleterious response to chemotherapy. Using an *in vitro* senescence escape model, we have analyzed the role of S100A4, a small calcium binding protein, in senescence escape. Our results suggest that S100A4 is a biomarker of a precarious response to chemotherapy, which may also modulate the stability of senescence.

DISCIPLINE administrative : Sciences Pharmaceutiques

MOTS-CLES :

S100A4, Sénescence, Résistance, Cancer, EMT

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Equipe 12: Senescence escape and soluble markers of cancer progression
Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers
ICO Site Paul Papin - 15, rue André Boquel - 49055 Angers Cedex 0

Directeur de thèse : Mr Daniel Pouliquen