THESE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche INSERM U1183 Institut de Médecine Régénératrice et de Biothérapies (IRMB)

REVELER LE LIEN ENTRE LA SENESCENCE CELLULAIRE ET LA PATHOLOGIE DE L'ARTHROSE : UN ROLE DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES ET DU FACTEUR CHI3L1

Présentée par Yassin TACHIKART

Le 29 octobre 2019

Sous la direction de Jean-Marc BRONDELLO

Devant le jury composé de

M. Jean-Marc BRONDELLO, CR, UM	Directeur de Thèse
Mme. Valérie PLANAT-BENARD, MCF, UPS	Rapporteur
M. David BERNARD, DR, CNRS	Rapporteur
M. Frédéric DE CEUNINCK, Project Director, SERVIER	Examinateur
M. Vincent GELI, DR, CNRS	Examinateur
M. Christian JORGENSEN, PUPH, UM	Examinateur

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

J'effectue mes travaux en tant qu'interne de pharmacie filière IPR et étudiant en thèse au sein de l'unité INSERM 1183 dans l'équipe dirigée par le **Pr. Christian Jorgensen** et le **Dr.Jean-Marc Brondello**. Je vous remercie pour m'avoir fait confiance et accueilli parmi vous au sein de l'institut il y a maintenant trois ans.

Merci au **Dr. Jean-Marc Brondello** pour m'avoir accueilli au sein de l'IRMB et ouvert au monde de la sénescence.

Merci au **Pr.Christian Jorgensen** pour sa bienveillance, son enthousiasme constant et ses conseils durant ces années de travail et durant l'écriture du manuscrit.

Merci au **Dr. Frédéric De Ceuninck** pour avoir accepté de faire partie de ce jury. Également pour son enthousiasme et ses avis constructifs tout le long du projet. C'est un véritable plaisir de vous compter parmi nous pour cette soutenance.

Merci au **Dr. Vincent Géli**, pour sa bonne humeur, ses remarques pertinentes et son accueil toujours chaleureux à Marseille. C'était une évidence de vous proposer de faire partie de ce jury et je vous remercie d'avoir accepté sans hésitation.

Merci au **Dr. Valérie Planat** et au **Dr David Bernard** de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs et d'avoir accepté de juger ce travail. J'ai apprécié nos échanges et vous remercie pour vos remarques qui ont aidé grandement à améliorer la qualité de ce travail. Je suis impatient de pouvoir échanger avec vous au cours de la soutenance et après.

1. Table des matières

1. Table des matières 4

2. Liste des abréviations 9

3. Liste des figures et tableaux 12

4. Avant-propos 14

5. Introduction 18

5.1. Physiologie de l'articulation 18

5.1.1. Le cartilage 18

5.1.1.1. Les chondrocytes 20

5.1.1.2. La matrice extracellulaire 22

5.1.2. L'os sous-chondral 22

5.1.3. La membrane synoviale 24

5.2. Les cellules souches/stromales mésenchymateuses 26

5.2.1. Historique 26

5.2.2. Définition 26

5.2.3. Origine embryologique 27

5.2.4. Caractérisation 28

5.2.5. Propriétés et fonctions dans l'articulation 32

5.2.6. Le vieillissement des cellules souches/stromale mésenchymateuses 36

5.3. L'Arthrose (OA) 42

5.3.1. Introduction 42

5.3.2. Epidémiologie 43

5.3.3. Diagnostic 44

5.3.4. Prise en charge 46

5.3.5. Une pathologie liée à la sénescence 47

5.4. La sénescence cellulaire 50

5.4.1. Historique 50

5.4.2. Définition 51

5.4.3. Différents phénotypes de sénescence 53

5.4.3.1. *Télomères et sénescence* 54

5.4.3.2. *Oncogènes et sénescence* 55

5.4.3.3. *Dysfonctions mitochondriales et sénescence* 56

5.4.4. Fonctions de la cellules sénescentes 57

5.4.4.1. *Fonctions physiologiques* 57

5.4.4.2. *Fonctions pathologiques* 59

5.4.4.3. *Modèles in vivo et démonstration du lien causal entre sénescence et pathologies* 61

5.4.5. Caractéristiques moléculaires de la sénescence 66

5.4.5.1. *La voie de réponse aux dommages à l'ADN* 66

5.4.5.2. *Les inhibiteurs du cycle cellulaire* 66

5.4.5.3. *Les réarrangements de la chromatine associés à la sénescence* 69

5.4.5.4. *Autophagie et sénescence* 71

5.4.5.5. *Métabolisme et sénescence* 71

5.4.6. Le SASP ou phénotype sécrétoire associé à la sénescence 73

5.5. Chitinase 3 like protein 1 (Chi3L1) 75

5.5.1. Les chitinases 75

5.5.1.1. *Généralités* 75

5.5.1.2. *Les chitinases humaines* 76

5.5.1.3. *Rôles des chitinases* 77

5.5.2. Découverte de Chi3L1 78

5.5.3. Structure de Chi3L1 79

5.5.4. Activité biologique 80

5.5.4.1. *Récepteur de Chi3L1* 80

5.5.4.2. *Régulation de Chi3L1* 82

5.5.5. Chi3L1 et pathologies 83

5.5.5.1. *Chi3L1 et pathologies infectieuses* 83

5.5.5.1.1. Les infections bactériennes 83

5.5.5.1.2. Les infections fongiques 84

5.5.5.1.3. *Les infections parasitaires* 85

5.5.5.2. *Chi3L1 et cancers* 85

5.5.5.2.1. *La chimiorésistance* 86

5.5.5.2.2. *L'angiogenèse* 87

5.5.5.2.3. *Les métastases* 87

5.5.5.3. *Chi3L1 et pathologies pulmonaires* 88

5.5.5.4. *Chi3L1 et pathologies du squelette et des articulations* 90

6. Article 1 96

7. Article 2 136

8. Discussions et perspectives 170

8.1. CSMs et OA 170

8.2. Microenvironnement, sénescence et OA 173

8.3. OA et sénothérapies 176

9. Bibliographie 180

2. Liste des abréviations

ACLT : transection du ligament crucial antérieur

AIJ : arthrite idiopathique juvénile

ARF/p14 : *alternative reading frame protein*

Atg : *autophagy related protein*

ATM : ataxie telangiectasie

ATR : *ATM and Rad3 related*

Bcl : B-cell lymphoma proteins

BMP : *bone morphogenic protein*

CCF : fragments d'ADN cytosolique

CD : Cluster de différenciation

Cdc25 : "*cell division cycle*" 25

CDK : kinases dépendantes des cyclines

CDMP : *cartilage derived morphogenetic protein*

cGAS : *Cyclic GMP-AMP synthase*

CHK1/2 : checkpoint kinase 1/2

CiOA *: Collagenase induced OsteoArthritis*

CKI *: cyclin kinase inhibitors*

CSM : Cellule souche/stromale mésenchymateuse

CTCF : CCCTC-binding factor

Chi3L1 : *Chitinase-like 3 protein 1*

DDR : Réponse aux lésions de l'ADN

EFNB : éphrine B

FGF : *fibroblast growth factor*

FOXO4 : Forkhead Box O4

HGF : hepatocytes growth factor

HSP : protéine de résistance au choc thermique

IDO : indoleamine 2,3-dioxygénase

IIS : sénescence liée à l'inflammation

IL : interleukine

IGF1 : *insulin growth factor 1*

HFD : high fat diet

INK4 : "**IN**hibitors of CD**K4"**

IRM : imagerie par résonnance magnétique

JAK : janus kinase

JMJD3 : jumonji domain containing 3

LNGFR : *low affinity nerve growth factor receptor*

MiDAS : mitochondrial dysfunction induced senescence

MMP : metalloprotéase

mTOR : mammalian target of rapamycine

NAD+/NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

Nestin : neurectodermal stem cell marker

NF1 : neurofibromatose

OA : OsteoArthritis

OIS : oncogène-induced senescence

OXR1 : protéine de résistance au stress oxidant 1

PDPN : podoplanine

PGE2 : prostaglandine E2

PRC1/2 : polycomb-group repressive complex ½

PTEN : **p**hosphatase and **ten**sin homolog mutated in multiple advanced cancers 1

Rb : rétinoblastome

RIS : sénescence réplicative

SA-β-Gal : activité de la β-Galactosidase acide associée à la sénescence

SAHF : senescence associated heterochromatin foci = foyers d'hétérochromatine

SASP : phénotype sécrétoire associé à la sénescence

STING : **St**imulator of **in**terferon **g**enes

TGFβ : *Transforming growth factor β*

TIMP : *tissue inhibitors of metalloproteases*

TIS : sénescence liée aux facteurs trophiques

TNF : *Tumor necrosis factor*

ULK1 : Unc-51 like autophagy activating kinase

VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule -1

VEGFα : vascular endothelial growth factor α

3. Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Projection de la part de la population de plus de 60 ans en France jusqu'en 2060 (INSEE, 2008) 14

Figure 2 : Les différents types de cartilage (Krishnan and Grodzinsky, 2018) 19

Figure 3 : Anatomie du cartilage (Zhou et al., 2019) 20

Figure 4 : la jonction ostéochondrale (Donell, 2019) 23

Figure 5 : lésions de l'os sous-chondral visible à l'IRM (Donell, 2019) 24

Figure 6 : Localisation des CSMs dans l'articulation 32

Figure 7 : Propriétés immunomodulatrices des CSMs (Li and Hua, 2017) 34

Figure 8 : Théorie de l'épuisement des cellules souches (Mansilla et al., 2011) 39

Figure 9 : Comparaison entre une articulation saine et une articulation arthrosique (adaptée de (McCulloch et al., 2017)) 43

Figure 10 : Caractéristiques des cellules sénescentes 52

Figure 11 : Les différents phénotypes de sénescence 53

Figure 12 : Les différentes voies moléculaires de la sénescence (tirée de (Muñoz-Espín and Serrano, 2014)) 54

Figure 13 : Fonctions des cellules sénescentes 59

Figure 14 : Cycle cellulaire et Cibles des CKI (tirée de (Terzibasi-Tozzini et al., 2017)) 67

Figure 15 : locus INK4 et cibles des protéines INK4 et ARF (tirée de (Sharpless and Sherr, 2015)) 68

Figure 16 : motif "chitine" 75

Figure 17 : motif "acide hyaluronique" 76

Figure 18 : Structure de Chi3L1 (Fusetti et al., 2003) 80

Figure 19 : Interaction entre Chi3L1 et IL13Rα2 (He et al., 2013) 81

Figure 20 : interaction entre TMEM219 et IL13Ra2 (Lee et al., 2016) 82

Figure 21 : régulation du remodelage osseux par DKK1 (Diarra et al., 2007) 91

Figure 22 : Les sénothérapies et leurs cibles 177

Tableau 1 : Mécanismes des fonctions immunomodulatrices des CSMs (Li and Hua, 2017) . 35

Tableau 2 : lien entre sénescence et pathologies, modèles d'étude et marqueurs identifiés 65

Tableau 3 : famille des enzymes GH18 77

Tableau 4 : les différentes nomenclatures de Chi3L1 (Coffman, 2008) 79

4. Avant-propos

En 2018, 25% de la population française a plus de 60 ans, 30% en 2030. Cette proportion de la population, dite "âgée", est en constante augmentation et pourrait représenter un tiers des français d'ici 2060 selon l'INSEE. De nombreuses pathologies (cancers, maladies cardiovasculaires, ophtalmologiques, neuro-dégénératives, rhumatologiques) voyant leurs incidences connaitre une croissance accélérée à partir de ces âges, l'enjeu de santé publique autour du "vieillir en bonne santé" devient évident.

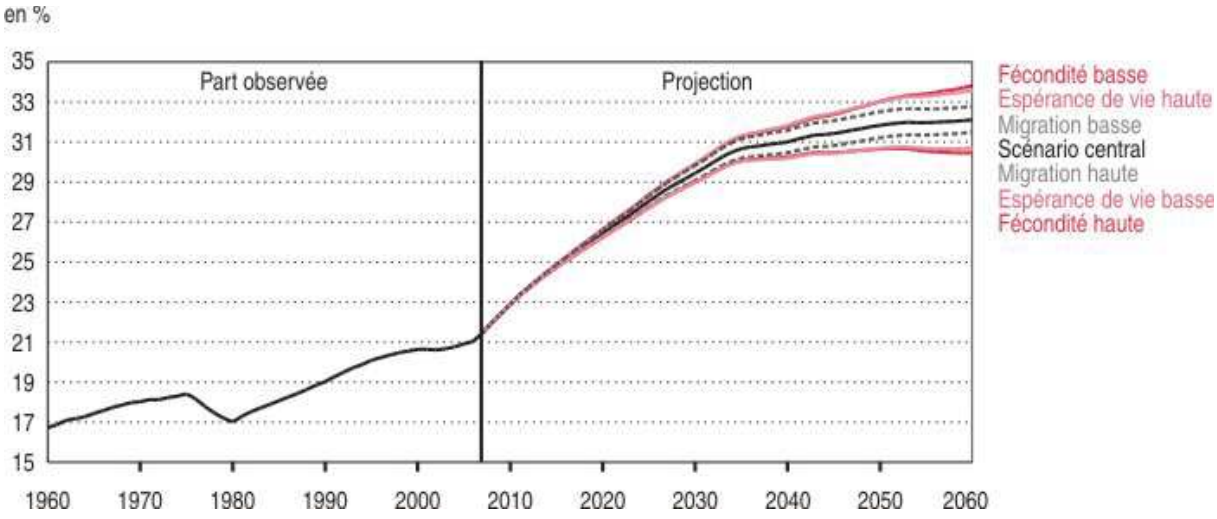


FIGURE 1 : PROJECTION DE LA PART DE LA POPULATION DE PLUS DE 60 ANS EN FRANCE JUSQU'EN 2060 (INSEE, 2008)

Parmi les pathologies du sujet âgé, l'arthrose est la plus fréquemment rencontrée dans les salles d'attentes de nos services de rhumatologie. Il s'agit d'une atteinte dégénérative complexe des articulations qui entraine douleur et handicap. Son coût pour la collectivité déjà estimé à 1,6 milliard d'euros en 2002, ne cesse de croître (Le Pen et al., 2005). L'intérêt et les efforts de la communauté scientifique et médicale sont donc importants sur ce sujet. Néanmoins, même si cela a permis d'avancer dans la compréhension de sa physiopathologie, il n'existe pas à ce jour de traitement curatif. Dans cette recherche de la thérapie, des équipes ont tenté de faire le lien entre vieillissement du cartilage et développement de l'arthrose. C'est ainsi qu'en 2001, Martin JA et al. proposent que les

changements structurels du cartilage, de sa matrice et de ses propriétés mécaniques observés avec l'âge et menant à l'arthrose soient liés à la sénescence des chondrocytes. Ils mettent en évidence des télomères raccourcis et des niveaux d'activité de la β-galactosidase acide plus élevés chez les chondrocytes de patients âgés, témoignant d'une accumulation plus importante de cellules sénescentes (Martin and Buckwalter, 2001).

Ce syndrome de la "sénescence cellulaire" a été mis en évidence par Leonard Hayflick en 1961 (Hayflick and Moorhead, 1961). Il est défini comme "un arrêt robuste du cycle cellulaire" associé à l'expression d'inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines (CKI) (comme $p16^{ink4a}$ ou $p21^{waf1}$) ainsi qu'un sécrétome particulier (He and Sharpless, 2017). Ce phénomène est central dans de nombreux processus physiologiques bénéfiques telles la cicatrisation, l'embryogenèse et la défense contre la tumorogenèse (He and Sharpless, 2017). Mais il semblerait, en contrepartie, présenter des propriétés délétères à des moments plus avancés de la vie. La corrélation entre, d'une part, l'accumulation des cellules sénescentes dans nos tissus, et d'autre part, les pathologies liées à l'âge, peut laisser penser que ce phénomène serait la pièce manquante pour expliquer l'augmentation massive de l'incidence des pathologies liées à l'âge et le vieillissement dit "pathologique". De plus, pour en revenir à l'arthrose, l'équipe a montré que l'hyper-expression de $p16^{ink4a}$ dans les chondrocytes cultivés en trois dimensions était à l'origine de la mise en place d'un sécrétome délétère pour le cartilage (Philipot et al., 2014). La fonctionnalité de ces cellules sénescentes tendrait donc à avoir un impact négatif pour l'homéostasie de l'articulation. Si le lien causal est démontré entre d'un côté cette accumulation de cellules sénescentes, et de l'autre, dans notre cas, la pathologie arthrosique, il pourra être envisagé des approches originales pour traiter nos patients. Les travaux de Zhu et al. ont en effet montré que l'on pouvait cibler ces cellules sénescentes spécifiquement avec certaines molécules (Zhu et al.,

2015). Ces médicaments pourraient bientôt constituer une nouvelle classe thérapeutique : les "sénolytiques" ou "sénothérapies" dont les applications en rhumatologie sont à envisager (Tachikart et al., 2019).

Au départ de mes travaux de thèse, les questions posées étaient donc les suivantes :

1) Y a-t-il une apparition et une accumulation de cellules sénescentes dans l'articulation durant le développement de l'arthrose ?

2) L'accumulation de ces cellules sénescentes est-elle causale du développement de la pathologie arthrosique ?

3) Peut-on proposer de nouvelles approches thérapeutiques basées sur ce phénomène dans l'arthrose ?

Pour y répondre, mon travail s'est décomposé en un certain nombre d'objectifs :

i) Mettre en place des modèles de suivi de la sénescence durant l'induction de l'arthrose dans un modèle murin transgénique.

ii) Identifier les compartiments et types cellulaires sénescents dans l'arthrose dans les modèles animaux.

iii) Mettre en place des modèles *in vitro* d'étude de la sénescence des cellules souches/stromales mésenchymateuses et des chondrocytes.

iv) Mettre en évidence l'impact du microenvironnement et de la cellule sénescente sur l'articulation et le développement de la pathologie.

Dans un premier temps, ce travail présentera la physiologie de l'articulation puis détaillera la biologie des chondrocytes et des cellules souches/stromales mésenchymateuses. Ensuite, nous aborderons la pathologie arthrosique. S'en suivra une revue de la littérature sur la sénescence et son implication dans les maladies ostéo-articulaires. Nous nous intéresserons ensuite à la "Chitinase 3 Like protein 1", une protéine

retrouvée dans le sécrétome de nombreux phénotypes de la sénescence. Nous développerons son lien avec les pathologies du sujet âgé. Enfin, nous finirons par présenter les résultats de ces travaux de thèse sous forme d'articles originaux avant de mettre en lumière les perspectives qu'ils laissent envisager.

5. Introduction

5.1. Physiologie de l'articulation

L'articulation est la jonction entre deux pièces osseuses ou plus. On en distingue 3 types :

- les articulations fibreuses : les os de cette articulation sont reliés uniquement par des ligaments
- les articulations cartilagineuses : les os de cette articulation sont reliés entre eux par du cartilage
- les articulations synoviales : ce sont des articulations mobiles. Les os sont séparés par une cavité synoviale contenant le liquide synovial

Nous allons principalement nous intéresser aux articulations synoviales. Elles sont composées de trois compartiments : le cartilage, l'os sous chondral et la membrane synoviale.

5.1.1. Le cartilage

Le cartilage, tout d'abord, est un tissu conjonctif souple non vascularisé, non innervé et alymphatique composé de chondrocytes et d'une matrice extra-cellulaire. Il en existe trois types majeurs : le cartilage hyalin, le fibrocartilage et le cartilage élastique. Ils jouent de nombreux rôles parmi lesquels on retrouve le glissement des articulations, le soutien des charges (articulations porteuses et de la colonne vertébrale), la formation du nez et des oreilles, le support de la trachée, et la formation des os longs durant le développement (Krishnan and Grodzinsky, 2018).

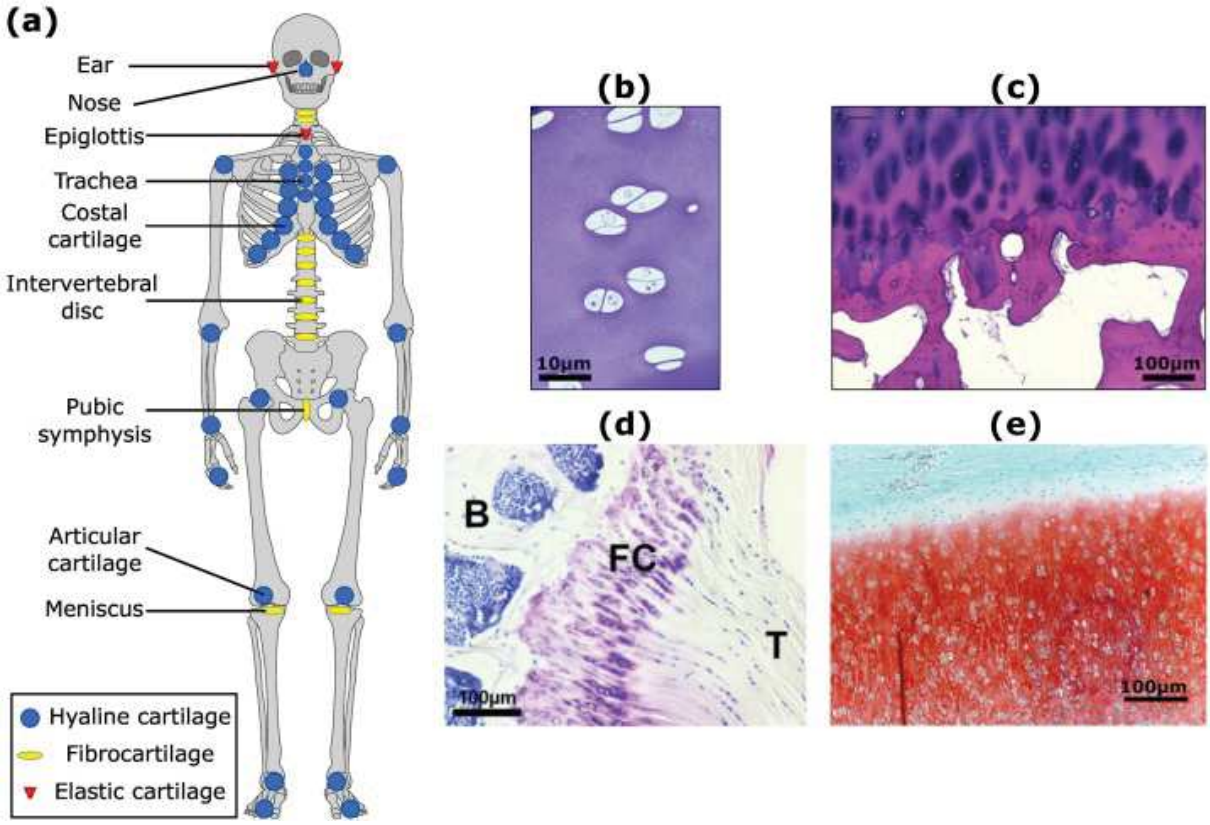


FIGURE 2 : LES DIFFERENTS TYPES DE CARTILAGE (KRISHNAN AND GRODZINSKY, 2018)

Nous nous intéresserons particulièrement au cartilage hyalin qui est la forme de cartilage la plus abondante du corps humain. Il est lisse, nacré et on le retrouve dans les articulations synoviales. Situé aux extrémités des épiphyses de l'os, celui-ci permet, de par son coefficient de friction extrêmement faible, un amortissement des forces de pression et un bon glissement des pièces osseuses. On divise classiquement le cartilage mature en quatre couches :

- superficielle/tangeantielle : avec des fibres de collagènes et deux ou trois couches de chondrocytes parallèles à la surface
- moyenne/transitionnelle : les chondrocytes sont sphériques
- profonde/radiée : c'est la plus épaisse, avec des fibres verticales et des chondrocytes larges disposés en colonne perpendiculaire à la surface de l'articulation
- calcifiée (voir Figure 3 : Anatomie du cartilage). (Zhou et al., 2019)

En dessous de la couche calcifiée, le cartilage repose sur l'os sous-chondral.

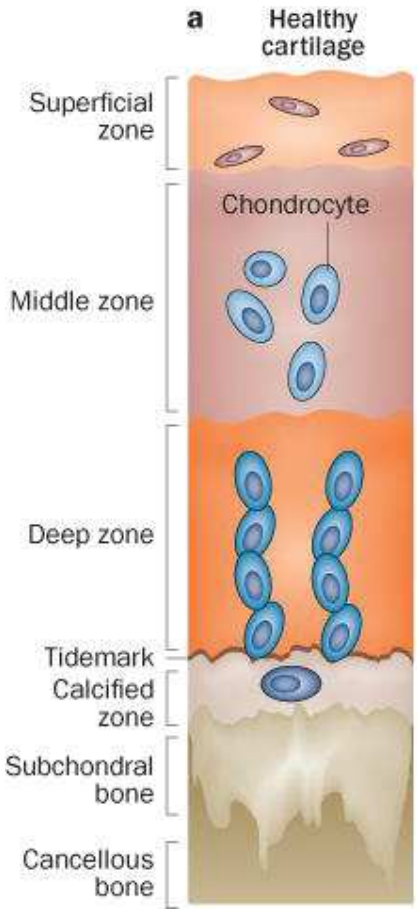


Figure 3 : Anatomie du cartilage (Zhou et al., 2019)

La différence entre les différents types de cartilage vient de la composition et de l'organisation de la matrice extra-cellulaire. Ce sont les chondrocytes qui synthétisent les composants majeurs de cette matrice extracellulaire afin de donner au cartilage ses propriétés biomécaniques et structurelles.

5.1.1.1. Les chondrocytes

Les chondrocytes dérivent des ostéoblastes et sont donc les cellules composant le cartilage et synthétisant la matrice extracellulaire. Ils sont localisés dans des "logettes" appelées chondroplastes. Chez l'Homme adulte et en bonne santé, les chondrocytes sont en quiescence et le renouvellement de leur matrice extracellulaire est très lent.

L'homéostasie du cartilage est maintenue grâce à un équilibre entre les activités cataboliques et anaboliques du chondrocytes. Ce métabolisme se joue autour de trois types de cytokines :

- facteurs régulateurs : IL4/10/13, tissue inhibitors of metalloproteases (TIMP)
- facteurs cataboliques : IL1β/6/17, Tumor necrosis factor (TNF), metalloprotéases 1 et 13 (MMP1/13)
- facteurs de croissance : insulin growth factor 1 (IGF1), fibroblast growth factor (FGF), Transforming growth factor β (TGFβ), bone morphogenic protein (BMP), cartilage derived morphogenetic protein (CDMP)

Avec l'âge, une pathologie ou un traumatisme du cartilage, il y a une rupture de cet équilibre dans le sens des voies et facteurs cataboliques. Les chondrocytes deviennent hypertrophiques, récapitulant certaines étapes de leur différenciation terminale qui est physiologique dans l'ossification endochondrale et au niveau de la plaque de croissance de l'os, mais pas dans le cartilage. Ces chondrocytes hypertrophiques vont être caractérisés par un certains nombres de marqueurs de l'hypertrophie : runt-related transcription factor 2 (RUNX2), collagène de type X, metalloprotéase 13, et indian Hedgehog (Mueller and Tuan, 2008). À l'inverse, des protéines comme gremlin1 et Dickkopf 1 vont avoir pour rôle de protéger le cartilage en inhibant l'expression des gènes impliqués dans l'hypertrophie (Leijten et al., 2012). L'orientation du métabolisme du chondrocytes et son entrée ou non en différenciation vont se jouer autour de la régulation des voies de signalisation du fibroblast growth factor (FGF), du transforming growth factor béta (TGFb), des bone morphogenetic protein (BMP) et de Wnt. Ainsi, si la voie de signalisation du FGF stimule la différenciation terminale hypertrophique, les BMP l'inhibe (Minina et al., 2002). Cette régulation visant au

maintien du phénotype du chondrocyte leur permet de détecter les altérations du cartilage et de la matrice extracellulaire et de réagir efficacement.

5.1.1.2. La matrice extracellulaire

La matrice extra-cellulaire sera ainsi constituée d'eau et de protéoglycanes enchâssés dans un réseau fibres de collagènes. Les différents types de collagènes, de protéoglycanes, de glycoprotéines et leurs proportions dépendront du type de cartilage et donneront ainsi leurs caractéristiques physiques et mécaniques particulières (Krishnan and Grodzinsky, 2018). En ce qui concerne le cartilage hyalin, sa matrice extracellulaire est principalement composée de collagène de type II (80%). On en trouve aussi de type IX et XI dans des proportions plus faibles. Le collagène de type VI est également présent, autour des chondrocytes, permettant à ces derniers de réagir aux changements de la matrice extracellulaire. Côté protéoglycane, l'aggrecan est le principal composant de cette famille dans le cartilage hyalin.

Cette matrice laisse passer les substances nutritives provenant du liquide synovial afin qu'elles puissent parvenir aux chondrocytes. En effet, ces éléments sont les seules sources disponibles pour ces cellules étant donné, comme signalé précédemment, que le cartilage n'est ni vascularisé, ni innervé. Certains auteurs ont également proposé que l'os sous-chondral assurerait la nutrition des couches calcifiée et profonde du cartilage (Donell, 2019).

5.1.2. L'os sous-chondral

L'os sous chondral est donc l'os situé juste en dessous du cartilage, en contact avec la couche calcifiée du cartilage. Il est innervé et vascularisé. L'os sous-chondral est le lien entre

l'os diaphysaire et le cartilage. Il est à la base de la jonction ostéochondrale. Celle ci a trois rôles (Donell, 2019) :

- En tant que transition entre le cartilage souple et l'os sous-chondral dur, elle a des propriétés mécaniques importantes
- Des fibres verticales de collagène de type II la traverse et permettent d'ancrer le cartilage à l'os sous-chondral
- Elle voit le passage de nombreuses cytokines, permettant des interactions entre les chondrocytes et les cellules de l'os

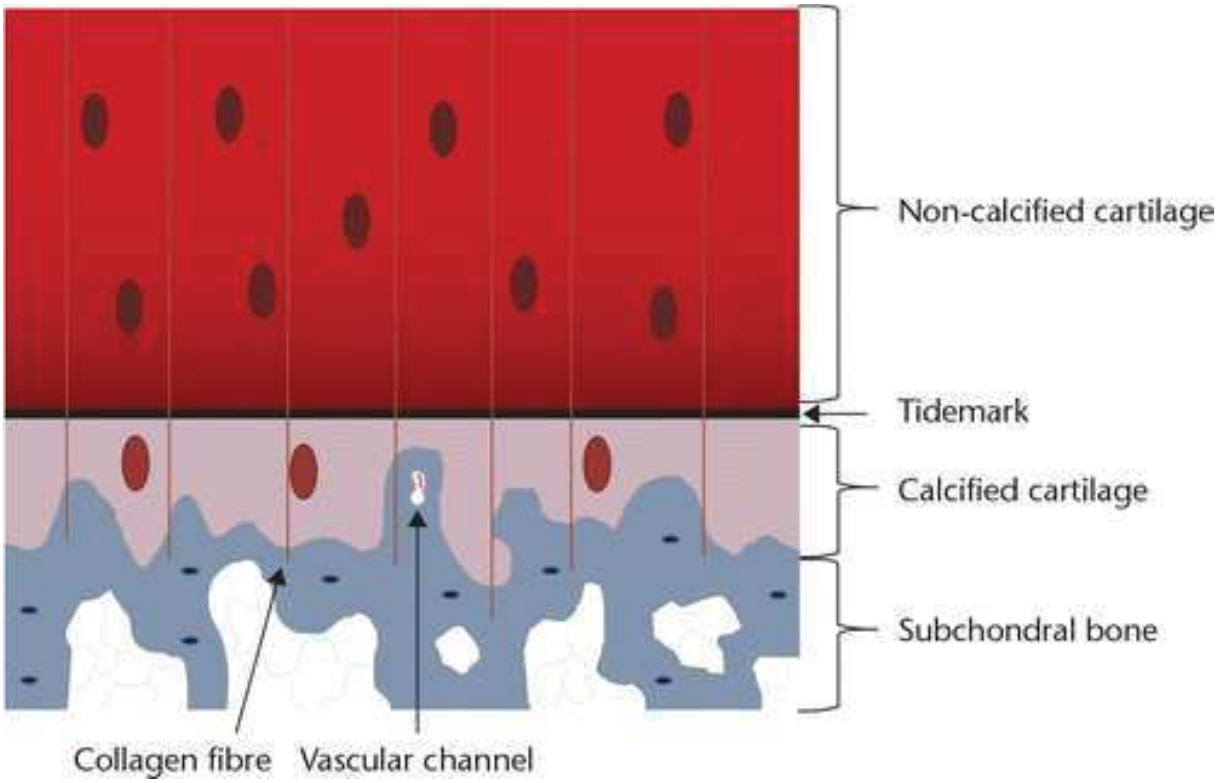


FIGURE 4 : LA JONCTION OSTEOCHONDRALE (DONELL, 2019)

Ainsi, l'os sous-chondral joue un rôle dans le maintien de l'intégrité du cartilage en apportant le soutien mécanique durant le mouvement, s'adaptant constamment par un jeu de résorption/formation osseuse (Madry et al., 2010). Un stress mécanique trop important provoque un remodelage de l'os sous-chondral qui peut se traduire par l'apparition de

lésions. Si celles-ci perdurent, elles peuvent mener à une dégradation du cartilage et donc au syndrome arthrosique.

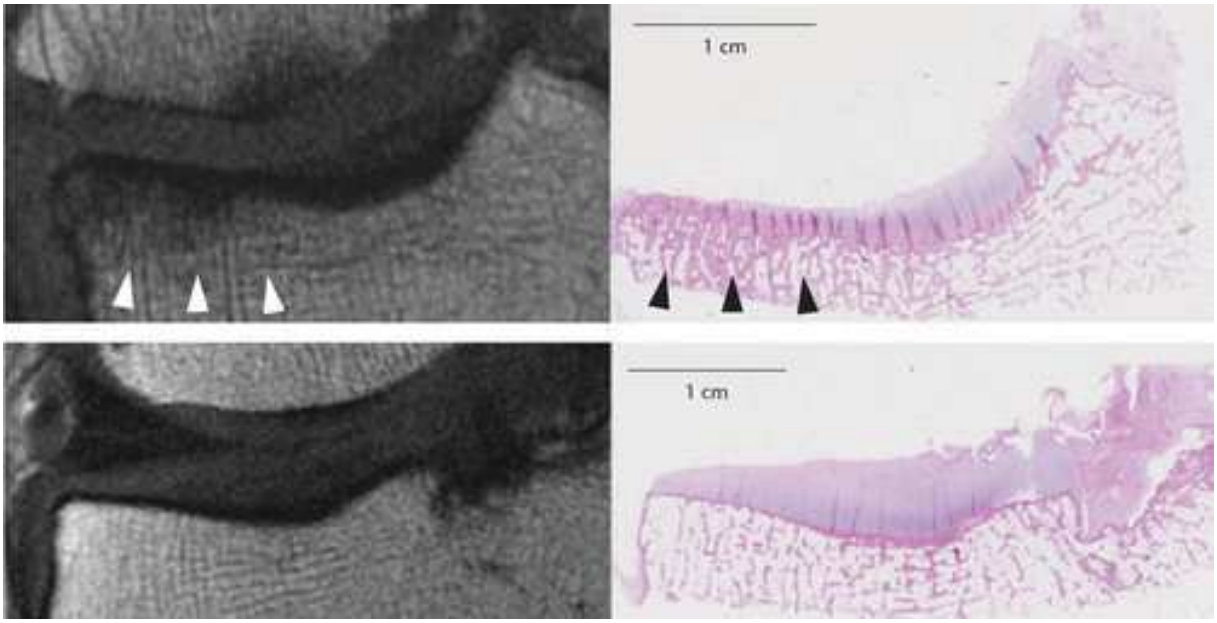


FIGURE 5 : LESIONS DE L'OS SOUS-CHONDRAL VISIBLE A L'IRM (DONELL, 2019)

(sont indiqués par des flèches les lésions visibles à l'IRM)

5.1.3. La membrane synoviale

Enfin, dernier compartiment de l'articulation, la membrane synoviale. Il s'agit d'une fine couche de cellules possédant les caractéristiques phénotypiques des macrophages et des fibroblastes. Ces cellules forment avec le tissu conjonctif stromal vascularisé voisin une structure complexe source d'une part importante des composants du liquide synoviale. Dans ce dernier, on retrouve la lubricine et l'acide hyaluronique, des acteurs de la protection et du maintien de l'intégrité du cartilage (Scanzello and Goldring, 2012). Ils participent à la lubrification de la surface articulaire pour réduire les frictions et permettre un bon glissement (Scanzello and Goldring, 2012). La lubricine réduit également le dépôt pathologique de protéines à la surface de l'articulation et inhibe la division des synoviocytes, empêchant l'hyperplasie du tissue synovial (Rhee et al., 2005). De plus, étant donné que le cartilage est non vascularisé et alymphatique, la membrane synoviale, par l'intermédiaire du

liquide synovial, est chargée d'apporter les nutriments nécessaires au maintien et à la santé du cartilage. Enfin, le tissu synovial participe à l'élimination des déchets du métabolisme chondrocytaire et du renouvellement de la matrice articulaire (Scanzello and Goldring, 2012). La membrane synoviale agit ainsi comme une membrane semi-perméable, contrôlant le trafic entre l'espace inter-articulaire et l'extérieur, pour maintenir la composition du liquide synoviale. Cette mission est essentielle pour maintenir l'homéostasie de l'articulation (Scanzello and Goldring, 2012).

Dans chacun de ces compartiments, on retrouve des progéniteurs ostéo-chondraux. Ces cellules souches désignées sous le terme "cellules souches/stromales mésenchymateuses" sont en dialogue permanent avec les chondrocytes et le micro-environnement. Elles sont des acteurs importants de l'homéostasie articulaire.

5.2. Les cellules souches/stromales mésenchymateuses

5.2.1. Historique

En 1970, Friedenstein et al. ensemencent une suspension de cellules de moelle osseuse de cochon d'Inde. Ils observent au bout de 9 à 12 jours une population adhérente clonale d'aspect fibroblastique et capable d'ostéogenèse (Friedenstein et al., 1970). Ils viennent ainsi de découvrir les "cellules souches mésenchymateuses". Depuis, les propriétés de cette population cellulaire ont été particulièrement étudiés : Pittinger et al. montrent leurs capacités de différenciation en 1999 (Pittenger et al., 1999), tandis que leur capacité d'immunomodulation sont mises en évidence au regard de leurs effets sur l'immunité innée et adaptative (Haddad and Saldanha-Araujo, 2014). L'intérêt pour les MSCs ne va faire que croitre quand, sur la base de leurs propriétés de différenciation, plusieurs équipes vont injecter ces cellules pour tenter de favoriser la réparation ou régénération tissulaire (Tomita et al., 1999). Les premiers résultats sont prometteurs, si bien que, 20 ans plus tard, 980 études cliniques sont enregistrés sur clinicaltrial.org, afin de confirmer les conditions de leur potentiel thérapeutique (Search of: mesenchymal stem cell - List Results - ClinicalTrials.gov).

5.2.2. Définition

Les cellules souches/stromales mésenchymateuses (CSM) se définissent donc comme des cellules souches non hématopoïétiques et non endothéliales, capables d'auto-renouvellement et de se différencier pour former les tissus mésenchymateux : os, muscles, cartilages, tendons, tissu adipeux, et stroma de la moelle osseuse (Pittenger et al., 1999). Elles sont théoriquement présentes dans tous les organes vascularisés (Crisan et al., 2008). Ses localisations les plus classiques sont la moelle osseuse et le tissu adipeux, mais aussi la

membrane synoviale, le placenta, la pulpe dentaire, le sang périphérique, le ligament périodontal, l'endomètre, le cordon ombilical et le sang de cordon (Lv et al., 2014).

5.2.3. Origine embryologique

L'origine embryologique des CSMs n'est pas claire. Principalement, deux hypothèses s'affrontent. La première hypothèse propose que les CSMs dériveraient des péricytes, ces cellules périvasculaires (Caplan, 2017a). Cette idée démarre d'un travail de Crisan et al. Sur la base de l'expression des marqueurs CD146+ CD34− CD45− CD56−, cette équipe a isolé et mis en culture des péricytes issus de différents organes. Cette population cellulaire montre des propriétés de migration et un potentiel de différenciation myogénique conservé au fur et à mesure des différents passages en culture. De plus, à passage 11, ces cellules présentent une morphologie similaire au CSMs. Elles expriment également les marqueurs classiques (CD73, CD90 et CD105) et ont la capacité de se différencier *in vitro* dans les trois lignées (Crisan et al., 2008). Néanmoins, une étude plus récente a montré que si les péricytes, caractérisés par l'expression du facteur de transcription Tbx8, se comporterait comme des CSMs *in vitro*, elles n'auraient, en revanche, pas les mêmes capacités de différenciation in vivo et seraient donc une entité distincte (Guimarães-Camboa et al., 2017).

La seconde hypothèse propose que les CSMs puissent avoir des origines différentes suivant leur localisation, conditionnant leurs fonctions. Le terme CSM est alors un concept qui désigne les cellules caractérisées par les propriétés que nous avons énoncées plus tôt sans s'avancer sur leur origine embryologique. La CSM peut alors être d'origine mésodermique ou ectodermique ce qui conditionne donc en partie sa fonction *in vivo*. Isern et al. ont ainsi suivi différents types de cellules stromales de la moelle osseuse durant le développement embryonnaire murin. Ils ont montré que, durant l'embryogenèse d'un modèle nestin-GFP, les CSMs nestin+ sont distinctes en terme de fonction des précurseurs

ostéochondraux nestin-, les premiers ne participant pas à la chondrogenèse foetale. Pourtant, *in vitro*, les deux populations répondent aux mêmes propriétés définissant les CSMs : formation de colonies et différenciation dans les trois lignées. C'est *in vivo*, que ces CSMs issues de la crête neurale suivent une voie différentes pour donner des cellules spécialisées dans la fonction de support de l'hématopoïèse (Isern et al., 2014). Plus récemment, Carr et al. ont mis en évidence par une approche transcriptomique (single-cell) quatre sous populations distinctes dans les nerfs périphériques, dont l'une caractérisée par une signature mésenchymateuse. Cette dernière population pdgfra positive issue de la crête neurale est capable de se différencier en cellules non nerveuses (os, cartilage et adipocytes) et de régénérer l'os et la peau (Carr et al., 2019). Enfin, une étude de "*lineage tracing*" de Xie et al. a montré que les cellules de Schwann, qui dérivent des cellules de la crête neurale, sont capables de donner des chondroprogéniteurs ainsi que des progéniteurs osseux, chez la souris et le zébrafish, argumentant encore une fois en faveur d'un lien entre cellules de la crête neurale et précurseurs mésenchymateux (Xie et al., 2019).

5.2.4. Caractérisation

En 2006, le "Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy" a proposé une liste de critères minimums pour caractériser les cellules souches mésenchymateuses, dans le but d'uniformiser les méthodes d'isolation et de culture (Dominici et al., 2006). Ces critères restent encore largement utilisés aujourd'hui même s'ils sont critiqués, car non suffisant et produisant une population hétérogène (Caplan, 2017b)(Wang and Han, 2019). Ainsi, pour être considérée comme une CSM, la cellule étudiée doit répondre aux critères suivants :

- En culture monocouche, avoir une capacité d'adhérence au plastique

- Être CD73, CD90, CD105 positive
- Être CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a et HLA-DR négative
- Avoir une capacité à se différencier *in vitro* en ostéoblastes, en adipocytes et en chondrocytes
- Avoir des capacités d'autorenouvellement (Dominici et al., 2006)

Beaucoup de questions restent en suspens autour des CSMs et de leur définition. Celle-ci sera probablement amenée à évoluer à très court terme pour mieux refléter leur fonction et leurs propriétés (Caplan, 2017b). Il est clair que l'intérêt autour de ce type cellulaire et le nombre d'essais clinique en cours sont bien en avance sur notre compréhension actuelle de leur physiologie et fonction. La mise en évidence récente des cellules souches squelettiques humaines (PDPN+CD146−CD73+CD164+), des précurseurs capable de se différencier en cartilage et en os, mais pas en adipocytes, remet également en cause les méthodes de caractérisation et d'isolation actuelle (Chan et al., 2018). Il y a fort à parier qu'une classification plus complexe verra le jour rapidement avec de nouveaux marqueurs caractérisant des sous-populations.

À ce propos, un nombre de marqueurs déjà connus pour être exprimés par certaines populations de CSMs, mais différents de la définition de 2006, doivent faire l'objet d'un développement particulier. En effet, leur expression est directement liée à des fonctions de la CSM, ce qui, dans la recherche d'une meilleure efficacité de la thérapie cellulaire, mérite qu'on s'y attarde.

5.2.4.1. Stro-1

Il est exprimé par les CSM issues de la membrane synoviale, de la pulpe dentaire et de la caduque basilaire (Huang et al., 2009)(Hermida-Gómez et al., 2011) (Castrechini et al.,

2012). Comparées aux CSMs isolées grâce à leur propriété d'adhérence au plastique, les CSMs sélectionnées selon l'expression de Stro-1+ ont des capacités de prolifération supérieurs (CFU), stimulent la formation de tube par les cellules endothéliales et la prolifération des cellules cardiaques (Psaltis et al., 2010). Ce marqueur semble donc impliqué dans les capacités à former des colonies, de migration et l'angiogenèse en stimulant la production de CXCL12 et d'*hepatocytes growth factor* (HGF). Les CSMs stro-1+ semblent alors particulièrement indiquées dans la thérapie cellulaire en cardiologie (Psaltis et al., 2010).

5.2.4.2. CD271

Aussi appelé "*low affinity nerve growth factor receptor*" (LNGFR), il s'agit d'un récepteur des neurotrophines, des protéines qui favorisent la survie et la différenciation des cellules neuronales (Ebendal, 1992). Les CSMs CD271+ ont des propriétés immunosuppressives supérieures aux CSMs adhérentes au plastique. Elles présentent également la particularité de favoriser la prise du greffon chez la souris, dans un modèle de greffe de cellules souches hématopoïétiques (Kuçi et al., 2010). Dans l'arthrose, Ce marqueur est augmenté, principalement dans la membrane synoviale. Cela traduirait une réponse aux stress et aux traumatismes, les CSMs CD271+ présentant des capacités de réparation du cartilage plus importante (Hermida-Gómez et al., 2010).

5.2.4.3. CD146

Le CD146 (ou MCAM pour "*melanoma cell adhesion molecule*") est exprimé par une grande part des CSMs indépendamment de leur source, à l'exception des CSMs de la peau (Kozlowska et al., 2019). Il est diminué en fonction de l'âge du donneur (Maijenburg et al., 2012) (Siegel et al., 2013) et disparait, *in vitro*, avec la succession des passages et la

sénescence réplicative chez les BM-CSMs. L'expression de surface du CD146 serait en effet corrélée avec la prolifération (Sorrentino et al., 2008). De plus, les cellules souches hématopoïétiques cocultivées avec les CSM CD146+ maintiennent leur capacité à former des colonies au cours du temps, témoignant d'une fonction de support de l'hématopoïèse plus importante pour cette sous-population de CSMs (Sorrentino et al., 2008). L'expression du CD146 serait également associé à des propriétés proangiogéniques, une capacité de migration et de différenciation ostéogénique *in vivo* plus élevées (Harhouri et al., 2010)(Harkness et al., 2016). Enfin, en ingénierie tissulaire, les AD-MSCs CD146+ seraient plus efficaces pour régénérer le cartilage avec certains modèles de support (Li et al., 2019b).

5.2.4.4. CD106

Le CD106 (ou VCAM-1 pour "vascular cell adhesion molecule -1") est une protéine d'adhésion. Elle permet la liaison aux cellules souches hématopoïétiques et, probablement par ce biais, est l'un des médiateurs de la capacité d'immunomodulation des CSMs (Simmons et al., 1992)(Ren et al., 2010)(Yang et al., 2013). Les CSM CD106+ présentent également des capacités de différenciation augmentée vers l'adipogenèse et diminuée en ce qui concerne la formation de colonies et l'ostéogenèse (Fukiage et al., 2008)(Yang et al., 2013). Enfin, cette population est caractérisé par une surexpression d'un grand nombre de gènes impliqués dans l'angiogenèse (dont l'HGF et le VEGFα) se traduisant par leurs capacités d'induction de l'angiogenèse importante *in vitro* et *in vivo*, soulignant l'intérêt de ce marqueur pour l'angiogenèse thérapeutique (Du et al., 2016).

5.2.4.5. Nestin

La protéine des cellules souches neuroépithéliale ou Nestin (pour "neurectodermal stem cell marker") est une protéine des filaments intermédiaires de type VI initialement

mise en évidence sur les cellules souches neurales (Bernal and Arranz, 2018). Elle est principalement exprimée au niveau des nerfs où elle est impliqué dans la croissance de l'axone (Michalczyk and Ziman, 2005). La nestin caractérise également un certain nombre de progéniteurs où elle serait impliquée dans les fonctions des cellules souches incluant l'auto-renouvellement, la migration et les capacités de différenciation (Bernal and Arranz, 2018). Les CSMs Nestin+ semblent associés spatialement aux cellules souches hématopoïétiques, suggérant un rôle de soutien. En effet, la déplétion des cellules Nestin+ entraine une réduction importante du pool de cellules souches hématopoïétique dans la moelle osseuse (Méndez-Ferrer et al., 2010).

5.2.5. Propriétés et fonctions dans l'articulation

Les CSMs sont présentes dans tous les compartiments de l'articulation (Figure 6) où elles participent au maintien de l'homéostasie articulaire grâce, principalement, à leurs propriétés immunomodulatrices et trophiques.

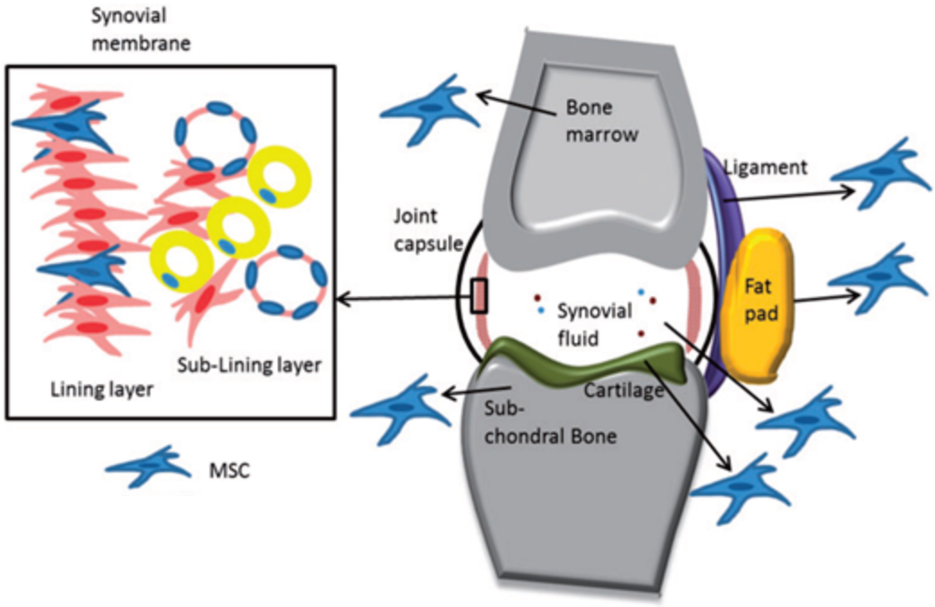


FIGURE 6 : LOCALISATION DES CSMS DANS L'ARTICULATION

5.2.5.1. Propriétés immunomodulatrices des CSMs

Lorsqu'il y a un dommage, les CSMs réagissent de deux manières. D'abord, elles peuvent participer directement à la réparation du tissu en proliférant puis en migrant pour s'accumuler au niveau des sites des lésions (Shah et al., 2009)(Fu et al., 2019). Leurs propriétés leurs permettent également de jouer un rôle indirect en sécrétant certains facteurs en réponse à ces signaux d'alarmes ou en modulant l'activité des autres effecteurs par communication par contact cellule-cellule. De cette manière, en réponse à un environnement inflammatoire, les CSMs vont sécréter des facteurs immunosuppresseurs comme l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), la prostaglandine E2 (PGE2), le TGFβ, and l'IL-10 et orienter les lymphocytes T vers un phénotype T régulateur. À l'inverse, dans un contexte non ou peu inflammatoire, les CSMs peuvent activer les lymphocytes T (Figure 7) (Li and Hua, 2017). Les CSMs peuvent potentiellement interagir avec chacun des effecteurs de l'immunité par leur biais de ces facteurs solubles. Ceux-ci empêchent la différenciation, la prolifération et l'activation des cellules de l'immunité, exerçant ainsi une réponse anti-inflammatoire et inhibant la réponse immunitaire (Figure 7). Les différents facteurs sécrétés et leurs effets sont récapitulés dans le Tableau 1 : Mécanismes des fonctions immunomodulatrices des CSMs (Li and Hua, 2017).

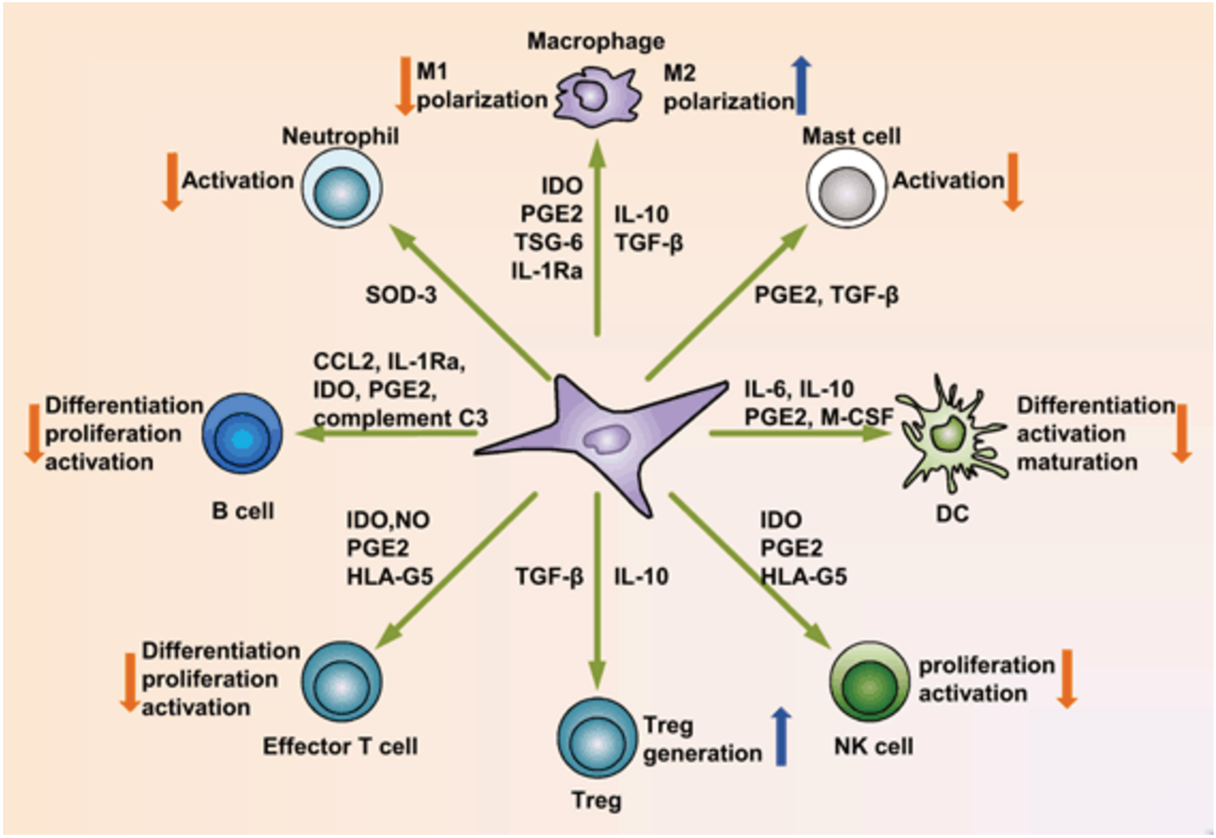


FIGURE 7 : PROPRIETES IMMUNOMODULATRICES DES CSMS (LI AND HUA, 2017)

Table 1 The functions of MSCs in regulating different immune cells and the related mechanisms

Immune cell type	MSC function	Mechanism
T cell	Suppressing T cell differentiation, proliferation, activation, and survival	TGF-β, HGF, IDO, NO, PGE2, HLA-G5, TSG6, IL-10, EVs
		Cell–cell contact: Fas/FasL signaling
	Promoting T cell recruitment	CXCR3 ligands, CCR5 ligands, ICAM-1, VCAM-1
B cell	Suppressing B cell differentiation, proliferation, activation, and chemotaxis; Breg induction	CCL2, IL-1Ra, IDO, PGE2, complement C3, EVs
		Cell–cell contact: PD-1/PD-L1
	Promoting B cell differentiation, proliferation, and activation	VEGF
DC	Suppressing DC differentiation, activation, endocytosis, migration, and maturation	IL-6, IL-10, M-CSF, PGE2, EVs
		Cell–cell contact: notch pathway activation
Macrophage	Suppressing M1 while inducing M2 polarization	PGE2, IDO, IL-1Ra, IL-10, TSG-6, TGF-β, exosomes
NK cell	Suppressing NK cell proliferation, migration, and activation	IDO, PGE2, HLA5, EVs
		Cell–cell contact: CD73, TLR4
	Promoting NK cell progenitor proliferation and NK activation	CCL2
Neutrophil	Suppressing neutrophil activation, recruitment, neutrophil extracellular trap formation, and protease secretion	Superoxide dismutase-3, EVs
	Promoting survival and recruitment	IL-6, IL-8, MIF, IFN-β, and GM-CSF
Mast cell	Suppressing mast cell degranulation, inflammatory cytokine secretion, and chemotaxis	PGE2 and TGF-β1

TABLEAU 1 : MECANISMES DES FONCTIONS IMMUNOMODULATRICES DES CSMS (LI AND HUA, 2017)

5.2.5.2. Fonctions trophiques des CSMs

Les CSMs de l'articulation ont également une fonction de support trophique pour le cartilage. En effet, en partie par leur sécrétome, les CSMs vont réguler le phénotype des chondrocytes. Dans l'articulation saine, il existe donc un équilibre entre les CSMs, les chondrocytes et leur microenvironnement. Les trois effecteurs sont en communication permanente pour permettre une réponse aux stress efficaces. Ainsi, dans la coculture de chondrocytes avec des CSMs en transwell se traduit par une stimulation de la chondrogenèse et une augmentation de la production de matrice extracellulaire (Pleumeekers et al., 2018). Sur le même principe, les chondrocytes de patients atteints d'arthrose voient leurs marqueurs de fibrose (collagène 3) et d'hypertrophie (MMP13)

diminué par une coculture de deux jours avec des CSMs en transwell (Maumus et al., 2013). Dans une étude similaire, Platas et al. ont montré que le surnageant de CSMs avait des propriétés bénéfiques sur les chondrocytes de patients OA traités par l'IL1β. Le milieu conditionné réduit les marqueurs de sénescence observés chez ces chondrocytes : expression des CKI, niveau de β-galactosidase acide, marqueurs de réponse aux dommages à l'ADN (Zhou et al., 2019). Tous ces résultats soulignent ce rôle chondroprotecteur des CSMs dans l'articulation.

L'ensemble de ces propriétés explique l'engouement autour des CSMs dans la médecine régénératrice, entre autre dans l'arthrose. L'injection locale de CSMs en cours d'étude dans le traitement de l'arthrose montre déjà des résultats prometteurs et pourra prochainement, potentiellement, intégrer l'arsenal thérapeutique des rhumatologues.

5.2.6. Le vieillissement des cellules souches/stromale mésenchymateuses

5.2.6.1. Pertes des propriétés des CSMs

Les propriétés et fonctions décrites jusqu'à présent décrivent un état physiologique. Néanmoins, il est considéré que les capacités des CSMs commencent à décliner à partir de 30 ans (Baker et al., 2015). Le vieillissement impacterait donc les propriétés des CSMs potentiellement de façon à ce que cette perte de fonction mette à mal les différents équilibres au sein de l'articulation : formation/résorption osseuse et équilibre CSMs/chondrocytes/micro-environnement. Ces évènements amenant ainsi en partie aux pathologies rhumatologiques du sujet âgé.

5.2.6.1.1. Immunophénotype

Plusieurs études se sont intéressées aux marqueurs de surface des CSMs en fonction de l'âge des donneurs. Maijenburg et al. ont ainsi mis en évidence des sous-populations

différentes en fonction de l'âge du donneur. Les CSMs CD271-/CD146+ seraient "foetales" (15-20 semaines de grossesse) tandis que CSMs CD271+/CD146+ seraient caractéristiques des donneurs jeunes (issu d'os foetaux et de donneurs <16ans). Avec l'âge, les CSMs perdraient le CD146 et la population CD271+/CD146- deviendrait dominante (Maijenburg et al., 2012). Siegel et al. quant à eux, ont montré des corrélations négatives entre les expressions des marqueurs de surface CD90, CD106, CD140b, CD146, CD166 et CD274 et l'âge du donneur (Siegel et al., 2013). Les autres études ayant tenté de caractériser l'immunophénotype des CSMs en fonction de l'âge n'ont pas montré de différence à ce niveau (Mareschi et al., 2006)(Wagner et al., 2009)(Fan et al., 2010). Néanmoins, les CSMs utilisées dans ces dernières études ont subi plusieurs passages en culture ce qui est susceptible de modifier leurs marqueurs de surface (Wang and Han, 2019).

5.2.6.1.2. Propriétés de différenciation

Chez l'Homme, Les études ayant tenté de comparer les capacités de différenciation *in vitro* des CSMs à passage 0 ou 1, suivant l'âge des donneurs, n'ont pas mis en évidence la moindre différence (Wagner et al., 2009)(Siegel et al., 2013). Les autres études ont utilisé des CSMs après expansion *in vitro*, ce qui est susceptible de modifier leurs caractéristiques.

5.2.6.1.3. Profil génétique

Pour tenter d'expliquer le déclin fonctionnel des CSMs avec l'âge, deux études se sont intéressées au profil génétique de ces CSMs. La première a comparé des CSMs à passage 2 correspondant à 3 groupes d'âge : jeune 21-25 ans, moyen 44-55 ans et vieux 80-92 ans. 67 gènes sont surexprimés avec l'âge tandis que 60 sont réprimés. La plupart des gènes surexprimés chez les CSMs de donneurs âgés concernent la régulation de la matrice extracellulaire, le développement du mésoderme, l'endocytose et la chimiotaxie. À l'inverse,

les fonctions des gènes réprimés avec l'âge renvoient vers la réparation de l'ADN, la mitose et la régulation transcriptionnelle (Wagner et al., 2009). Plus récemment, Wu et al. ont comparé les profils de CSMs de patients d'âge moyen à celles de patients âgés. Leur analyse bio-informatique révèle une forte association des gènes CTNNB1 (β-caténine), FYN, PPP2R1A, MAPK1 and EP300 avec le vieillissement des CSMs (Wu et al., 2019). Et les fonctions et processus biologiques mis en évidence concernent entre autres les jonctions cellulaires, la réponse au stress oxydant, l'attrition des télomères, la différenciation et la régulation épigénétique (Wu et al., 2019).

5.2.6.2. Causes du vieillissement des CSMs

Ce phénomène de vieillissement des CSMs et les changements associés pourraient s'expliquer de plusieurs manières.

5.2.6.2.1. L'inflammaging

La première théorie se base sur l'influence du micro-environnement. L'"*inflammaging*" désigne cette inflammation chronique de bas grade qui se développe avec l'âge et qui prédit la susceptibilité aux pathologies liées à l'âge (Franceschi et al., 2017). Dans le contexte du sujet âgé, les CSMs vont donc être constamment exposées à un milieu plus inflammatoire et hostile. Les expériences chez la souris suggèrent ainsi que le microenvironnement âgé réprime les fonctions des cellules souches adultes. Alors qu'à l'inverse, exposer les cellules souches âgées à un microenvironnement jeune va restaurer certaines de ces fonctions (Conboy et al., 2005).

5.2.6.2.2. "Le syndrome d'épuisement des cellules souches"

Deuxième paramètre, le syndrome d'épuisement des cellules souches. Lorsque l'organisme subit un traumatisme, les cellules souches vont recevoir des "signaux

d'alarmes", proliférer, migrer et s'accumuler au niveau des sites des lésions pour favoriser la réparation tissulaire (Shah et al., 2009). Si ces traumatismes sont répétés ou si le patient est sujet à une maladie chronique, le pool de cellules souches arriverait à ses limites et ne serait plus capable de remplir sa mission (Figure 8 : Théorie de l'épuisement des cellules souches (Mansilla et al., 2011)) (Mansilla et al., 2011).

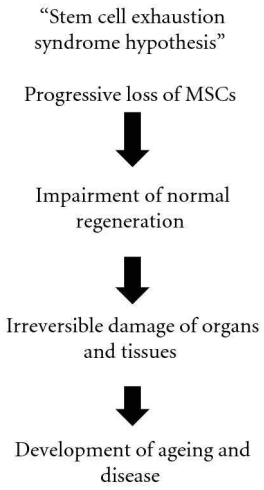


FIGURE 8 : THEORIE DE L'EPUISEMENT DES CELLULES SOUCHES (MANSILLA ET AL., 2011)

Le syndrome métabolique désigne un ensemble de symptômes avant coureur de pathologies métaboliques et cardiovasculaires. Il est lié à l'âge et caractérisé par la présence d'au moins trois symptômes parmi les suivants : surpoids (principalement obésité abdominal), hyperinsulinémie, hypertriglycéridémie, hypercholestérolémie, et hypertension (Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2001). On retrouve également assez couramment, chez ces patients, une lipodystrophie, suggérant une orientation des CSMs vers l'adipogenèse. C'est un paramètre qui est également commun à l'âge et à certains syndromes progéroïdes (Coutinho et al., 2009). Dans ces contextes, la lipodystrophie et donc la stimulation de la différenciation adipogénique, aurait pour conséquence un épuisement des CSMs à l'origine de leur dysfonction (Mansilla et al., 2011).

5.2.6.2.3. La sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire désigne un syndrome caractérisé par un arrêt robuste de la prolifération, une résistance à l'apoptose et un sécrétome particulier (Tachikart et al., 2019). Ce phénomène sera développé plus en détails, dans une partie consacrée. Ce que l'on peut déjà dire à présent, c'est que deux études ont mis en évidence un ralentissement de la prolifération plus précoce chez les CSMs humaines issus de patients d'âge plus avancés par rapport à des donneurs jeunes (Mareschi et al., 2006)(Fan et al., 2010). On peut suggérer que ces résultats traduisent le fait que ces CSMs de patients âgés présenteraient des télomères plus courts et donc une entrée en sénescence réplicative plus précoce. Cette hypothèse va dans le sens des études des profils génétiques des CSMs âgées décrit plus haut. Wagner et al. qui ont ainsi montré que la sénescence réplicative in vitro et l'âge du donneur se traduisaient par des similarités dans les profils transcriptomiques obtenus (Wagner et al., 2009). De la même manière, Wu et al. ont relevé par approche bioinformatique l'attrition des télomères comme processus biologique caractérisant les CSMs de patients vieillissant (Wu et al., 2019). Cette sénescence réplicative pourrait également être une explication à la théorie d'"épuisement des cellules souches" que nous venons de développer. En effet, les CSMs sénescentes ont des capacités de différenciation *in vitro* altérée (Khanh et al., 2018) et par définition un sécrétome potentiellement délétère suggérant une altération de leur fonction physiologique au sein de l'articulation.

Tous ces éléments suggèrent que le vieillissement et la sénescence pourraient contribuer à l'altération de la fonction physiologique des CSMs au sein de l'articulation. Ces phénomènes sont à prendre en compte à la fois dans l'étude de la pathologie arthrosique mais également dans les études de thérapie cellulaire mettant en jeu les CSMs. La sénescence des CSMs comme cause de la rupture de l'équilibre articulaire menant à

l'arthrose a ainsi été l'une de nos hypothèses et l'un des axes de notre travail. Nous y reviendrons donc, après avoir introduit l'arthrose et le rôle supposé de la sénescence dans cette maladie.

5.3. L'Arthrose (OA)

Une rupture de l'homéostasie entre les trois compartiments, par l'accumulation de stress mécanique, inflammatoire, ou à cause de signaux développementaux aberrants (voie NOTCH ou TGFβ), peut mener à une dégradation du cartilage et donc au phénotype arthrosique.

5.3.1. Introduction

L'arthrose est la pathologie rhumatologique articulaire la plus fréquence : elle a été longtemps considérée comme une atteinte exclusivement dégénérative, même si des travaux récents lui confèrent également une composante inflammatoire et métabolique. Alors qu'une articulation est maintenue saine grâce à l'homéostasie entre les différents compartiments articulaires, comme introduit plus haut, une articulation arthrosique est caractérisée par une altération progressive de ces trois compartiments, avec 1- une destruction du cartilage et un rétrécissement de l'interligne articulaire, 2- une hypertrophie de la membrane synoviale qui s'enflamme et se fibrose et 3-, au niveau osseux , une sclérose de l'os sous-chondrale et une néoformation osseuse péri-articulaire appelée ostéophytose (Figure 9).

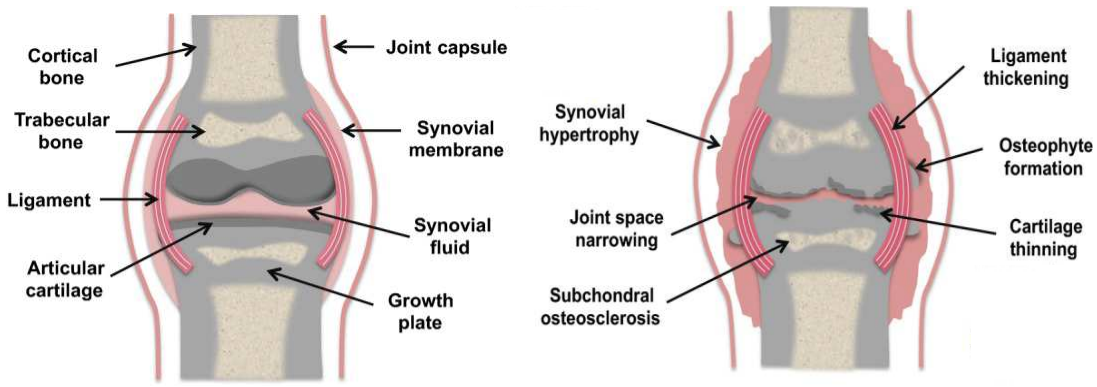


FIGURE 9 : COMPARAISON ENTRE UNE ARTICULATION SAINE ET UNE ARTICULATION ARTHROSIQUE (ADAPTEE DE (MCCULLOCH ET AL., 2017))

5.3.2. Epidémiologie

L'arthrose est la pathologie rhumatologique la plus fréquente. Rien qu'en France, elle touche environ 10% de la population tout âge confondu, plus d'un tiers quand on s'intéresse aux plus de 60 ans (Lawrence et al., 2008). C'est la 11e pathologie la plus pourvoyeuse de handicap (Cross et al., 2014), ce qui explique son coût pour la collectivité déjà estimé à 1,6 milliard d'euros en 2002 (Le Pen et al., 2005). Elle entraîne une incapacité de travail prolongée, l'isolement social et une détérioration de la qualité de vie du patient. C'est une pathologie complexe mettant en jeu des facteurs mécaniques, cellulaires et biochimiques (Johnson and Hunter, 2014). Le principal facteur de risque est l'âge, le phénomène de sénescence cellulaire pouvant l'expliquer en partie. Viens ensuite le genre : une femme, essentiellement à partir de la ménopause, a 1,7 fois plus de risque de développer la pathologie par rapport à un homme (Felson et al., 1995). Ces patientes présentent aussi des phénotypes de la maladie plus sévères (Srikanth et al., 2005). La susceptibilité génétique est également très importante, comptant pour 60% des arthroses de la main et de la hanche et jusqu'à 40% des arthroses du genou (Spector and MacGregor, 2004). Enfin, l'obésité, la diète (influençant l'accumulation de stress oxydant), la sédentarité, la force musculaire sont

autant d'autres facteurs influençant le développement de la pathologie (Johnson and Hunter, 2014). A côté de ces facteurs de risque « généraux », il existe également des facteurs de risque locaux avec un trouble des axes anatomiques, une pathologie méniscale ou une maladie par accumulations de cristaux.

Côté clinique, l'arthrose peut toucher toutes les articulations, mais touche essentiellement les articulations des mains, hanches et genoux, plus rarement des épaules et les chevilles. Pour simplifier, on peut distinguer les arthroses qu'on pourrait qualifier de « spontanées » des dites post-traumatiques qui surviennent après une blessure (Thomas et al., 2017). Alors qu'il est considéré qu'une gonarthrose spontanée liée à l'âge se développe sur une trentaine d'années, des patients peuvent présenter une gonarthrose symptomatique seulement 10 ans après une blessure au genou (Øiestad et al., 2009). De même, il existe plusieurs phénotypes d'évolution : lente, par pousée et rapidement destructrice (avec une progression visible en une seule année). Devant l'hétérogénéité des facteurs, des localisations et des contextes, il paraît nécessaire de considérer l'arthrose comme un syndrome (défini comme des douleurs liées la destruction du cartilage) plutôt qu'une pathologie homogène. Ce point de vue pourra ouvrir la voie à une meilleure classification des patients et des prises en charge personnalisées et plus efficaces.

5.3.3. Diagnostic

La douleur est le premier signe d'alerte. Elle est fonction de l'articulation touchée selon qu'elle soit plus ou moins sollicitée. Elle est souvent diffuse et globale, soulagée au repos, a un rythme mécanique et a été décrite comme évoluant selon 3 phases (Hawker et al., 2008) :

- Phase 1 (arthrose débutante) : douleur aiguë et prédictible, souvent liée à un « déclencheur » (sollicitation de l'articulation durant une activité physique importante)

- Phase 2 : douleur prédictible, mais de plus en plus fréquente, associée à des rigidités imprévisibles de l'articulation. Impact sur la vie quotidienne

- Phase 3 : douleur constante, ponctuée par des épisodes imprévisibles et intenses. Fort retentissement sur la vie quotidienne

Une limitation de l'amplitude du mouvement (lié à la présence d'ostéophytes, des néoformations d'os), un gonflement, une déformation (signe d'une arthrose avancée), et une instabilité de l'articulation sont d'autres signes associés. Le diagnostic de l'arthrose peut être purement clinique si les signes sont typiques et si le patient appartient aux groupes « à risque » : articulation périphérique touchée, douleur à la mobilité, âge > 45 ans, rigidité matinale < 30 min (National Collaborating Centre for Chronic Conditions (UK), 2008).

Néanmoins, en cas de doute diagnostic des examens supplémentaires peuvent être demandés pour rechercher une inflammation (CRP, vitesse de sédimentation, qui seront toutes deux négatives dans le cas de l'arthrose), ou pour exclure une pathologie auto-immune (facteur rhumatoïde, anticorps anti-peptide cyclique citrunillés, etc). La ponction articulaire pourra être envisagée pour rechercher des cristaux d'acide urique ou de pyro-phosphate de calcium qui poserait un diagnostic d'arthropathie micro-cristalline. Enfin, pour l'évaluation de la sévérité et le suivi de l'évolution de la pathologie, l'imagerie, et principalement la radiographie, sera l'examen de choix (Sakellariou et al., 2017).

La radiographie conventionnelle (imagerie par rayon X) est l'examen d'imagerie le plus classiquement utilisée dans l'arthrose. Il s'agit de chercher les signes typiques, notamment des ostéophytes (néo-formation d'os), un rétrécissement de l'espace inter-articulaire et une sclérose de l'os sous-chondrale (Hayashi et al., 2016). Pour la gonarthrose, la sévérité de la pathologie sera classée selon les grades de Kellgren et Lawrence. Néanmoins, les patients se plaignant de douleurs conduisant à une suspicion d'arthrose et

un examen, ne présenteront pas forcément une arthrose "radiographiques". Et inversement, la présence de signes à la radiographie ne signifie pas systématiquement que le patient sera douloureux (Kim et al., 2015). L'arthrose radiographique sera même, fréquemment, une découverte fortuite chez les personnes âgées. L'imagerie par résonnance magnétique (IRM) pourra être utilisée pour mettre en évidence des stades précoces de la maladie, là où les signes ne seront pas visibles à la radiographie, permettant notamment de voir les atteintes précoces d'oedème de l'os sous-chondral. L'IRM a également l'avantage de permettre d'observer des signes de la pathologie sur les structures de l'articulation non visibles à la radiographie comme les ligaments et la membrane synoviale. Enfin, dernière possibilité du praticien en terme d'examens d'imagerie, l'ultrasonographie peut permettre la détection d'inflammation de la synoviale, d'ostéophytes ou encore d'épanchement articulaire.

5.3.4. Prise en charge

La prise en charge associe à la fois des mesures non pharmacologiques et pharmacologiques. Parmi les traitements non médicamenteux, le patient devra mettre en place des mesures pour éviter la sollicitation de l'articulation arthrosique en périodes douloureuses, tandis qu'une activité physique modérée (la marche quotidienne en est un exemple) ou de la rééducation sera conseillée hors des poussées. Les mesures hygiéno-diététiques ont aussi leur place pour favoriser une perte de poids, et diminuer les contraintes sur les articulations porteuses dans la gonarthrose pour ne citer que ce cas. Du côté des mesures pharmacologiques, le traitement médicamenteux doit prendre en compte le nombre d'articulations symptomatiques et les co-morbidités du patient. A ce jour, aucun traitement médical curatif n'est disponible pour le traitement de l'arthrose. Les nouveaux "médicaments symptomatiques à action lente" récemment proposés, tels que l'injection conjointe de glucosamine ou d'acide hyaluronique, n'ont pas encore démontré d'efficacité

sur le remodelage structurel de l'articulation à long terme (McAlindon et al., 2014). Une méta-analyse récente a montré que ces injections n'étaient efficaces que sur la douleur et non sur la mobilité de l'articulation (Ogata et al., 2018). De même les études cliniques sur les anti-IL1 et les anti-TNF n'ont pas montré d'efficacité significative (Cohen et al., 2011)(Chevalier et al., 2011). Le clinicien n'a donc, à sa disposition, que les analgésiques symptomatiques (topiques locaux ou systémique, palier I ou II) et la physiothérapie qui restent les principales alternatives avant le remplacement de l'articulation touchée par une chirurgie orthopédique.

5.3.5. Une pathologie liée à la sénescence

L'étiologie de cette pathologie commence à être comprise. Plusieurs structures de l'articulation jouent un rôle dans le développement de l'arthrose. D'abord, évidemment, le cartilage, en exprimant des marqueurs hypertrophiques, cataboliques et fibrotiques, mais aussi la membrane synoviale et l'os sous-chondral (Loeser, 2009). Cette membrane synoviale, qui a une fonction "nourricière" pour l'articulation, acquiert pendant le développement de l'arthrose un phénotype inflammatoire et hypertrophique, et ainsi contribue à la gravité des symptômes, à la formation d'ostéophytes et même à l'érosion articulaire (Scanzello and Goldring, 2012). De même, le remodelage de l'os subchondral, situé sous le cartilage articulaire, n'est pas seulement une conséquence mais aussi une composante active de la maladie, générant douleur et perte de la fonction articulaire (Yu et al., 2016). Pour expliquer la physiopathologie de l'arthrose, différentes voies moléculaires et cellulaires ont été proposées (Goldring and Goldring, 2010).

L'implication de la sénescence en tant qu'élément causal de la pathologie a été suggéré au début des années 2000 avec la détection, dans le cartilage arthrosique, de chondrocytes positifs pour $p16^{INK4a}$ positifs avec des télomères courts (Martin and

Buckwalter, 2001)(Martin and Buckwalter, 2002). Une autre étude a ensuite démontré que la surexpression in vitro de $p16^{ink4a}$ dans un modèle in vitro de culture 3D de cartilage pouvait favoriser la production de MMP-1 et 13, des métalloprotéases capables de dégrader la matrice cartilagineuse et déjà connus comme étant des drivers de la pathologie (Philipot et al., 2014).

Mais il a fallu attendre les modèles transgéniques INK-ATTAC et P16-3MR précédemment décrits, pour que la démonstration définitive du rôle central de la sénescence dans l'arthrose puisse être apportée (Jeon et al., 2017a). Sur l'un des deux genoux, une OA post-traumatique par section transversale du ligament croisé antérieur a été réalisée sur des souris p16-3MR âgées de deux mois. Au jour 13, L'injection intra-articulaire de luciférine chez ces animaux a révélé une accumulation transitoire de cellules sénescentes positives pour $p16^{INK4a}$ (Jeon et al., 2017). Jeon et collaborateurs montrent également, par immuno-marquage la présence de cellules sénescentes dans le tissu synoviale et dans les zones superficielles du cartilage (Jeon et al., 2017). Pour déterminer si ces cellules articulaires sénescentes jouent un rôle actif dans l'apparition de cette arthrose post-traumatique induite, Jeon et collaborateurs ont aussi réalisé des injections intra-articulaires de ganciclovir sur le genou ayant subi une intervention chirurgicale. De manière remarquable, l'élimination locale de ces cellules sénescentes s'est trouvée associée, lors du sacrifice des animaux, à une dégradation moindre du cartilage, ainsi qu'une expression diminuée de marqueurs inflammatoires et de marqueurs cataboliques tel que l'IL1β et la MMP-13 (Jeon et al., 2017). Un deuxième intérêt de cette étude a été de montrer que chez les souris traitées, un environnement "pro-chondrogénique" se mettait en place. En effet, après élimination des cellules sénescentes, l'articulation présentait des niveaux d'expression plus élevés de deux marqueurs pro-chondrogéniques, le collagène de type IIα1 et l'aggrecan,

démontrant ainsi le rôle délétère de la sénescence sur la régénération du cartilage (Jeon et al., 2017a). Pour fournir un autre argument convaincant, les auteurs ont utilisé le deuxième modèle transgénique INK-ATTAC pour étudier l'apparition spontanée de l'arthrose chez les souris âgées. La sénolyse à partir du 12e mois de vie de ces animaux, et ce, jusqu'à leur décès, par traitement par AP20187, maintient le cartilage en bonne santé, réduisant ainsi l'apparition de signes d'arthrose spontanée liés à l'âge (Jeon et al., 2017).

5.4. La sénescence cellulaire

5.4.1. Historique

En 1912, Alexis Carrel (prix Nobel de physiologie et de médecine cette même année) démarre une expérience au cours de laquelle il entretient une culture de cellules de cœur d'embryon de poulet. Il prétend être parvenu à maintenir ces cellules vivantes et proliférantes durant plus de 10 ans (soit plus que la durée de vie de l'animal), simplement en changeant régulièrement le milieu de culture (Ebeling). Cette expérience donne lieu à la théorie, en vogue durant cette période, de l' « immortalité de la cellule ». En réalité, les techniciens de ce laboratoire auraient ajouté de temps en temps de nouvelles cellules dans ces boites de pétri, pour « ne pas le décevoir », ce qui explique pourquoi cette expérience n'a jamais pu être reproduite (Witkowski, 1980). Néanmoins, il faut attendre les années 60 pour que cette théorie soit réfutée. Leonard Hayflick propose que les cellules différenciées ne puissent réaliser qu'un nombre limité de division cellulaire (Hayflick and Moorhead, 1961). Son premier manuscrit est rejeté par Francis Peyton Rous (prix Nobel de physiologie et de médecine en 1966), arguant que ses résultats ne sont qu'un artéfact et qu'ils peuvent s'expliquer par une contamination. Pour démontrer son hypothèse, L.Hayflick s'associe à un cytogénéticien, Paul Moorhead et réalisent ensemble l'expérience suivante : Ils mélangent selon différents ratios des fibroblastes pré-sénescents issus de donneurs de sexe masculin, à des fibroblastes primaires issus de donneurs de sexe féminin. Après un certain nombre de repiquages de ces cultures, les cellules de donneurs de sexe masculin ne prolifèrent plus. Tandis que pour la condition de ratio égal, il ne reste que des fibroblastes de donneurs de sexe féminin, démontrant ainsi que l'arrêt de la prolifération n'est pas dû à un facteur

extérieur (Hayflick and Moorhead, 1961). C'est la naissance du concept de sénescence cellulaire.

5.4.2. Définition

La sénescence cellulaire est donc un syndrome cellulaire caractérisé par une sortie de cycle cellulaire robuste associée à un sécrétome particulier (Hayflick and Moorhead, 1961). Il peut être induit par des signaux intrinsèques, tels que l'érosion de télomères, mais également en réponse à des stimuli extrinsèques inappropriés, tels que les radicaux libres, l'exposition chronique à des cytokines inflammatoires ou à des facteurs trophiques (He and Sharpless, 2017). La sénescence est associée à des modifications de la morphologie cellulaire, qui devient hypertrophique, à des adaptations métaboliques, à des modifications épigénétiques, une signature génétique particulière (Childs et al., 2017) et un surfaçome particulier (Kim et al., 2017)(Kim et al., 2018). Les cellules sénescentes sont également résistantes à l'apoptose et peuvent présenter des défauts d'autophagie (Childs et al., 2017) (voir figure 1). Plusieurs inhibiteurs du cycle cellulaire tels que les protéines $p16^{INK4a}$ ou $p21^{waf1/Cip1}$, qui contrôlent l'activité des kinases dépendantes des cyclines, participent à l'arrêt robuste de la prolifération. Et contrairement aux arrêts du cycle qu'on peut retrouver dans la quiescence par exemple, les cellules sénescentes sont insensibles aux facteurs de croissance (He and Sharpless, 2017). Le programme de sénescence va donc induire des modifications dans les fonctions de la cellule affectée tout en poussant à l'établissement d'un phénotype de sécrétion spécifique appelé SASP pour "*senescence-associated secretory phenotype*". Ce sécrétome influence ensuite l'homéostasie des tissus environnants par la production de métalloprotéinases, facteurs inflammatoires, des chemo-attractants et / ou de croissance (Coppé et al., 2008). Plusieurs sous-ensembles de sénescence cellulaire existent, en fonction des types de cellules étudiés ou du mode d'induction (Muñoz-Espín and

Serrano, 2014)(Hernandez-Segura et al., 2018). La sénescence peut donc être considérée comme un syndrome cellulaire plutôt que comme un seul phénotype transposable à toutes les cellules sénescentes. Néanmoins, l'expression d'activités enzymatiques métaboliques telles que la β-galactosidase acide (SA-β-Gal) et une augmentation des inhibiteurs du cycle cellulaire, ou la présence de marques épigénétiques spécifiques (Booth and Brunet, 2016), sont communément acceptées comme marqueurs de sénescence. Ceci a permis aux biologistes, par des études in vitro et sur des modèles animaux, d'étudier et de révéler la présence de ces cellules dans de nombreux tissus mitotiques et post-mitotiques et tout au long de l'ontogenèse.

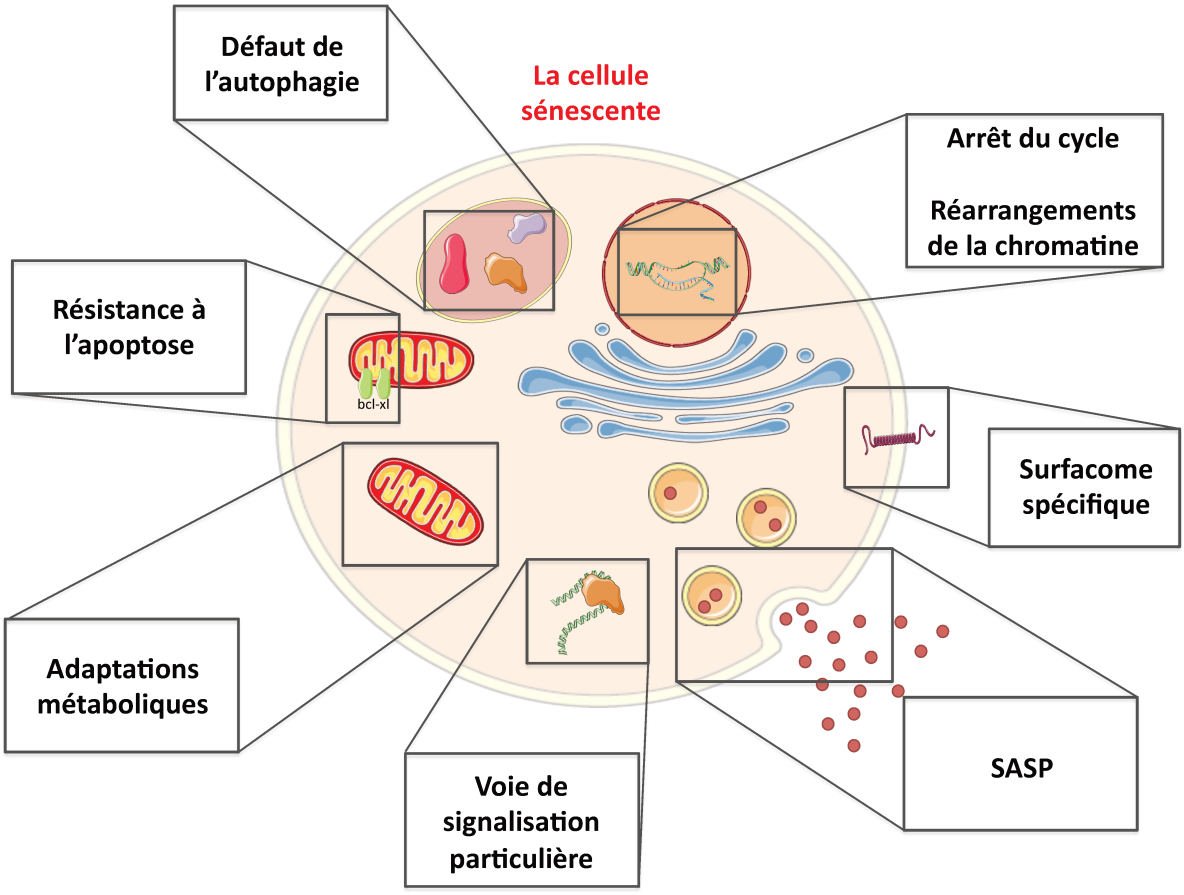


FIGURE 10 : CARACTERISTIQUES DES CELLULES SENESCENTES

5.4.3. Différents phénotypes de sénescence

Comme indiqué précédemment, différents signaux intrinsèques et extrinsèques peuvent induire un phénotype sénescent. On pourra donc distinguer plusieurs grands phénotypes suivant les inducteurs : sénescence réplicative liée à l'érosion des télomères (RIS), sénescence liée à un oncogène (OIS), lié aux dommages à l'ADN (stress génotoxique ou chimiothérapies), liée aux dysfonctions mitochondriales ou MiDAS, liée à des modifications épigénétiques, ou encore, liée à l'inflammation (IIS) ou lié à des facteurs trophiques (TIS).

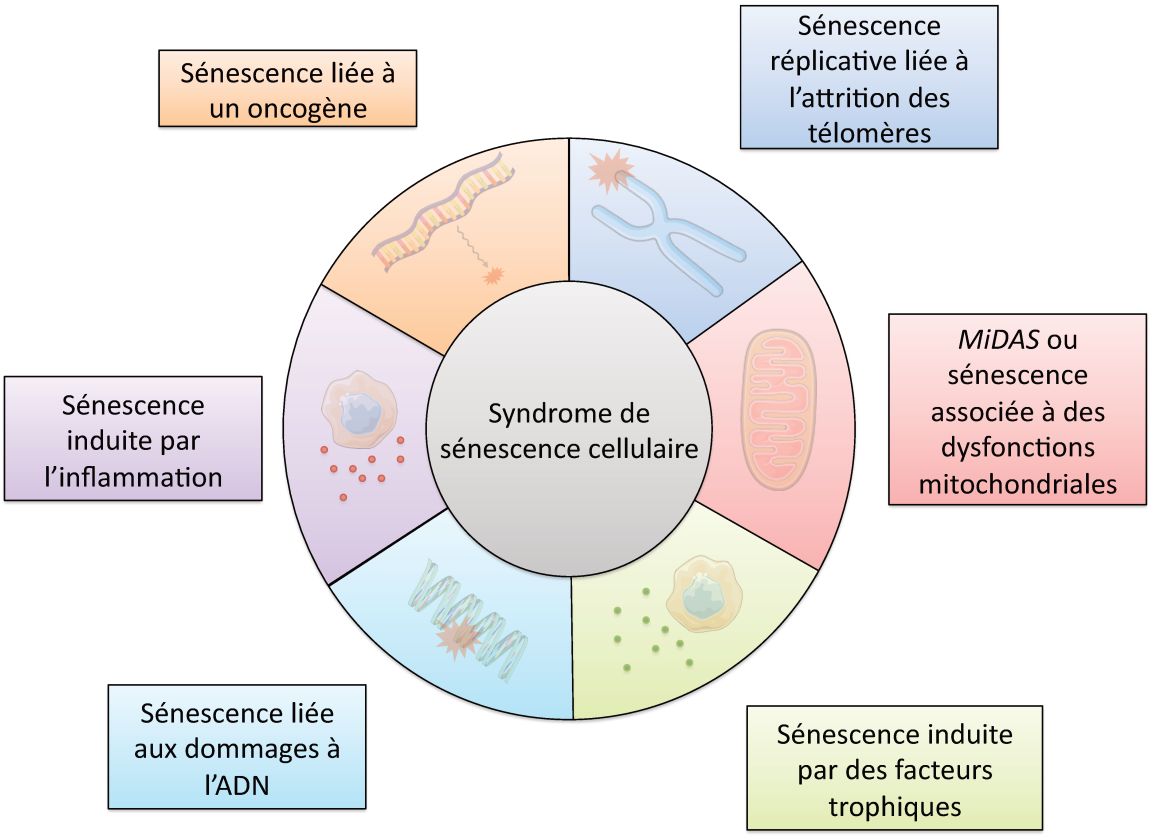


FIGURE 11 : LES DIFFERENTS PHENOTYPES DE SENESCENCE

Ainsi suivant l'inducteur mais aussi le type cellulaire concerné, le phénotype aura des particularités, que ce soit au niveau des voies moléculaires impliquées (voir figure 2) mais aussi du profil transcriptomique (Coppé et al., 2008). À titre d'exemple, le SASP d'un fibroblaste devenu sénescent après irradiation est différent de celui devenu sénescent après

un stress lié à un oncogène, avec des niveaux de sécrétions d'IL6 et d'IL1β plus faibles (Coppé et al., 2008).

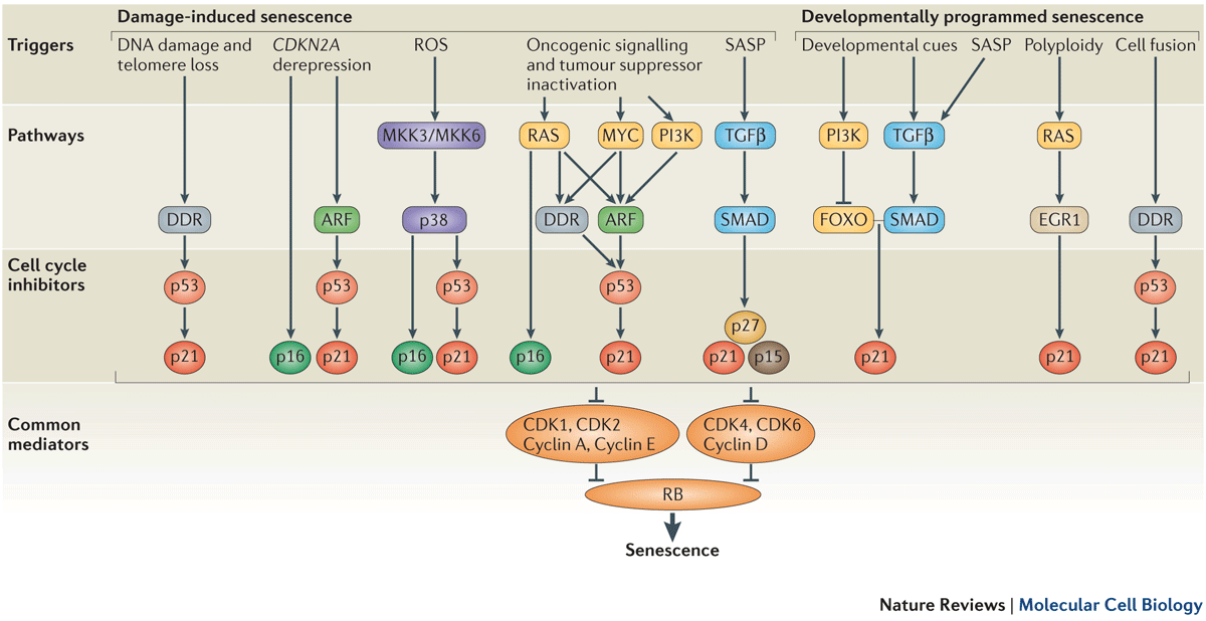


FIGURE 12 : LES DIFFERENTES VOIES MOLECULAIRES DE LA SENESCENCE (TIREE DE (MUÑOZ-ESPIN AND SERRANO, 2014))

5.4.3.1. *Télomères et sénescence*

On sait aujourd'hui qu'Hayflick a mis en évidence un type de sénescence dite « réplicative » liée au raccourcissement des télomères. Cette hypothèse avait été avancée dès 1973 par Olovnikov, qui sur des bases purement théoriques, affirma que la longueur des télomères était déterminante pour le nombre de divisions que la cellule pourrait effectuer (Olovnikov, 1973). 15 ans plus tard, Cooke et Smith comparèrent les longueurs des télomères dans différents tissues et associèrent ce paramètre avec le vieillissement (Cooke and Smith, 1986).

Les télomères sont des structures d'ADN double brins constituées de séquences « TTAGGG » ("brin G", en regard du "brin C" complémentaire "AATCCC") répétées, terminés par une séquence "brin G" simple brin (Moyzis et al., 1988). La séquence simple brin entoure

celle double brins en lasso, formant des boucles appelées "t-loops" (McElligott and Wellinger, 1997). C'est grâce à ces boucles, que le télomère peut prendre une conformation permettant la protection du chromosome. Le télomère recrute aussi les "shelterins", des complexes multiprotéiques qui se fixent à l'ADN télomérique et qui empêche le chromosome d'être reconnu par la machinerie cellulaire de réparation de l'ADN (Lange, 2005). A chaque réplication, ces télomères, situées aux extrémités des chromosomes, se retrouvent un peu plus courts (Watson, 1972)(Wu et al., 2012). Comme dans le cas d'une exposition à un stress génotoxique, cette érosion finit par toucher le chromosome ce qui active la voie de réponse aux dommages à l'ADN ("*DNA damage response*" ou "*DDR pathway*"). Notons que le stress oxydant peut aussi accélérer l'attrition des télomères (Herbert et al., 2008). Dans la plupart des situations conduisant à l'activation de la DDR (stress génotoxique, stress oxydant), la cellule parviendra à effectuer les réparations nécessaires et pourra potentiellement reproliférer. C'est dans la situation où le dommage est suffisamment important (comme c'est le cas pour l'érosion des télomères) que la cellule activera soit les voies la menant à l'apoptose, soit deviendra sénescente, avec la mise en place du phénotype et des caractéristiques énumérées en définition.

5.4.3.2. *Oncogènes et sénescence*

De nombreux oncogènes, si surexprimés, peuvent induire une sénescence prématurée. Gorgoulis VG et collaborateurs en ont listé plusieurs dizaines (Gorgoulis and Halazonetis, 2010). De la même manière, l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs comme PTEN, NF1 ou encore dans la maladie de von Hippel-Lindau, vont conduire à l'apparition de cellules sénescentes qui dans ce cas serait un mécanisme de protection face à l'apparition de tumeurs (Collado and Serrano, 2010). D'une part, l'oncogène active la voie RAS-RAF-MEK-ERK provoquant l'accumulation de stress oxydant qui peut activer la DDR (Sun

et al., 2007) (voir figure 12). $p38^{MAPK}$ ("mitogen-activated protein kinase") une protéine kinase impliquée dans la réponse à de nombreux stress (choc osmotique, inflammation, DDR, facteurs de croissance, etc), active ensuite la voie p53-p21 menant à l'arrêt du cycle (Bonney, 2017). D'autre part, l'hyperexpression d'oncogènes mène à la dérépression du locus INK4-ARF. Cela se traduit, d'un côté l'induction de $p16^{Ink4A}$, et de l'autre, par l'induction de p14ARF (voir figure 12). Certains auteurs ont proposés que la dérépression du locus INK4-ARF puisse être liée à l'induction de l'histone déméthylase JMJD3 via les protéines polycomb (Barradas et al., 2009).

5.4.3.3. *Dysfonctions mitochondriales et sénescence*

Dans un modèle de fibroblastes humains, l'inactivation des sirtuines 3 et 5 provoque l'induction d'un phénotype de la sénescence que les auteurs ont nommé MiDAS pour "*mitochondrial dysfunction associated senescence*" (Wiley et al., 2016). Les sirtuines sont des protéines mitochondriales NAD-dépendantes "anti-vieillissement" régulant de nombreux processus dont la réponse au stress oxydant et les dommages à l'ADN mitochondrial (Kaeberlein et al., 1999)(Kennedy et al., 1995)(Rodgers et al., 2005)(Mostoslavsky et al., 2006). Ce phénotype lié à l'inactivation des sirtuines présente un SASP particulier, qui ne comprend pas d'IL6 contrairement au cas de la sénescence induite par irradiation ou chimiothérapies. Le ratio NAD+/NADH est aussi important dans la régulation de ces voies, d'où l'intérêt de nombreux chercheurs dans le développement de drogues augmentant les réserves cellulaires de NAD+ dans le but de retarder le vieillissement et certaines pathologies(https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=Nicotinamide+Riboside&cntry=&state=&city=&dist=). Dans ce modèle, la diminution du ratio NAD+/NADH provoque l'arrêt du cycle cellulaire par l'activation de $p38^{MAPK}$ et p53. De manière intéressante, l'ajout de pyruvate relance le cycle cellulaire en ré-augmentant le ratio, mais ne stoppe pas le

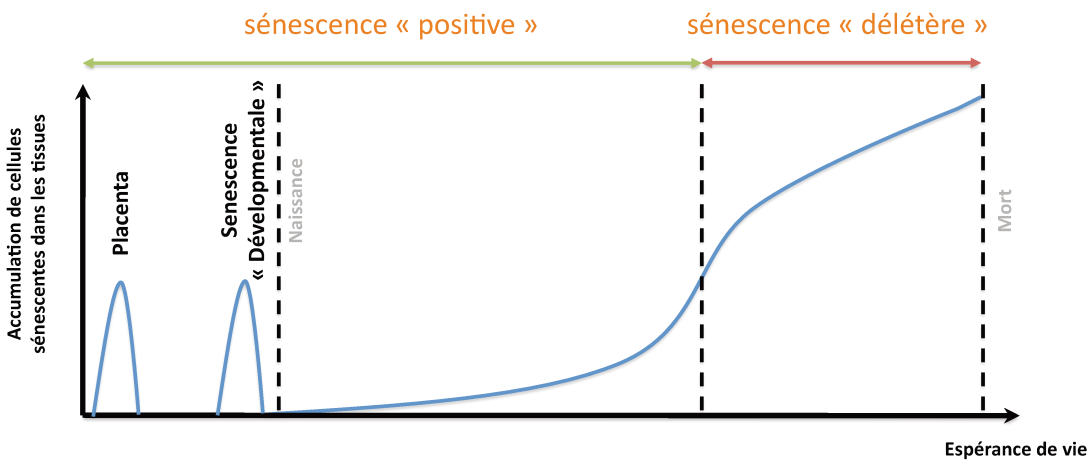
sécrétome déjà mis en place, bien au contraire, avec des niveaux de NFκb plus élevé et la sécrétion d'IL6 (Wiley et al., 2016). La souris $POLG^{D257A}$ mutée pour la polymérase G (une polymérase de l'ADN mitochondriale), accumule rapidement, dès l'âge de 8 mois, des dommages et des mutations de l'ADN mitochondriale, en lien avec le développement d'un phénotype progérique (Kujoth et al., 2005). L'autopsie de ces souris montre la présence de cellules sénescentes dans le tissu adipeux (SA-β-Gal, augmentation de l'expression de p16) par rapport à son homologue sauvage, pouvant être une explication à leur phénotype (Wiley et al., 2016).

5.4.4. Fonctions de la cellules sénescentes

5.4.4.1. *Fonctions physiologiques*

Ainsi, sur la base des différents marqueurs et caractéristiques précédemment évoqués, une présence transitoire de sénescence cellulaire a été mise en évidence dans le placenta lors de l'implantation d'embryons (Storer et al., 2013). L'apparition de sénescence semble également coordonner la formation des membres pendant l'embryogenèse des mammifères (Storer et al., 2013)(Muñoz-Espín et al., 2013)(Nacher et al., 2006) et la régénération des membres dans la salamandre (Yun et al., 2015). En outre, tout au long de la vie, en bloquant la prolifération des cellules aberrantes, la sénescence cellulaire peut être détectée dans les lésions néoplasiques primaires, jouant ainsi un rôle central de suppression de la tumeur (He and Sharpless, 2017b). Les cellules devenant sénescentes à cause du stress induit par un oncogène surexpriment le récepteur CXCR2. Ce récepteur peut être activé par de nombreuses cytokines du SASP comme IL6, IGFBP3 et PAI1 et CXCL1 (Acosta et al., 2008a) et sa surexpression est liée à un arrêt prématuré du cycle cellulaire (Acosta et al., 2008b). La sécrétion de CXCL1 par exemple, est entre autre, régulée par la protéine RelA, une sous

unité de NF-κB. *In vivo*, l'inactivation de cette voie RelA/CXCL1/CXCR2 est à l'origine d'une survenue plus importante de cancer du pancréas (Lesina et al., 2016). De plus, ajouté à l'induction de l'arrêt du cycle dans les cellules voisines, le SASP permet le recrutement du système immunitaire. En plus de sécréter des facteurs chémoattractants des effecteurs de l'immunité, la cellule sénescente favorise son immunoclairance en surexprimant des protéines membranaires lui permettant d'être reconnue. Plusieurs études ont montré une augmentation de l'expression des NKG2D (natural killer group 2D) (Iannello et al., 2013)(Soriani et al., 2009), un ensemble ligands pouvant être reconnu par les cellules NK et les lymphocytes T CD8+ (López-Soto et al., 2015). Ainsi, au niveau hépatique, l'activation de p53 dans les tumeurs est liée à la libération de chemoattractants pour les cellules NK. Le recrutement de ces effecteurs de l'immunité innée permet ainsi l'élimination de ces cellules cancéreuses induites en senescence (Iannello et al., 2013)(Xue et al., 2007). On peut noter que la sécrétion d'insuline est également stimulée par l'expression de $p16^{INK4a}$ par les cellules β du pancréas et joue ainsi un rôle dans le maintien d'une glycémie correcte (Helman et al., 2016). En participant aussi à la régulation du système immunitaire et de certains processus de différenciation terminale tels que les mégacaryocytes, la sénescence cellulaire est donc importante dans la physiologie animale entière (Vicente et al., 2016). Pour finir, il est avancé que la présence transitoire de cellules sénescentes pourrait coordonner la guérison des tissus après une blessure en facilitant la remodelage des tissus et en régulant les mécanismes d'immunoclairance (Demaria et al., 2014)(Vicente et al., 2016).



- Embryogenèse
- Réparation tissulaire
- Mécanisme de défense contre la tumorogenèse
- Différenciation cellulaire
- Sécrétion d'insuline

- Pathologies liées à l'âge

FIGURE 13 : FONCTIONS DES CELLULES SENESCENTES

5.4.4.2. *Fonctions pathologiques*

Outre de nombreux rôles positifs, le nombre de cellules sénescentes augmente progressivement au cours de la vie dans les tissus mitotiques ou post-mitotiques et dans de nombreuses espèces (Muñoz-Espín and Serrano, 2014). Cette accumulation pourrait s'expliquer par une rupture de l'équilibre entre l'apparition de cellules sénescentes et leur élimination par le système immunitaire. Plusieurs hypothèses sont avancées : d'un côté une augmentation des dommages causant une apparition plus importantes de cellules sénescentes, de l'autre une diminution de la capacité du système immunitaire à les éliminer (He and Sharpless, 2017). On aurait d'un côté une sénescence transitoire positive et de l'autre, des cellules sénescentes qui perdurent dans l'organisme et qui ont un impact négatif (voir figure 5). De nombreux tissus sont concernés, les plus susceptibles (sans être les seuls) de montrer une concentration importante de cellules sénescentes étant la peau, le foie, les poumons et la rate (Muñoz-Espín and Serrano, 2014). L'accumulation de ces cellules

participe à l'apparition de maladies liées à l'âge et au raccourcissement de la durée de vie dans les modèles précliniques (Baker et al., 2011). Ainsi, on a constaté que l'accumulation chronique de cellules sénescentes dans les tissus cartilagineux, osseux ou musculaires chez les personnes âgées, était liée à l'apparition de maladies dégénératives liées à l'âge, telles que respectivement l'arthrose, l'ostéoporose ou la sarcopénie (Jeon et al., 2017)(Farr et al., 2017)(Sousa-Victor et al., 2014). Outre le système musculo-squelettique, une augmentation du nombre de cellules sénescentes apparaît également dans le tissu adipeux associée à une lipodystrophie liée à l'âge (Baker et al., 2011), voir à des troubles anxieux et dépressifs (Ogrodnik et al., 2018), dans l'intima artérielle de patients souffrant d'athérosclérose (Childs et al., 2016), dans le vieillissement des reins ou des poumons, associée à des insuffisances rénales chroniques (Baar et al., 2017) et respiratoires (Yanai et al., 2015) et enfin au niveau du pancréas, en lien avec les diabètes de type 1 et 2 (Aguayo-Mazzucato et al., 2019)(Thompson et al., 2019). Fait également intéressant, la transplantation d'un rein provenant d'une souris $p16^{-/-}$ est associé à une survie plus élevée comparée à la transplantation d'un greffon provenant d'une souris wild-type classique (Braun et al., 2012).

Dans le cas du cancer, l'implication de la sénescence semble surprenante étant donné la fonction anti-tumorale de ce syndrome. Une hypothèse tiendrait à ce que la tumorogenèse serait le résultat d'un contournement de la sénescence par la cellule instable génétiquement. Récemment, chez des fibroblastes humains, 16 semaines après l'arrêt de la prolifération lié au phénotype sénescent (décrit comme une sénescence tardive), De Cecco et al. ont montré l'augmentation de l'expression du rétrotransposon L1 (Cecco et al., 2019). Ce dernier est physiologiquement réprimé pour éviter une instabilité du génome. La transcription de L1 n'est normalement activée que durant l'embryogenèse, et de manière non physiologique dans les cellules cancéreuses. L'expression de L1 est accompagnée de la

présence dans le cytosol d'ADNc de L1, activant la voie cGAS-STING ce qui se traduit par une réponse inflammatoire, et la mise en place d'un SASP (Yang et al., 2017)(Glück et al., 2017)(Cecco et al., 2019). Ce sécrétome des cellules sénescentes pourraient également expliquer (ou simplement favoriser) la pathologie. En effet, les cellules sénescentes et le SASP peuvent aussi être impliqués dans des mécanismes pro-tumorogéniques. La sécrétion d'IL6 est liée à une augmentation des capacité de prolifération et de migration des cellules de cancer du sein (Di et al., 2014). Et de la même manière, plusieurs facteurs du SASP induisent une augmentation des marqueurs de cellules souches dans les cellules cancéreuses, en lien avec des formes plus agressives et résistantes aux traitements (Cahu et al., 2012)(Lin et al., 2019). Les marqueurs de sénescence retrouvés dans chaque organe, et les liens supposés avec les pathologies sont résumés dans le Tableau 2

5.4.4.3. *Modèles in vivo et démonstration du lien causal entre sénescence et pathologies*

Comme mentionné précédemment, la sénescence cellulaire est caractérisée par un arrêt de cycle cellulaire robuste associé à l'établissement d'un profil de sécrétion spécifique. On a donc émis l'hypothèse que ce phénotype cellulaire pourrait contribuer à l'émergence de diverses pathologies en diminuant les capacités de renouvellement et de réparation des organes ciblés, tout en créant un microenvironnement chronique pro-catabolique et pro-inflammatoire. Pour résumer, cela pourrait être considéré comme un processus répétitif de réparation de tissu non complètement achevé sur toute sa durée de vie. Bien que séduisant, il était néanmoins nécessaire de démontrer la véracité d'un tel lien de causalité entre la présence de cellules sénescentes et une perte de fonctions des tissus et des organes. Cette démonstration a été rendue possible par l'utilisation d'animaux transgéniques exprimant des biocapteurs spécifiques à la sénescence. Un premier modèle de souris appelé p16-3MR

(rapporteur trimodal) consiste, sous le contrôle du promoteur du marqueur de gène de sénescence caractéristique $p16^{INK4a}$, à exprimer le gène rapporteur de la luciférase fusionné à une forme tronquée du virus de l'herpès simplex 1 thymidine kinase (TK) (Demaria et al., 2014). Les cellules sénescentes exprimant cette protéine de fusion TK peuvent rapidement mourir en présence de la molécule de ganciclovir in vitro mais également in vivo. Le second modèle, est appelé INK-ATTAC (Baker et al., 2011). Il consiste, sous le contrôle du promoteur du même gène $p16^{INK4a}$, à l'expression du reporter luciférase avec un gène suicide (caspase 8 modifiée). Celle ci est inductible en présence de la molécule AP20187. Les deux modèles murins permettent la détection des cellules sénescentes résidant dans les tissus, en présence de luciférine et sous caméra CCD, mais également leur élimination sélective par modulation pharmacologique ou « *sénolyse* ». La première démonstration d'un effet bénéfique de l'élimination des cellules sénescentes a été réalisée sur un modèle murin prématuré (BubR1H / H) exprimant une forme hypomorphique de BubR1, une kinase contrôlant l'assemblage du fuseau mitotique. Ces souris développent rapidement, après la naissance, des pathologies pourtant considérées comme liées à l'âge : entre autres cataracte, sarcopénie, et arythmies cardiaques et présentent une espérance de vie très courte (Baker et al., 2011). De manière remarquable, ces animaux progériques qui expriment également la construction INK-ATTAC, après l'administration de AP20187, montrent une diminution de l'expression des marqueurs de sénescence, un retard dans l'apparition de ces processus dégénératifs, entraînant une augmentation de leur durée de vie (Baker et al., 2016). Ce constat pourrait être paradoxal tant le rôle de la sénescence est incontournable dans de nombreuses étapes du développement, comme décrit précédemment. Pour expliquer ces effets ambivalents, certains auteurs ont proposé que la sénescence serait un modèle de pléiotropie antagoniste (Williams, 1957)(Campisi, 2005). Durant la période de

reproduction, le processus donnerait un avantage sélectif, avec la conséquence d'une sélection naturelle en faveur de ce trait. Puis, dans un deuxième temps seulement, après la période reproduction, l'apparition d'un effet délétère pour l'organisme, mais là, sans effet sur la sélection naturelle (Weismann, 1892)(Williams, 1957).

Pathologie	Modèle d'étude	Type cellulaire	Marqueurs de sénescence	Refs
Alzheimer	Souris MAPT^{P301S}PS19	Astrocytes, microglie	p16	(Bussian et al., 2018)
Arthrose	ACLT sur souris INK-ATTAC 2 mois	Chondrocytes, synoviocytes	p16, SA-β-Gal, SASP	(Jeon et al., 2017)
Arythmie cardiaque	Souris BubR1$^{H/H}$	?	p16	(Baker et al., 2011 b)
Athérosclérose	HFD sur Souris LdlR$^{-/-}$;3MR	Cellules spumeuses dans les plaques d'athérome	p16, SA-β-Gal	(Childs et al., 2016)
Anxiété/ Dépression Liées à l'obésité	HFD sur Souris INK-ATTAC	Cellules du tissu adipeux Amygdale et hypothalamus	p16, SA-β-Gal, γH2AX, télomères, CCF, SASP	(Ogrodnik et al., 2018)
Cataracte	Souris BubR1$^{H/H}$	?	p16	(Baker et al., 2011)
Diabète de type 1 (DT1)	Souris NOD femelle, 8, 14 et 16 semaines Cellules β humaine traitées par bléomycine	Cellules β du pancréas	p16, p21, γH2AX, SASP, SA-β-Gal, Bcl-2	(Thompson et al., 2019)
Diabète de type 2 (DT2)	HFD + S961 (2 semaines) / HFD (8 semaines) / Vieillissement (67-83 semaines) INK-ATTAC et WT Donneurs humains 20 à 60 ans, DT2 ou sains	îlots pancréatiques	p21, SA-β-Gal, SASP	(Aguayo-Mazzucato et al., 2019)
Fibrose pulmonaire idiopathique	bléomycine	Cellules épithéliales alvéolaires	p21, p38, γH2AX, SASP	(Yanai et al., 2015)
Insuffisance rénale aiguë	Souris agées de 20 mois Souris SIRT1 déficiente	?	SIRT1, NAD+	(Guan et al.,

				2017)
Insuffisance rénale chronique	Souris agées de 30 mois Souris $XPD^{TTD/TTD}$	?	SA-β-Gal, SASP	(Baar et al., 2017)
Lipodystrophie	Souris INK-ATTAC agées	Pré-adipocytes	p16, SASP	(Baker et al., 2016)
Ostéoporose	Souris INK-ATTAC de 24 mois Souris WT âgée de 22 mois	Ostéocytes, adipocytes	p16, SA-β-Gal, SASP	(Farr et al., 2017)
Parkinson	Paraquat (neurotoxine) Souris p16-3MR	astrocytes	p16, SASP	(Chinta et al., 2018)
Sarcopénie	Souris agées 28-32 mois	Cellules satellites	p16, SA-β-Gal	(Sousa-Victor et al., 2014)

TABLEAU 2 : LIEN ENTRE SENESCENCE ET PATHOLOGIES, MODELES D'ETUDE ET MARQUEURS IDENTIFIES

5.4.5. Caractéristiques moléculaires de la sénescence

5.4.5.1. *La voie de réponse aux dommages à l'ADN*

Lorsque la cellule subit un dommage à l'ADN (stress génotoxique, chimiothérapies) ou dans le cas de l'érosion des télomères, les systèmes de réparation de l'ADN et les kinases "ataxia teleangectasia mutation" (ATM) et "Rad3 related protein" (ATR) sont activées et recrutées au niveau des sites des lésions (Bartek et al., 2007) (voir figure 12). Les foyers γH2AX qu'on retrouve dans le noyau de certaines cellules sénescentes sont révélateurs de ce mécanisme (Rogakou et al., 1998)(d'Adda di Fagagna et al., 2003). ATM/ATR vont alors activer les kinases check1 (CHK1) et check2 (CHK2) qui, elles inhiberont les phosphatases de la famille Cdc25, bloquant l'activation des "cyclin dependant kinase" 1 et 2 (CDK 1 et 2) chargée de la régulation de la réplication de l'ADN et de la mitose (Brondello et al., 2012). La cellule entre donc dans un arrêt robuste du cycle cellulaire. Dans le même temps, la kinase ATM induit l'inhibiteur du cycle cellulaire $p21^{Waf1/Cip1}$ via l'activation de p53 avec le même effet sur la division cellulaire (Lossaint et al., 2011)(Roake and Artandi, 2017).

5.4.5.2. *Les inhibiteurs du cycle cellulaire*

L'arrêt du cycle cellulaire observé dans le syndrome de sénescence cellulaire est principalement médié par des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CKI). Ces dernières empêchent l'activation des CDK1/2/4/6, bloquant ainsi le cycle cellulaire en phase G1 ou G2 (Terzibasi-Tozzini et al., 2017). Deux familles de CKI se partagent les rôles dans cette mission. D'un côté, la famille Cip/Kip, qui comprend $p21^{Cip1}$, $p27^{Kip1}$ et $p57^{Kip2}$, cible les CDK1 et 2. De l'autre, la famille INK4, avec $p15^{INK4b}$, $p16^{INK4a}$, $p18^{INK4c}$ et $p19^{INK4d}$, cible les CDK4 et 6 (Terzibasi-Tozzini et al., 2017) (voir figure 14).

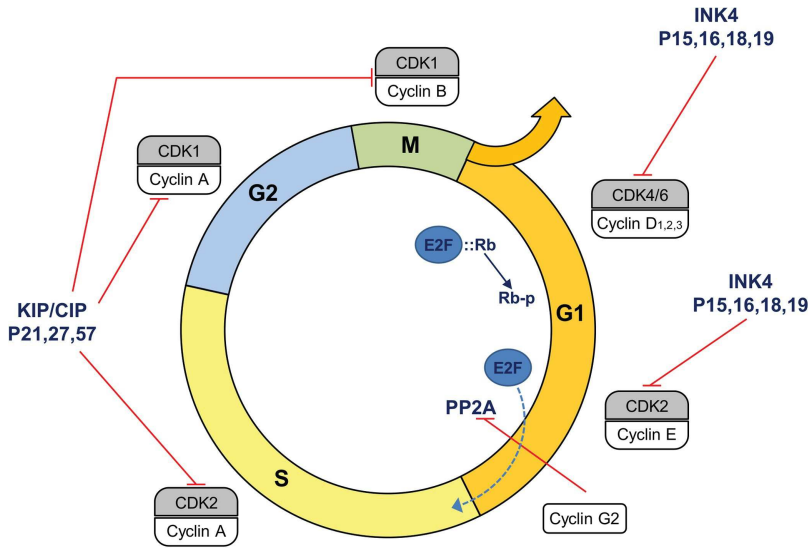


FIGURE 14 : CYCLE CELLULAIRE ET CIBLES DES CKI (TIREE DE (TERZIBASI-TOZZINI ET AL., 2017))

Ainsi, deux grandes voies peuvent être activées lors d'un stress induisant la sénescence. D'abord la voie p53-p21 : suite à l'activation de la voie DDR décrite dans la partie précédente, ATM active p53 qui lui même ciblera p21. Celui ci bloque le cycle cellulaire en jouant sur CDK2 empêchant ainsi la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb) (voir figure 12). Rb est une protéine de la famille des "pocket proteins" comprenant trois membres : Rb, RB like 1 (p107) et RB like 2 (p130). Ce groupe de protéines régule les facteurs de transcription de la famille E2F qui ont pour cibles des gènes codants pour des protéines essentielles du cycle cellulaire (Chandler and Peters, 2013). Dans l'OIS, des trois "pocket proteins", seul Rb semble être impliqué dans l'entrée en sénescence (Chicas et al., 2010). L'inhibition des CDK conduit donc à une forme hypophosphorylée de Rb qui va pouvoir se lier aux facteurs de transcription de la famille E2F, les empêchant d'activer la transcription de gènes impliqués dans la prolifération de la cellule (Xiong et al., 1993)(Shay et al., 1991). La seconde voie est celle menant aux protéines de la famille INK4. Dans l'OIS par exemple, le stress lié à l'hyperexpression d'un oncogène peut mener à une dérepression du locus INK4 et donc à l'induction de $p16^{INK4a}$ et p14ARF. $p16^{INK4a}$ induit

l'hypophosphorylation de Rb via inhibition des CDK4 et 6 (Krishnamurthy et al., 2004) tandis que $p14^{ARF}$ (ARF pour alternate reading frame protein), en inhibant MDM2, stabilise p53, initiant de cette manière l'apoptose ou l'arrêt du cycle dans le cadre de la sénescence p53 dépendante (Gil and Peters, 2006)(Kim and Sharpless, 2006) (voir figure 4). Enfin p15INK4b serait un effecteur de l'arrêt du cycle dans la stimulation par TGFβ (Hannon and Beach, 1994) (voir figure 12). Comme p16, il inhibe les CDK4 et 6 empêchant la phosphorylation de Rb (voir figure 4). Rb coopère avec PML (promyelocytic leukemia protein) pour réprimer les gènes impliqués dans la division cellulaire. En effet, les complexes Rb/E2F fixés à leur promoteur sont séquestrés dans les corps nucléaires PML ce qui contribue à la formation des SAHF (ou foyers d'hétérochromatine "*senescence associated heterochromatin foci*") (Vernier et al., 2011).

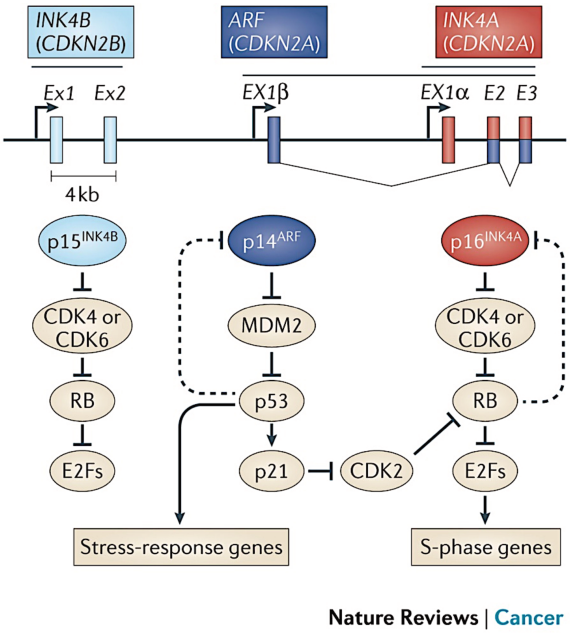


FIGURE 15 : LOCUS INK4 ET CIBLES DES PROTEINES INK4 ET ARF (TIREE DE (SHARPLESS AND SHERR, 2015))

5.4.5.3. *Les réarrangements de la chromatine associés à la sénescence*

Lors de l'induction de la sénescence, la cellule opère des changements de sa structure chromatinienne. Ces changements dépendent principalement de l'inducteur et peuvent donc être différents d'un phénotype à l'autre. Dans la DDR, des décondensations transitoires de la chromatine au niveau des sites de dommage à l'ADN permettent le recrutement et l'activation de la voie ATM/ATR (Burgess et al., 2014). Ces kinases phosphorylent le variant H2AX de l'histone H2A qui, permet de maintenir le lien entre les deux fragments ayant subi un cassage double brin ("*double strand break*"), afin de faciliter la réparation et le recrutement des protéines de réparation (Stucki et al., 2005). Autre exemple, dans la sénescence liée à un oncogène (OIS) chez certaines lignées de fibroblastes, l'arrêt du cycle est accompagné de la formation de SAHF (Narita et al., 2003). Les SAHF sont des foyers denses de chromatine visibles par marquage au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) et contenant les protéines HMGA1/2 ("high-mobility group A proteins"), les histones H2A et la protéine HP1 (Criscione et al., 2016). Ces foyers sont également enrichis en marqueurs de l'hétérochromatine comme les H3K9 et H4K20 triméthylés (Histone 3 triméthylé sur la lysine 9 et Histone 4 triméthylés sur la lysine 20) et parfois H3K27me3 (Histone 3 triméthylés sur la lysine 27) à leur périphérie (Chandra et al., 2012)(Nelson et al., 2016). Les rôles de ces SAHF sont encore discutés, et il ne semble pas que l'arrêt du cycle cellulaire en soit le principal : l'activation de la voie ATM-p53 semble nécessaire pour médier l'arrêt de la prolifération après apparition des SAHF, et certaines cellules cancéreuses en présentent, sans que cela n'impacte, logiquement, leur rythme de division. En effet, l'inhibition de la p300 histone-acétyltransférase (p300 HAT) mène à l'hypoacétylation globale des histones 3 et 4, initiant la formation des SAHF durant la phase S avec une altération et une diminution de la vitesse de la réplication de l'ADN. Ce stress conduit à un

arrêt du cycle en phase G2/M indépendant des voies liées à p53 et $p16^{INK4a}$ (Prieur et al., 2011). L'induction de la sénescence peut donc être consécutif uniquement à des changements d'organisation de la chromatine. Ils impactent également directement la signature transcriptionnelle des cellules sénescentes et peuvent être liée à l'arrêt du cycle par une implication dans la régulation du locus INK4-ARF. À ce niveau, deux mécanismes coexistent pour empêcher l'inhibition de la prolifération par ce CKI (inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines) et permettre un bon déroulement du cycle cellulaire. D'une part, les protéines polycomb PRC1 et PRC2 sont recrutées par le long ARN non codant (lncRNA) ANRIL au niveau du locus INK4 (Yap et al., 2010). Le complexe PRC2, comprenant la protéine EZH2, permet la triméthylation de l'histone 3K27, réprimant la transcription de INK4. Alors que dans une cellule sénescente, l'inhibition de la transcription de la protéine EZH2 conduit à l'incapacité de former le complexe PRC2 et donc à la diminution de la forme triméthylée de H3K27 conduisant à la dérépression de INK4 (Bracken et al., 2007). D'autre part, le locus INK4-ARF est entouré par 3 sites riches en "*CCCTC-binding factors*" (CTCF) (Hirosue et al., 2012), des éléments de délimitation séparant l'euchromatine de l'hétérochromatine. Ces CTCF sont des médiateurs de l'enroulement de la chromatine, en permettant la formation de boucles compactes qui empêche la transcription de INK4A (Hirosue et al., 2012). Dans l'OIS, les CTCF sont moins présentes, ce qui mène au désenroulement du locus qui peut alors être transcrit avec les évènements menant à l'arrêt du cycle qui ont été développé précédemment (Hirosue et al., 2012). En lien avec les réarrangements de la chromatine développé ci dessus, les cellules sénescentes libèrent dans leur cytosol des fragments d'ADN (CCF) qui sont censés être pris en charge et dégradés entre autre par autophagie (Ivanov et al., 2013). La présence de ces CCF et donc d'un phénotype sénescent peut donc être associé à des défauts de fonction de l'autophagie (voir Figure 10).

5.4.5.4. *Autophagie et sénescence*

L'autophagie est un mécanisme par lequel les cellules dégradent et recyclent leurs composants dysfonctionnels. Comme la sénescence, ils sont tous deux des mécanismes de réponse au stress mais le lien entre ces deux processus est ambivalent. D'une part, l'inhibition de l'autophagie retarde la sénescence induite par HRAS et le SASP, car les cellules sénescentes ont besoin, dans une phase précoce, d'une autophagie active pour augmenter les réserves d'acides aminés et de métabolites nécessaires à la production des facteurs SASP (Young et al., 2009). D'autre part, les défauts d'autophagie sont liés d'abord à une augmentation du stress oxydant pouvant conduire à la sénescence (Tai et al., 2017) et ensuite, à la non dégradation des CCF (Ivanov et al., 2013). Ces CCF peuvent être reconnus par la protéine cGAS et activer la voie cGAS-STING induisant la sénescence et la sécrétion de facteurs inflammatoires (Yang et al., 2017)(Glück et al., 2017). On peut donc distinguer une «autophagie sélective basale» (comme la mitophagie impliquée dans le recyclage des mitochondries non fonctionnelles) qui agirait en tant que mécanisme anti-senescent (García-Prat et al., 2016), d'une autophagie qu'on qualifierait de « générale » et qui pourrait constituer un mécanisme pro-sénescent (Young et al., 2009)(Huang et al., 2014)(Kang and Elledge, 2016). Dans tous les cas, une fonction altérée de l'autophagie semble être une caractéristique de plusieurs phénotypes de sénescence (voir figure 1). Les défauts du processus de mitophagie nous amène à évoquer le rôle des mitochondries et du métabolisme dans la sénescence.

5.4.5.5. *Métabolisme et sénescence*

Le rôle du métabolisme et plus précisément des mitochondries dans le vieillissement cellulaire est supposé depuis longtemps. Plusieurs mécanismes lient le métabolisme et la

sénescence. Tout d'abord, les mitochondries, centrales énergétiques de la cellule, en produisant l'ATP nécessaire au fonctionnement de la cellule, provoque la libération de radicaux libres oxygénés qui vont induire des dommages, activer les voies décrites précédemment et perturber l'ensemble du métabolisme (Passos et al., 2007). La production de ces radicaux, délétères pour la cellule, est d'autant plus importante que la mitochondrie est dysfonctionnelle et pourra dépasser un seuil où elle ne pourra pas être compensée (Passos et al., 2007). Pour éviter cela, les mitochondries dysfonctionnelles sont "démantelées" grâce au processus de mitophagie (élimination et recyclage spécifique des mitochondries par le processus d'autophagie) (Sun et al., 2016). Néanmoins, avec l'âge, les cellules de l'organisme peuvent présenter des défauts d'autophagie, menant au non recyclage de ces mitochondries dysfonctionnelles, l'accumulation de radicaux libres et des dommages associés, et donc à l'activation des voies de réponses au stress et de la sénescence, comme dans la sarcopénie et les maladies neuro-dégénératives (García-Prat et al., 2016)(Fivenson et al., 2017). Ces défauts de mitophagie pourraient être liés à la dynamique membranaire mitochondriale (fission/fusion) qui est centrale dans ce processus de recyclage. Ainsi, si d'un côté, la fusion mitochondriale serait un processus "anti-sénescent", la fission serait quant à elle, "pro-sénescente", en participant à l'accumulation de mitochondries géantes (Yoon et al., 2006)(Lenaers et al., 2010). Le rétablissement de l'autophagie par des inducteurs comme la rapamycine, pourrait être une solution pour réverser/empêcher le processus, ouvrant la voie à des thérapeutiques dans les pathologies associées à ce phénomène (García-Prat et al., 2016). Enfin, comme décrit précédemment, L'activité des sirtuines, le ratio NAD+/NADH et les dommages à l'ADN mitochondriale peuvent également conduire à un phénotype de sénescence appelé MiDAS caractérisé par un SASP particulier (Wiley et al., 2016).

5.4.6. Le SASP ou phénotype sécrétoire associé à la sénescence

Si les cellules sénescentes ne prolifèrent plus, elles n'en restent pas moins métaboliquement actives. Elles impactent les cellules voisines et le tissu environnant en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires, des chemokines, des facteurs de croissance et des protéases (Coppé et al., 2010). On appelle ce sécrétome particulier SASP pour "*senescence-associated secretory phenotype*" (voir figure 1) et il a été proposé comme lien entre sénescence et "inflammaging" (à savoir, cette inflammation de bas grade retrouvée chez les sujets âgés) et comme responsable du développement des pathologies communément associées à l'âge. Le SASP agit également de manière autocrine et participe au renforcement et au maintien de l'état sénescent (Kuilman et al., 2008)(Acosta et al., 2008b).

Il faut typiquement plusieurs jours à la cellule sénescente pour que son sécrétome se mette en place (Rodier et al., 2009). Et celui ci étant régulé, il est susceptible d'évoluer (Bhaumik et al., 2009). L'induction de certains phénotypes de sénescence est accompagnée par une augmentation continue de NOTCH1 (une protéine transmembranaire impliquée dans les processus développementaux et la différenciation) ainsi qu'une augmentation transitoire de la forme active clivée N1ICD (Hoare et al., 2016). La surexpression de cette dernière induit une sécrétion de TGFβ qui à elle seule peut provoquer l'arrêt du cycle (Hannon and Beach, 1994). Tandis que l'augmentation continue de NOTCH provoque un switch entre ce sécrétome "précoce" TGFβ et un sécrétome plus tardif composé de cytokines pro-inflammatoires (IL1A) et de métalloprotéases (Hoare et al., 2016). L'IL1A agit de manière paracrine pour induire la sécrétion d'IL6 et d'IL8 (Orjalo et al., 2009). La kinase p38, la voie mTOR, le facteur de transcription NF-κB, les janus kinases JAK1/2/3 et la méthyltransférase MLL1 jouent également des rôles importants dans la régulation du SASP

(Childs et al., 2017b)(Xu et al., 2015)(Capell et al., 2016). Tous ces éléments vont dans le sens de la sénescence et du SASP comme des processus dynamiques.

5.5. Chitinase 3 like protein 1 (Chi3L1)

5.5.1. Les chitinases

5.5.1.1. *Généralités*

Les chitinases (EC 3.2.1.14) sont une famille de protéines retrouvées dans quasiment tous les règnes du vivant (règne bactérien, fongique, végétal et animal). Ces enzymes appartiennent à la famille des "glycoside hydrolase 18" (http://www.cazy.org/GH18.html). Elles sont capables d'hydrolyser les liaisons osidiques de la chitine (polysaccharide constitué d'une succession de N-acétylglucosamine).

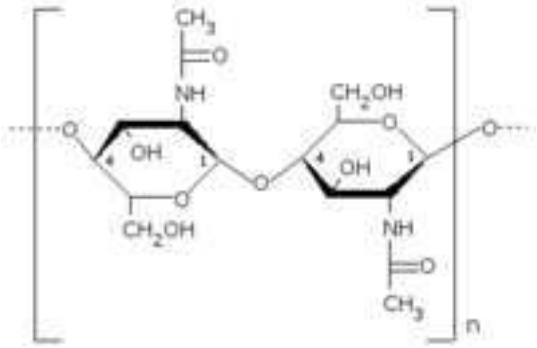


FIGURE 16 : MOTIF "CHITINE"

Cette dernière, qui est le deuxième polysaccharide le plus abondant derrière la cellulose, est un composant essentiel de la structure des champignons, diatomes, zooplanctons, nématodes, mollusques et arthropodes, alors qu'elle présente une toxicité neurologique chez les mammifères. De cette manière, chez les organismes "supérieurs", la chitine a été remplacée, dans son rôle structurel, par la cellulose et l'acide hyaluronique (polymère de N-acétylglucosamine et d'acide glucuronique).

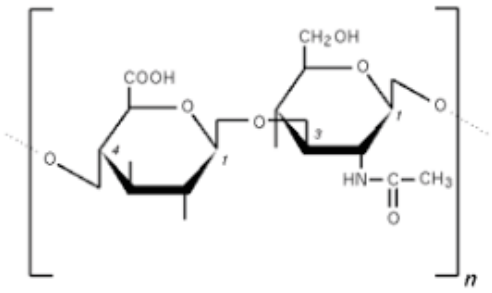


FIGURE 17 : MOTIF "ACIDE HYALURONIQUE"

Pour les autres organismes, les chitinases ont un rôle dans la nutrition et le métabolisme. Dégrader la chitine permet, en effet, d'apporter les composants et métabolites nécessaires à la synthèse de leurs composants structurels (exosquelette, coquilles, membrane cellulaire).

5.5.1.2. *Les chitinases humaines*

Chez l'Homme, il existe trois chitinases : la chitinase acide (AMCase), la chitotriosidase et la di-N-acetyl chitobiase (Tableau 3). Notons également, dans la même famille, quatre "chitinases-like", des protéines à la structure similaire aux chitinases mais sans leur activité enzymatique : chitinase 3 like protein 1 (Chi3L1), chitinase 3 like protein 2 (Chi3L2), l'oviductine (OVGP1) et la chitinase like interagissant avec la stabiline 1 (S1-CLP) (Tableau 3).

Funkhouser et Aronson ont étudié l'évolution génétique de la famille des chitinases GH18. Les chitinases humaines présentent des orthologies avec celles de l'amibe *Dictostelium discoideum* qui est considéré proche génétiquement du génome eucaryote ancestral. *D. discoideum* étant un spécialiste de la phagocytose de bactéries comme sources nutritionnelles, les chitinases conservées au cours de l'évolution le seraient vraisemblablement pour leur importance dans l'absorption, l'internalisation, la dégradation et la digestion de ces bactéries (Funkhouser and Aronson, 2007). Les chitinases étaient ainsi

pressenties comme impliquées dans la détection et la réponse face aux micro-organismes présentant une structure à base de chitine.

Table 1: Human Genes Encoding GH18 Family Members

Entrez Gene ID	Gene (Aliases)	Chr[a] Location	Protein Accession	Description
27159	CHIA	1p13.2	NP_970615 & NP_068569	acidic chitinase (AMCase, eosinophil chemotactic cytokine)
1118	CHIT1	1q32.1	NP_003456	chitinase 1 (chitotriosidase)
1116	CHI3L1 (YKL 40, GP39, TSA1902)	1q32.1	NP_001267	chitinase 3-like 1 (cartilage protein 39)
1117	CHI3L2 (YKL 39)	1p13.3	NP_003991	chitinase 3-like 2 (chondrocyte protein 39)
RP11-165H20.1	(LOC149620)	1p13.2	NP_001013643	NCBI Ref Seq: NP_001013643 was permanently suppressed because it is a nonsense mediated mRNA decay (NMC) candidate
5016	OVGP1	1p13.2	NP_002548	oviductal glycoprotein 1; oviductin
1486	CTBS	1p22	NP_004379	chitobiase, di-N-acetyl
66005	CHID1	11p15.5	NP_076436	stabilin-1 interacting chitinase-like protein

[a] Chromosome

TABLEAU 3 : FAMILLE DES ENZYMES GH18

5.5.1.3. *Rôles des chitinases*

C'est pour cette raison que la chitotriosidase, était décrite comme un élément dans la réponse à la chitine exogène et donc aux infections. Seulement, sa découverte a été réalisée dans le plasma de patients atteints de la maladie de Gaucher (Hollak et al., 1994). Elle est sécrétée en quantité par les macrophages de ces patients, comparativement aux patients contrôles qui n'ont pourtant pas plus de problèmes d'infections de cet ordre (Boot et al., 1995). La question du rôle par une voie autre que leur activité enzymatique s'est donc posée, encore plus avec la mise en évidence des "chitinases-like proteins" (CLP).

A ce jour, trois chitinases-like ont été mise en évidence chez la souris Ym1, Ym2 et "chitinases 3 like protein 1" (Chi3L1) la seule à posséder un homologue humain. Ces CLP participent à la défense face aux parasites en modulant la réponse immunitaire inflammatoire Th2 et Th17. Elles sont en jeu dans un équilibre fragile entre réponse à l'infection et auto-immunité/allergie. Dans des modèles murins d'allergie (induite par l'ovalbumine) et d'infection parasitaire (injection de larves de Nippostrongylus brasiliensis,

un nématode), les trois CLPs sont sécrétées par les macrophages et induisent la sécrétion d'IL17a par les lymphocytes γδT permettant ainsi le recrutement de polynucléaires neutrophiles (Sutherland et al., 2014). De manière intéressante, ce phénomène, avec un rôle principalement tenu par Ym1, va permettre une réponse anti-parasitaire efficace, mais sera à l'origine, en contrepartie, de dommages au niveau pulmonaire. D'un côté, l'utilisation d'un anticorps neutralisant anti-Ym1 réduit la destruction des alvéoles pulmonaires constatée au niveau histologique mais laisse le parasite se développer, comme en témoigne un nombre augmenté d'essaims au niveau intestinal. De l'autre côté, la surexpression d'Ym1 par injection d'un plasmide montre des effets inverses (Sutherland et al., 2014). Pour autant, les CLPs sont régulièrement citées ou étudiées comme marqueurs de pathologies non infectieuses. Il semble logique de suggérer qu'elles possèderaient d'autres fonctions non forcément liées à l'immunité.

5.5.2. Découverte de Chi3L1

C'est le cas de Chi3L1 aussi appelé "YKL-40" ou "glycoprotéine 39 du cartilage humain" (HC-gp39). Cette protéine a été découverte en 1988, dans les sécrétions des glandes mammaires du bovin hors des périodes de lactation (Rejman and Hurley, 1988). Sans que son rôle soit clairement défini et élucidé, elle est associée à des pronostics péjoratifs et une incidence augmentée de mortalité dans de nombreux cancers, maladies neuro-dégénératives et maladies cardiovasculaires et métaboliques (Yeo et al., 2019). De la même manière, Chi3L1 est exprimée et sécrétée par de nombreux types cellulaires différents : chondrocytes, monocytes, macrophages, neutrophiles, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, astrocytes (Johansen et al., 1993) (Volck et al., 1998)(Boot et al., 1999)(Baeten et al., 2000)(Bonneh-Barkay et al., 2010).

5.5.3. Structure de Chi3L1

Chi3L1 est une glycoprotéine de 40kDa composé de 383 acides aminés. Son gène est situé sur le chromosome 1 (1q32.1). Chi3L1 est synthétisée sous forme d'un propeptide. Celui ci est clivé pour donner la protéine mature caractérisé par une séquence N-terminal tyrosine(Y)-lisine(K)-leucine(L) qui lui a valu l'une de ses nombreuses nomenclatures "YKL-40" (Tableau 4).

TABLE 1 Multiple Names of CHI3L1

Name	Discovery	Reference
YKL-40	Major secreted protein of human MG-63 osteoblast cells	17
HC-gp39	Major secreted protein of articular chondrocytes and synovial cells	5
gp38k	38kD heparin-binding protein in differentiating vascular smooth muscle cell cultures	7
Chondrex	Chondrocyte protein upregulated in RA patients	9
CHI3L1	approved Human Genome Project gene name; abbreviation for chitinase 3-like-1	18

TABLEAU 4 : LES DIFFERENTES NOMENCLATURES DE CHI3L1 (COFFMAN, 2008)

Sa structure en trois dimensions consiste en deux domaines. Le premier est composé de huit tonneaux β (commun à toutes les chitinases GH18) tandis que le second est composé de six feuillets β antiparallèles avec une hélice α (Figure 18 : Structure de Chi3L1 (Fusetti et al., 2003)). La séquence conservée DXXDXDXE chez les chitinases est responsable de l'activité catalytique de ces enzymes. Chez Chi3L1, l'aspartate (138e acide aminé) est remplacé par une alanine et le glutamate (140e acide aminé) est remplacé par une leucine, retirant toute activité enzymatique. Elle reste néanmoins capable de se fixer à la chitine. Suivant la longueur du fragment, le site de fixation de Chi3L1 sera différent (Fusetti et al., 2003).

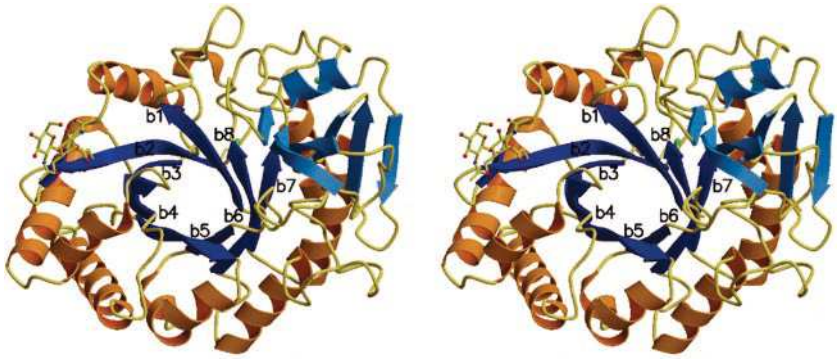


FIGURE 18 : STRUCTURE DE CHI3L1 (FUSETTI ET AL., 2003)

5.5.4. Activité biologique

5.5.4.1. *Récepteur de Chi3L1*

Un screening double hybride chez la levure a permis de mettre en évidence l'interaction entre Chi3L1 et IL13Rα2 (He et al., 2013). Ce récepteur présente deux isoformes, l'un membranaire, l'autre soluble. Il a longtemps été considéré comme "récepteur leurre" car son domaine cytoplasmique ne contient que dix-sept acides aminés et ne présente pas de région conservée box 1 qui joue un rôle important dans la transduction du signal. He et al. ont donc montré que, non seulement, l'activation de l'IL13Rα2 induisait une cascade de signalisation, mais qu'en plus, Chi3L1 était capable de se fixer et d'induire ces effets. Historiquement, l'IL13Rα2 est impliqué dans la régulation de la réponse immunitaire Th2, l'absence de ce récepteur empêchant la résolution de la réponse inflammatoire médiée par l'IL13 (Wood et al., 2003). Chi3L1 se fixe grâce à son "chitin binding domain" au domaine extracellulaire de l'IL13Rα2 (Figure 19) et active les voies ERK, Akt, Wnt/β-caténine et induit l'accumulation nucléaire de c-fos (He et al., 2013). Chi3L1 ne semble pas avoir d'interaction avec l'IL13, mais les co-immuno-précipitation montrent qu'ils forment tous ensemble un complexe multimérique Chi3L1/IL13/IL13Rα2. Pour autant, les effets et rôles biologiques des deux protéines semblent distincts. D'une part, il n'y a pas

d'induction de STAT6 lorsque Chi3L1 active son récepteur, contrairement à l'IL13, et d'autre part, il ne semble pas y avoir de compétition entre les deux protéines pour le récepteur, laissant penser qu'elles n'ont pas le même site de fixation.

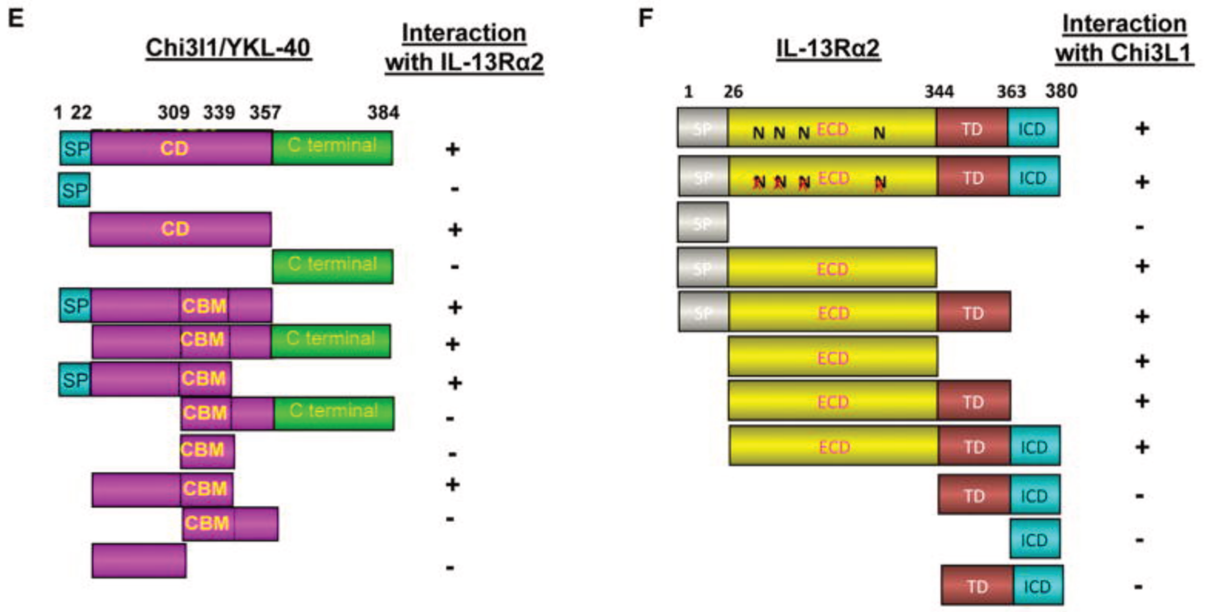


FIGURE 19 : INTERACTION ENTRE CHI3L1 ET IL13RA2 (HE ET AL., 2013)

L'étude du modèle IL13Rα2 -/- a montré que, de manière IL13Rα2-dépendante, Chi3L1 protégeait contre l'apoptose induite par le stress oxydant et contre la pyroptose, active l'inflammasome et favorise la métastase du mélanome (He et al., 2013). Récemment, Lee et al. ont montré que cet effet passait par la fixation de TMEM219 au complexe Chi3L1/IL13Rα2 (Figure 20). Cette protéine est nécessaire pour permettre l'activation des voies de signalisation IL13Rα2-dépendante, étant donné que le modèle murin TMEM219 -/- reproduit les mêmes phénotypes que ceux observés chez la souris IL13Rα2 -/- (Lee et al., 2016). Enfin, La galectin-3 est aussi capable de se fixer à l'IL13Rα2. Elle entre en compétition avec TMEM219 pour empêcher l'activation des voies IL13Rα2 et ses effets biologiques (Zhou et al., 2018).

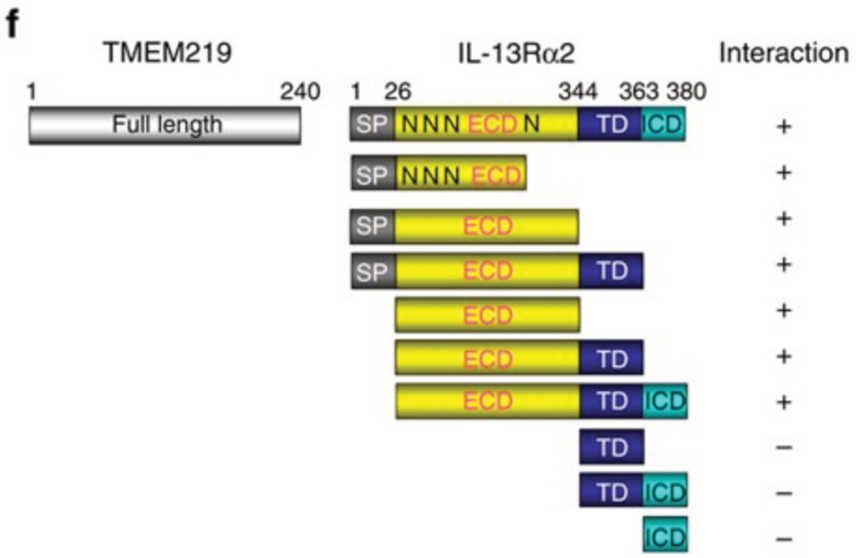


FIGURE 20 : INTERACTION ENTRE TMEM219 ET IL13RA2 (LEE ET AL., 2016)

5.5.4.2. *Régulation de Chi3L1*

Chi3L1 est principalement associé à des contextes inflammatoires ou de remodelage tissulaire, ce qui a amené certains auteurs à proposer cette protéine comme un biomarqueur de l'inflammation. Tout d'abord, Chi3L1 est sécrétée de manière plus importante par les macrophages de type M1 pro-inflammatoire par rapport aux macrophages M2 (Kunz et al., 2015). Ajouté à cela, les cytokines pro-inflammatoires induisent chez différents types cellulaires, l'expression et la sécrétion de Chi3L1. D'un côté, l'IL1β, l'IL6, l'IL17 le TGFβ et le TNFα pour les chondrocytes (Johansen et al., 2001; Recklies et al., 2005) (Väänänen et al., 2014) par l'activation de la voie NFκb (Recklies et al., 2005). De l'autre côté, L'IL1β et l'oncostatine M (OSM), de manière synergique, pour les astrocytes, chez l'Homme et la souris. Dans ce dernier contexte, ce sécrétome n'est pas sous le contrôle RelA/p65, mais de STAT3 et de RelB/p50 qui se fixe au promoteur de Chi3L1 (Bhardwaj et al., 2015). Les microARNs ont également cette capacité de régulation de l'expression de Chi3L1. Le miR-24 empêche la sécrétion de YKL-40 par les macrophages et les cellules endothéliales, en lien avec des améliorations dans un modèle murin d'anévrisme aortique (Maegdefessel et

al., 2014). Enfin, Chi3L1 peut aussi se fixer aux héparines et aux collagènes I, II et III. L'interaction entre Chi3L1 et le collagène I permet de moduler la formation des fibres de collagène (Bigg et al., 2006).

5.5.5. Chi3L1 et pathologies

5.5.5.1. *Chi3L1 et pathologies infectieuses*

Comme introduit plus haut, les chitinases sont principalement associées à l'immunité innée et la lutte contre les infections (Sutherland et al., 2014). C'est aussi le cas de Chi3L1 qui a été mis en évidence comme un biomarqueur des sepsis (Hattori et al., 2009) et qu'on retrouve chez les macrophages pro-inflammatoires et les neutrophiles (Kirkpatrick et al., 1995 ; Volck et al., 1998 ; Kunz et al., 2015). Nous allons passer en revue son rôle dans les différents types d'infections.

5.5.5.1.1. Les infections bactériennes

Chez des patients hospitalisés pour des pneumopathies aiguës communautaires d'origine bactérienne, les taux sériques de Chi3L1 sont corrélés à ceux de la lactoferrine et de la neutrophil gelatinase-associated lipocalin, des marqueurs associés à la dégranulation des neutrophiles, donc à leur activation (Nordenbaek et al., 1999). *Streptococcus pneumoniae* est l'une des bactéries les plus fréquemment retrouvées à l'origine des pneumopathies aiguës communautaires nécessitant une hospitalisation. L'infection par ce pathogène de souris wild type stimule la sécrétion de Chi3L1 dans le liquide broncho-alvéolaire. La protéine va alors réguler l'élimination et contenir la dissémination bactérienne. Son absence chez le modèle murin Chi3L1 -/- est à l'origine d'une perte de poids d'une mortalité plus importante, un phénotype réversée par l'apport de protéine recombinante (Cruz et al., 2012). Cette effet s'explique par l'action de Chi3L1 sur les macrophages, il

empêche la pyroptosis caspase 1-dépendante (une forme d'apoptose liée aux pathogènes), régule l'inflammasome et donc le profil cytokinique de la réponse immunitaire (Cruz et al., 2012). Le rôle de Chi3L1 dans la réponse aux infections bactériennes reste néanmoins à discuter. Dans le modèle particulier d'infection opportuniste après brulures par *P.aeruginosa*, l'expression de Chi3L1 au niveau de la peau serait délétère et favoriserait la dissémination bactérienne. *P.aeruginosa* serait capable de se fixer aux chitinases et profiterait de la phase "vulnérable" post-brulures caractérisées par des problèmes d'activation de la réponse immunitaires. Si la diminution de l'expression de Chi3L1 dans la peau suite à l'immunisation par administration de dérivés de la chitine montre une amélioration dans la survie post-infection, ces résultats ne sont pas confirmés par l'administration d'anticorps neutralisant anti-Chi3L1. De plus, le modèle murin Chi3L1-/- n'a pas été testé dans cette étude, empêchant de conclure quant au rôle de Chi3L1 dans ce contexte (Bohr et al., 2015).

5.5.5.1.2. Les infections fongiques

Chi3L1 est également impliqué dans les réponses aux infections fongiques et parasitaires. Dans un modèle de kératite liée à *Candida albicans*, l'infection stimule encore une fois l'expression de Chi3L1 dans la cornée. La neutralisation de la protéine à l'aide d'un siARN ou dans le modèle murin KO montre un phénotype de la pathologie plus sévère. Et de la même manière, le traitement par la protéine recombinante en post-infection régule la réponse inflammatoire lié à C.albicans et exerce un effet protecteur sur l'épithélium cornéen (Gao and Yu, 2015).

5.5.5.1.3. *Les infections parasitaires*

Enfin, côté infection parasitaire, une étude chez des enfants souffrant de paludisme (*Plasmodium falciparum*) a montré que les taux sériques de Chi3L1 étaient corrélés avec la parasitémie et étaient prédictifs pour les formes sévères et neurologiques. Néanmoins, dans le modèle murin, le knock out de CHi3L1 n'améliore pas la survie post-infection (Erdman et al., 2014). De même, dans le modèle d'infection par *N. brasiliensis* décrit pour détailler le rôle des chitinases, Chi3L1 n'est pas le principale acteur et effecteur de la réponse anti-parasitaire (Sutherland et al., 2014). Si son expression est augmentée en réponse à l'infection, et s'il semble stimuler la sécrétion d'IL17, son activité n'est pas suffisante pour protéger l'hôte du parasite. En effet, ce sont les autres chitinases like, en particulier Ym1, qui semblent centrales dans l'activation d'une réponse immunitaire efficace (Sutherland et al., 2014). Chi3L1 ne semble donc pas être un acteur de la réponse anti-parasitaire. Son expression augmentée dans ces contextes proviendrait probablement de sa proximité avec les autres chitinases ou chitinases-like principales actrices dans ces cas précis.

5.5.5.2. *Chi3L1 et cancers*

L'une des premières mises en évidence de Chi3L1 a été réalisé à partir d'une lignée d'ostéosarcome (Johansen et al., 1992). Depuis, cette chitinase-like a été associée à de très nombreux autres cancers : mélanome, gliome, glioblastome, cancer du sein, cancer ovarien, cancer de la vessie, cancer gastro-intestinaux, cancer colo-rectal, cancer bronchique, carcinome de la tête et du cou, lymphome hodgkinien et non hodgkinien, myélome multiple, leucémie aiguë myéloïde (Cintin et al., 1999)(Tanwar et al., 2002)(Shostak et al., 2003)(Schmidt et al., 2006)(Roslind et al., 2008a)(Roslind et al., 2008b)(Biggar et al., 2008)(Høgdall et al., 2009)(El-Galaly et al., 2015)(Kjaergaard et al., 2015). Non seulement,

ces nombreux types de cellules cancéreuses surexpriment Chi3L1, mais en plus, ces taux élevés sont associés à des pronostics péjoratifs, de rechute et une survie moindre (Roslind et al., 2008). De la même manière, une bonne réponse aux traitements et la rémission sont associées à des taux diminués de Chi3L1 (Biggar et al., 2008) (El-Galaly et al., 2015). Ceci s'expliquerait par l'implication de Chi3L1 dans la chimiorésistance, l'angiogenèse et la survenue de métastase.

5.5.5.2.1. *La chimiorésistance*

Chi3L1 est associé à une chimiorésistance dans plusieurs tumeurs solides. Il prédit la résistance au docetaxel du cancer de la prostate (Darr et al., 2018), la non-réponse aux chimiothérapies adjuvantes dans l'adénocarcinome rectal (Senetta et al., 2015) et diminue la réponse à la radiothérapie du glioblastome (Francescone et al., 2011). Dans les cancers ovariens, les patients présentant des formes plus agressives, avancées et résistantes aux traitements ont des niveaux d'expressions de Chi3L1 plus élevés (Chiang et al., 2015). *In vitro*, la surexpression (grâce à un shRNA) de cette protéine dans les lignées cellulaires épithéliales de cancer ovariens les protège de la mort induite par le paclitaxel en stimulant l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (Chiang et al., 2015). De plus, Chi3L1 stimule également dans ces lignées les propriétés souches des cellules cancéreuses : capacité à former des sphéroïdes de plus grande taille, expression des gènes de la pluripotence (oct4, nanog et sox2) (Lin et al., 2019). Il semble également indispensable pour maintenir ces propriétés et l'état indifférencié de la cellule cancéreuse associé à une agressivité plus importante (Pinet et al., 2016). De la même manière, un clone résistant de glioblastome, obtenu par exposition continue au temozolimide, est caractérisé par une hyper-expression de cette chitinase-like. L'inhibition de l'expression de Chi3L1 réverse la résistance au temozolomide, ainsi que les capacités invasives et de prolifération de ce clone

(Akiyama et al., 2014). Atkins et al. font une conclusion similaire en isolant des "cellules souches cancéreuses" quiescentes de glioblastomes caractérisé par leur résistance au temozolomide et à la radiothérapie, leurs capacités de migration et d'invasion *in vitro* et *in vivo* plus importantes et leur profil transcriptomique avec trois gènes particulièrement sur-exprimés : Chi3L1, IGFBP3 et TGFβI (Atkins et al., 2019).

5.5.5.2.2. *L'angiogenèse*

L'association entre Chi3L1 et l'agressivité des tumeurs s'explique également par le rôle de cette chitinase dans l'angiogenèse. Chi3L1 stimule de façon modeste la prolifération des cellules endothéliales mais induit la migration et la formation de tube de manière similaire au VEGF (Shao et al., 2009a). De plus, la chitinase like peut induire la collaboration entre le récepteur membranaire syndecan-1 avec les intégrines αvβ5 ou αvβ3 (Shao et al., 2009a)(Francescone et al., 2011). L'association syndecan-1 / intégrines αvβ5 active la voie des MAPK et stimule l'expression du VEGF dans le glioblastome (Francescone et al., 2011), tandis que l'intégrine αvβ3 stimule de manière constitutive l'expression du VEGF dans des lignées de cancer du sein (Lorger et al., 2009). *In vivo*, les taux de Chi3L1 corrèle avec la densité du réseau vasculaire tumoral dans des modèles de xénogreffe de cancer du sein (Shao et al., 2009a). L'utilisation d'un anticorps ciblant Chi3L1 empêche la formation de tubes, diminue l'angiogenèse, la résistance à la radiothérapie et freine la croissance tumorale dans un modèle murin de xénogreffe de glioblastome (Faibish et al., 2011).

5.5.5.2.3. *Les métastases*

Les modèles murins KO pour les gènes Chi3L1, IL13Rα2 et TMEM219 ne présentent pas de métastases pulmonaires après xénogreffes de cellules de lignée de mélanome ou de cancer du sein (He et al., 2013)(Ma et al., 2015)(Lee et al., 2016). Cet effet serait commun à

de nombreux cancers et passerait par l'axe Semaphorine7a (Sema7a) / Integrinβ1 / Chi3L1 / IL13Rα2 (Ma et al., 2015). Les semaphorines sont des protéines normalement impliquées dans la croissance des axones, l'angiogenèse, la réparation tissulaire et l'immunité innée. Mais on les retrouve surexprimées dans les cancers agressifs et métastatiques où elles favoriseraient la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Trusolino and Comoglio, 2002). Une partie du rôle des sémaphorines dans ce phénomène pourrait donc passer par Chi3L1. En effet, les cellules issues de cancers bronchiques à petites cellules surexprimant Chi3L1 présentent, *in vitro*, des capacités de migration et d'invasion augmentées et montrent plusieurs marqueurs mésenchymateux (N-cadherine et vimentine) allant dans le sens d'une facilité à se dédifférencier (TEM) (Jefri et al., 2015). Enfin, autour de ces métastases, Chi3L1 est également induit dans fibroblastes associés au cancer (CAF). Ces fibroblastes vont favoriser la croissance tumorale et orienter les effecteurs de l'immunité vers une réponse immunitaire de type 2 inefficace (Cohen et al., 2017).

Tous ces éléments convergent vers un impact négatif de Chi3L1. Son rôle potentiel dans la réparation tissulaire et l'inflammation sont détournés dans le cas du cancer pour favoriser la progression tumorale et la survenue de métastase. La recherche et la quantification de cette protéine seront utiles en diagnostic et en suivi des patients souffrant de ces cancers. Également, Les thérapies ciblant Chi3L1 pourront, dans le cadre d'association, se révéler efficace dans le traitement de nombreux patients.

5.5.5.3. *Chi3L1 et pathologies pulmonaires*

Pour leur implication supposée dans la défense contre les infections, les chitinases ont été particulièrement étudiées dans les organes proposant une interface entre l'organisme et le milieu extérieur. C'est le cas des poumons, où Chi3L1 a été associé avec l'asthme, la rhinite allergique, la fibrose idiopathique pulmonaire (IPF) et la broncho-

pneumopathie obstructive (Chupp et al., 2007)(Kwon et al., 2011)(Furuhashi et al., 2010)(Létuvé et al., 2008)(James et al., 2016). Ainsi, une étude chez l'Homme a montré que les taux sériques de cette chitinase-like étaient plus élevées chez les patients souffrant d'asthme, et même corrélés à la sévérité de la pathologie et à la fonction pulmonaire (Chupp et al., 2007). Une bonne réponse aux traitements étant quant à elle associée à une diminution des taux de Chi3L1 (Lai et al., 2015). Si le rôle des chitinases en tant que facteur causal a été démontré chez la souris, ce n'est pas le cas chez l'Homme (Zhu et al., 2004). Néanmoins, des études génétiques ont montré le lien entre certaines mutations du gène Chi3L1 et des taux sériques augmentés, un risque relatif plus élevé de développer la pathologie et une pus grande sévérité de la maladie, chez l'enfant et chez l'adulte (Guerra et al., 2018)(Ober et al., 2008)(Gomez et al., 2015). Ces observations font écho au rôle des chitinases dans la régulation de l'inflammation médiée par l'IL13 et les lymphocytes T helper de type 2 (Th2) (Zhu et al., 2004). En effet, la réponse inflammatoire Th2 est communément associée aux allergies, aux pathologies auto-immunes et à la pathologie asthmatique. Il n'est donc pas surprenant que Kuepper et al. ait montré des résultats similaires en comparant les taux sériques de Chi3L1 avant et après un test de provocation d'allergie (Kuepper et al., 2008). Chi3L1 semble donc associé de manière globale à l'inflammation et le remodelage du tissu bronchique plus qu'à une condition particulière. Une étude récente sur le syndrome d'Hermansky-Pudlak va dans ce sens. Cette maladie génétique rare est caractérisée par un albinisme et des troubles hémorragiques. Dans certains cas, ces patients ont la particularité de présenter une fibrose pulmonaire. Dans un modèle murin d'étude de la pathologie, Chi3L1 régule la fibrose et stimule la production de procollagène et de fibronectine via le récepteur de la prostaglandine D2 CRTH2 (Zhou et al., 2015). Quant à l'Homme, le syndrome Hermansky-Pudlak est déjà associé à des taux sériques plus élevés par rapport à la

population générale, et des taux encore plus élevés lorsqu'il y a une fibrose pulmonaire, suggérant que le processus menant à la fibrose serait similaire chez les deux espèces (Zhou et al., 2015). Enfin, la présence prépondérante de Chi3L1 au niveau pulmonaire pourrait expliquer la localisation préférentielle des métastases de certains cancers, comme développé précédemment (Ma et al., 2015)(Kim et al., 2018).

5.5.5.4. *Chi3L1 et pathologies du squelette et des articulations*

L'articulation est sujette à de nombreux stress ce qui implique une adaptation continue de la part des trois compartiments, cartilage, membrane synoviale et os sous-chondral. Pour ce dernier, comme développé précédemment, il s'agit d'un remodelage osseux pour répondre aux contraintes mécaniques et conserver sa fonction de soutien. Lorsque cette adaptation du tissue n'est plus possible et que l'équilibre est rompu, il y a développement de la pathologie. Si on parle d'équilibre ou de balance, cela signifie que la rupture peut avoir lieu dans au moins deux sens. De cette manière, certains auteurs ont décrit deux schémas majeurs dans les pathologies de l'articulation (Goldring and Goldring, 2007). D'un côté, le déséquilibre peut aller dans le sens d'une résorption osseuse accrue avec destruction du cartilage et de l'os, menant à une instabilité et une articulation déformée. C'est l'exemple de la polyarthrite rhumatoïde. De l'autre côté, ce déséquilibre peut être caractérisé par une néoformation d'os. Après une accumulation de dommages importants, l'articulation répond donc par la formation d'ostéophytes. Ce sont des éléments qu'on peut retrouver dans l'arthrose. Cet équilibre entre formation et résorption constitue la mission d'un certain nombre d'effecteurs (protéines, cellules stromales mésenchymateuses, chondrocytes, système immunitaire, voies de signalisation etc) qui vont réguler l'action des ostéoclastes et des ostéoblastes. C'est le cas de la voie "*wingless signaling pathway*" (Wnt) régulé par Dickkopf 1 (DKK1) elle même régulé par le "*Tumor Necrosis Factor*" (TNF)

explicitant la relation entre inflammation, remodelage tissulaire et pathologie (**Erreur ! ource du renvoi introuvable.**) (Diarra et al., 2007).

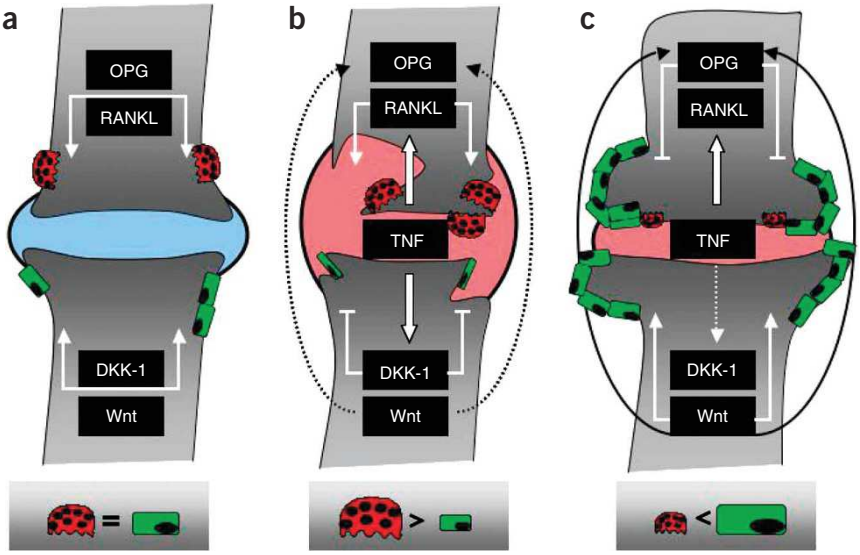


FIGURE 21 : REGULATION DU REMODELAGE OSSEUX PAR DKK1 (DIARRA ET AL., 2007)

(a) *à l'état physiologique, il y a un équilibre entre formation et résorption osseuse.* ***(b)*** *dans le contexte de la RA, l'inflammation va induire un déséquilibre. le TNF induit DKK1 qui va réprimer la voie Wnt, tandis que la résorption osseuse est stimulée par RANKL.* ***(c)*** *l'inhibition de DKK1 active la voie de signalisation Wnt et induit la formation osseuse, ce qui se traduit par l'apparition d'ostéophytes. De plus, la voie Wnt induit l'ostéoprotegerine qui va inhiber la résorption osseuse médiée par RANKL*

Chi3L1 est également associé à l'articulation et à ces contextes d'inflammation et de remodelage des tissues. L'une de ses anciennes dénominations était d'ailleurs "glycoprotéine 39 du cartilage humain" (HC-gp39), trait à sa masse moléculaire ainsi que sa mise en évidence dans le liquide synoviale et le surnageant des chondrocytes (Johansen et al., 1993). La modulation de son expression et de sa sécrétion chez le chondrocytes par des facteurs de croissance ou inflammatoire in vitro (De Ceuninck et al., 1998 ; Johansen et al.,

2001 ; Recklies et al., 2005) et dans le liquide articulaire humain dans les contextes pathologiques (Johansen et al., 1993) a rapidement posé la question de son rôle dans les maladies articulaires. Que ce soit dans le plasma ou dans le liquide synovial, les taux de Chi3L1 sont corrélés à ceux des métalloprotéases et les cytokines pro-inflammatoires (Väänänen et al., 2014). Ils sont également plus élevés chez le patient arthrosique que chez le patient sain, sans qu'ils ne soient influencés par le BMI ou le genre (Väänänen et al., 2014). De la même manière, Les explants de cartilages provenant de patients ayant subi une arthroplastie, libèrent une quantité importante de Chi3L1 corrélée avec les taux mesurés dans le liquide synovial (Väänänen et al., 2014) et montre également une expression en ARN augmenté (Li et al., 2019a). Le constat est similaire dans la RA, où les taux sérique ou articulaire de Chi3L1 ont ainsi été montrés comme corrélés avec l'activité de la pathologie (Johansen et al., 1999 ; Väänänen et al., 2017) et la dégradation du cartilage (Baeten et al., 2000). De façon similaire, dans un protocole de traitement des patients RA (combinaison de sulphasalazine, methotrexate, hydroxychloroquine et de prednisolone à faible dose), la rémission est liée à une diminution des concentrations plasmatiques de Chi3L1 (Väänänen et al., 2017).

Dans les modèles d'études précliniques, l'induction de l'arthrose par transection du ligament crucial antérieur ("*anterior curcial ligament transection*" ACLT) chez le rat aboutit à l'augmentation du nombre de cellules positives aux chitinases (CHIT1 et Chi3L1) visibles par immunohistochimie (Di Rosa et al., 2014a) et à l'augmentation de l'expression du gène codant pour Chi3L1 dans l'articulation totale chez le chien dès 6 semaines après la chirurgie (Lorenz et al., 2005). De manière intéressante, l'administration en systémique (voie intra-péritonéale chez la souris) de Chi3L1 provoque une immunisation et le développement d'une arthrite (Verheijden et al., 1997). On retrouve le même phénomène avec son

homologue, Chi3L2 (Sekine et al., 2001). On notera pour terminer que, dans l'arthrite juvénile idiopathique, les taux de Chi3L1 dans le liquide synovial, liés, vraisemblablement, aux lymphocytes T Th17, sont corrélés avec les taux de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL6 et l'IL12 (Capone et al., 2016).

Pour expliquer ce lien entre Chi3L1 et pathologies rhumatologiques, Di Rosa et al. ont étudié le rôle des chitinases dans la balance formation/résorption osseuse. Ainsi, les niveaux d'expression (ARN et protéines) des chitinases CHIT1 et Chi3L1 augmentent durant la différenciation des monocytes en macrophages ou en ostéoclastes (Di Rosa et al., 2014b). Dans les ostéoclastes matures, la neutralisation de ces deux chitinases grâce à des siARN se traduit par une diminution de leur capacité à digérer la matrice osseuse. Ces résultats suggèrent que les chitinases, dont Chi3L1, pourraient être impliqués dans la résorption osseuse comme pouvaient déjà le suggérer les corrélations entre chitinases et MMP9, une métalloprotéase importante dans le recrutement des ostéoclastes (Engsig et al., 2000)(Di Rosa et al., 2014b). En ce qui concerne les ostéoblastes, Sanchez et al. ont comparé les sécrétomes des ostéoblastes de patients OA prélevés soit dans une zone sclérotique de l'os sous-chondral, soit dans une zone non sclérotique. On retrouve Chi3L1 parmi les 13 protéines surexprimés par les ostéoblastes issus d'os sous chondral sclérotique, ce qui le relie à ce paramètre de l'arthrose (Sanchez et al., 2018).

Pour étudier l'impact de Chi3L1 sur le cartilage, Jacques et al. ont observé ses effets biologiques sur des chondrocytes costaux murins. La stimulation durant 24h par Chi3L1 stimule l'expression au niveau protéique de Sox9 (facteur de transcription favorisant la chondrogenèse) et de collagène II par la voie PI3K/Akt (Jacques et al., 2007). Les résultats similaires obtenus sur chondrocytes humains (augmentation de l'expression des gènes du collagène II et de l'aggrecan) ont amené ces auteurs a proposé Chi3L1 comme une protéine

pro-chondrogénique et impliquée dans la réponse initiale de tentative de réparation du cartilage dans l'arthrose (Jacques et al., 2007). Ce résultat est corroboré par une étude transcriptomique destinée à mettre en évidence les voies et protéines importantes dans la chondrogenèse développementale (Zhou et al., 2019). La comparaison de pré-chondrocytes à des chondrocytes foetaux s'est conclu par la mise en évidence de 30 gènes centraux dans la chondrogenèse dont font partie Chi3L1 et Chi3L2 (Zhou et al., 2019). Toujours dans le sens d'un rôle positif des chitinases sur le cartilage, Chi3L1 stimule de manière dose-dépendante la prolifération (mesurée par MTT) des chondrocytes et des synoviocytes de cochon d'Inde et de lapin *in vitro* (De Ceuninck et al., 2001). Il stimule également la synthèse de protéoglycanes (De Ceuninck et al., 2001). Néanmoins la stimulation de la prolifération des synoviocytes, à mettre en regard de l'hyperplasie de la membrane synoviale, suggère elle, un rôle délétère. Les travaux de Karalilova et al. vont, en effet, dans le sens de cette hypothèse. Les scores obtenus grâce aux techniques d'ultrasonographies pour évaluer la synovite (inflammation de la synoviale) et la néo-vascularisation chez le patient OA corrèlent avec les taux plasmatiques de Chi3L1 (Karalilova et al., 2018). Ce lien pourrait s'expliquer par le rôle de Chi3L1 dans l'angiogenèse et la fibrose, développé précédemment (Johansen et al., 1997)(Shao et al., 2009).

Chi3L1 semblerait donc comme DKK1 impliqué dans le maintien de l'équilibre entre résorption et formation osseuse, plutôt dans le sens de résorption osseuse, suggérant hypothétiquement un rôle causal dans la RA (Di Rosa et al., 2014b). Dans l'OA, Chi3L1 aurait donc probablement pour rôle de rétablir cette équilibre, expliquant ses niveaux élevés dans le liquide synoviale de patients et dans les zones sclérosées de l'os sous-chondral (Väänänen et al., 2014)(Sanchez et al., 2018). Néanmoins, même en admettant que Chi3L1 aurait des propriétés positives sur le cartilage et un rôle dans la réparation, ses activités pro-

inflammatoire, pro-fibrotique et pro-angiogénique expliqueraient un certain nombre de symptômes de l'OA. Les taux élevés de Chi3L1 seraient alors le fait d'un processus de réparation non résolu qui finirait par se traduire par un impact négatif sur le tissu.

6. Article 1

Depuis deux dizaines d'années, de nombreuses études convergent vers un lien entre l'accumulation de cellules sénescentes p16 positive dans les tissues et le développement de nombreuses pathologies dont fait partie l'arthrose. Ainsi, en 2001, Martin JA et al. proposent que les changements structurels du cartilage, de sa matrice et de ses propriétés mécaniques observés avec l'âge et menant à l'arthrose soient liés à la sénescence des chondrocytes. Ils mettent en évidence des télomères raccourcis et des niveaux d'activité de la β-galactosidase acide plus élevés chez les chondrocytes de patients âgés, témoignant d'une accumulation plus importante de cellules sénescentes (Martin and Buckwalter, 2001). Seulement, de nombreuses inconnues subsistent encore au sujet de ce lien entre sénescence et arthrose. En effet, si l'élimination spécifique des cellules p16-positives dans tous l'organisme semble empêcher le développement de la pathologie, l'inactivation somatique de cet inhibiteur du cycle cellulaire, spécifiquement dans les chondrocytes, ne produit pas le même effet (Diekman et al., 2018).

Ce constat nous a amené à nous intéresser aux cellules souches/stromales mésenchymateuses, ces effecteurs chargés du maintien de l'homéostasie de l'articulation. Nous avons émis l'hypothèse que la sénescence de ces cellules serait à l'origine de la dérégulation de l'équilibre articulaire et du développement de la pathologie arthrosique. Les objectifs du travail présenté ci-après ont ainsi été, dans un premier temps, d'évaluer l'implication de la sénescence et des cellules p16 positives dans le développement de la pathologie. Dans un second temps, nous avons mis au point un modèle d'étude de la sénescence des cellules souches/stromales mésenchymateuses pour ensuite déterminer si

ce phénomène pouvait être causal ou non, dans des modèles *in vitro* et *in vivo* d'étude de l'arthrose. L'article présenté sera prochainement publié dans la revue *Aging.*

Mesenchymal stem cell senescence alleviates their intrinsic and seno-suppressive properties contributing to osteoarthritis development

Olivier Malaise[1,2]*, Yassin Tachikart[1]*, Michael Constantinides[1], Marcus Mumme[1,3], Rosanna Ferreira-Lopez [4], Sandra Noack[5], Christian Krettek[5], Daniele Noël[1,4], Jing Wang[6], Christian Jorgensen[1,4] and Jean-Marc Brondello[1#]

[1]IRMB, Univ Montpellier, INSERM, Montpellier, France.

[2]GIGA Research, CHU of Liège & University of Liège, Liège, Belgium.

[3]Clinic for Orthopedics and Traumatology, University Hospital of Basel, Basel, Switzerland.

[4]Hôpital Lapeyronie, Clinical immunology and osteoarticular diseases Therapeutic Unit, Montpellier, France.

[5]Trauma Department, Hannover Medical School, Hannover, Germany
[6]INM, Univ Montpellier, INSERM, Montpellier, France

* co-authors

Running title: Role of senescent MSCs in osteoarthritis onset

Key words: senescence, tissue homeostasis, mesenchymal stem cells, osteoarthritis

Corresponding author:

Dr Jean-Marc Brondello Ph.D HDR

IRMB U1183

CHU St Eloi,

80 Avenue A. Fliche

34280 Montpellier cedex 05

Tel: +33(0)4-67-33-57-19

Email: jean-marc.brondello@inserm.fr

ABSTRACT

Tissue accumulation of $p16^{INK4A}$-positive senescent cells is associated with age-related disorders, such as osteoarthritis (OA). These cell-cycle arrested cells affect tissue function through a specific secretory phenotype. The links between OA onset and senescence remain poorly described. Using experimental OA protocol and transgenic *Cdkn2a*$^{+/luc}$ and *Cdkn2a*$^{luc/luc}$ mice, we found that the senescence-driving $p16^{INK4a}$ is a marker of the disease, expressed by the synovial tissue, but is also an actor: its somatic deletion partially protects against cartilage degeneration. We test whether by becoming senescent, the mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) found in the synovial tissue and sub-chondral bone marrow, can contribute to OA development. We established an *in vitro* $p16^{INK4a}$-positive senescence model on human MSCs. Upon senescence induction, their intrinsic stem cell properties are altered. When co-cultured with OA chondrocytes, senescent MSC show also a seno-suppressive properties impairment favoring tissue degeneration. To evaluate *in vivo* the effects of $p16^{INK4a}$-senescent MSC on healthy cartilage, we rely on the SAMP8 mouse model of accelerated senescence that develops spontaneous OA. MSCs isolated from these mice expressed $p16^{INK4a}$. Intra-articular injection in 2-month-old C57BL/6JRj male mice of SAMP8-derived MSCs was sufficient to induce articular cartilage breakdown. Our findings reveal that senescent $p16^{INK4a}$-positive MSCs contribute to joint alteration.

INTRODUCTION

Tissue homeostasis is ensured by the equilibrium between self-repair mechanisms of differentiated cells and their replacements through differentiation of tissue-specific adult stem cells [1]. During aging, this equilibrium is progressively lost as a result of time-dependent decrease in stem cell functions, such as self-renewal, differentiation, and tissue repair capacities [1]. Furthermore, senescent cell accumulation in tissues is one of the key processes that contribute to age-related health decline and chronic disease progression [2]. Senescent cells are characterized by growth inhibition, functional changes, and the presence of the so-called senescence-associated secretory phenotype (SASP) that includes the expression of inflammatory and trophic factors as well as tissue remodeling matrix metalloproteases (MMP) [2]. Senescence onset can occur in proliferative, post-mitotic differentiated cells, and even in resting stem cells [1,3].

Osteoarthritis (OA), the most common osteoarticular disease, is a consequence of progressive age-induced joint senescence, leading to cartilage degeneration, osteophytosis, sub-chondral bone remodeling but also synovial hypertrophy or joint effusion[4,5]. In conditions of homeostasis, joint cartilage relies on chondrocyte self-repair mechanisms, and on the autonomous and non-autonomous functions of the resident mesenchymal stem cells (MSCs). These non-hematopoietic $CD34^-$, $CD105^+$, $CD90^+$, $CD73^+$ cells are mainly found in sub-chondral bone marrow and the knee synovial tissue [6,7]. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that MSCs can form neocartilage and have remarkable tissue supportive functions through paracrine trophic factor production [8] and cell-to-cell direct contacts [9].

During OA progression and joint aging, the number of senescent cells detected in the articular cartilage, but also in the synovium and fat pad tissue, increased [10,11]. Indeed,

chondrocytes isolated from OA patients express two cell-cycle inhibitors (the senescence marker $p16^{INK4a}$, and $p57^{KIP2}$ [12]), and produce reactive oxygen species such as NO, remodeling catabolic enzymes but also inflammatory cytokines [11-13]. Pharmaco-genetic removal of $p16^{INK4a}$-positive senescent cells in OA animal models demonstrated their implication in disease onset [13]. However, among all senescent cells present in the joint during OA and aging, it is not fully understood how senescence of the resident articular osteochondral progenitors (i.e., MSCs) can contribute to cartilage loss of function. Therefore, in this study we aimed at determining whether $p16^{INK4a}$-positive senescent MSCs can contribute to loss of cartilage homeostasis during OA pathogeny using *in vitro* and *in vivo* OA models.

RESULTS

Expression of the senescence *Cdkn2a-encoding* product p16^{INK4a} is a hallmark of experimental collagenase-induced OA and is partially required for cartilage degradation.

First, we wanted to monitor the appearance of senescent cells after OA induction in the collagenase-induced OA (CIOA) model[14], which mimics joint inflammation and synovitis that are observed in 1/3 of patients with OA[5]. To this aim, we performed intra-articular injection (at day 0 and day 2) of collagenase type VII in the left knee and saline solution in the right knee of 2-month-old C57BL/6JRj male mice, as previously described [15], and collected joints at day 14, 28 and 42 post-injection. Analysis of cartilage degradation (OA score) and synovitis, as previously described[16], showed progressive cartilage degradation and early synovial activation *(Figure 1a and 1c*) in the collagenase-injected joint, but not the NaCl control ones.

This was correlated in the synovial tissue with transient gene expression at day 14 of the senescence marker p16^{INK4a}, but also with expression of the SASP factors (IL1-b, IL-6 and MMP13) *(Figure 1b)*. To confirm p16^{INK4a} expression during experimental OA, we used 2-month-old *Cdkn2a*$^{+/luc}$ mice in which the promoter of gene encoding p16^{INK4a} drives the expression of the reporter gene luciferase [17]. At day 14, 24, 35 and 42 after the first injection of collagenase type VII in the left knee and saline in the right knee (as before), we injected Cyc-Luc^{R} intra-peritoneally and intra-articularly, and then determined the luminescence signal intensity using a CDD camera (*Figure 1d*). Comparison of the two knees in each mouse showed a significant and transient peak of luciferase activity at day 24 in the OA joint following its mRNA induction at day 14 and reflecting the presence of p16^{INK4a}-positive senescent cells (*Figure 1e and 1f*). We next asked whether p16^{INK4a} was required for cartilage

and joint alteration following OA onset. To this aim, we induced CIOA in heterozygous *Cdkn2a*$^{+/luc}$ mice that retains p16^{INK4a} protein expression and in homozygous *Cdkn2a*$^{luc/luc}$ mice lacking p16^{INK4a} expression [17]. At day 42 post-injection, histological analysis of paraffin-embedded knee tissue sections stained with Safranin-O/Fast Green *(Figure 1g and h)* showed that the mean (± SEM) OA score in collagenase-injected knees was 15.8 ± 5.8 in *Cdkn2a*$^{+/luc}$ mice and 10.24 ± 5.8 in *Cdkn2a*$^{luc/luc}$ mice ($p<0.05$). This significant difference in OA score demonstrates that p16^{INK4a} ablation partially protects against OA-driven cartilage degradation. Micro-CT analysis of histo-morphometric parameters did not reveal any difference between *Cdkn2a*$^{+/luc}$ and *Cdkn2a*$^{luc/luc}$ mice in term of collagenase-induced subchondral bone remodeling (bone volume, bone surface, bone surface/bone volume ratio and subchondral bone height) *(data not shown)*. This finding and the recent demonstration that specific somatic *Cdkn2a* gene inactivation in joint chondrocytes has no impact on OA onset [18] suggest that other joint cell types acquire a deleterious p16^{INK4a}-driven senescence phenotype during disease development.

Senescent p16^{INK4a}-positive MSCs show impaired self-renewal and *in vitro* cartilage formation capacities altogether with specific secretory profile.

Cartilage homeostasis relies primarily on the cartilage self-repair mechanisms and on MSCs found mainly in the bone marrow of sub-chondral bones and in synovial tissue [19,20]. MSCs contribute to cartilage homeostasis through their self-renewal capacities and chondrogenic differentiation into neocartilage [21,22]. However, MSCs might also contribute to OA onset because increased TGF-β signaling in MSCs is sufficient to induce cartilage breakdown in a transgenic mouse model [19]. Therefore, we first asked *in vitro* whether MSCs senescence could be implicated in OA pathogeny.

To this aim, we incubated human bone marrow-derived MSCs isolated from human healthy donors with etoposide, a senescence-promoting DNA-damage inducer, for 7 hours and then cultured them for 2 weeks. Following treatment, MSCs show an increase in the percentage of SA b-galactosidase-positive cells compared to untreated MSCs (64.4% ± 12.2 and 9.6% ± 3.2, respectively, $p<0.0001$) *(Figure 2a and 2b).* Proliferative rate *(Figure 2c)*, BrdU incorporation *(Figure 2d),* and colony formation unit capacity *(Figure 2e)* were reduced in treated MSCs compared with control. Moreover, the mRNA and protein expression levels of the two main senescence markers ($p16^{INK4a}$ and $p21^{cdkn1a}$) were increased *(Figure 2f and 2g)* confirming senescence onset. We next used TGFb3-driven chondrogenic protocol to *in vitro* differentiate MSCs into cartilage. We showed that senescence induction alleviates MSC capacities to form cartilage in micro-mass setting as revealed by phase contrast imaging (*Figure 2h*). Finally, we performed a differential protein array analysis of senescent or proliferating MSCs allowing us to determine SASP protein expression. Among the 105 inflammation-related proteins tested, the comparative analysis identified 13 candidates that were common to three MSC isolated from healthy donors. We thus found DKK1 (a WNT antagonist factor known to trigger OA when overexpressed in a mouse model [23]), CHI3L1/YKL-40 and IGFBP-3 (two OA synovial fluid biomarkers that correlate with disease progression[24,25]), and IL-8 and CCL2/MCP1 (two inflammatory cytokines that trigger *in vitro* senescence onset and that are usual component of the SASP [26,27]) (Figure 2h). This profile specific of senescent MSCs by its composition could affect thus joint homeostasis by production of promoting OA and senescence spreading factors. Altogether, our findings demonstrate that following 7 hours of etoposide treatment, MSCs undergo senescence, lose their stemness properties and produce specific factors.

Senescence alleviates *in vitro* MSCs seno-suppressive functions.

To maintain articular homeostasis following cartilage injury, MSC rely also on their paracrine chondroprotective properties toward functionally-altered chondrocytes. For instance, using trans-well co-culture systems, previous studies have shown that MSCs can reduce the expression of some hypertrophy and fibrotic markers in OA chondrocytes [8]. To determine whether senescence could change this central MSC tissue support function, we co-cultured for 7 days, using the same trans-well setting, OA chondrocytes with proliferative (control) or senescent $p16^{INK4a}$-positive MSCs *(Figure 3a)*. As expected, control MSCs significantly reduced in OA chondrocytes, the expression of TGF-β1 and ADAMTS3, two hypertrophic markers associated with the SASP as well as the fibrotic marker collagen 3 (Col3). Remarkably, these MSC reduce also expression for senescence-associated cell cycle inhibitors namely $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$ and $p27^{KIP1}$ in OA chondrocytes *(Figure 3b)*. Our results emphases then a protective, anti-fibrotic and anti-senescent extrinsic properties for these stem cells towards OA chondrocytes. However, when these cells became senescent, repression of these cell cycle inhibitors and some SASP factors in OA chondrocytes, is lost *(Figure 3b)*. Thus, the seno-suppressive effect is abolished arguing here that senescence state in MSC, maintains and/or participates to chondrocytes loss of function during OA progression or cartilage aging.

Senescence-accelerated SAMP8 mice develop spontaneous early osteoarthritis.

To demonstrate the causal role for senescent MSCs in OA pathogeny *in vivo*, we rely on the senescence accelerated mouse-prone (SAMP8) mouse. This strain harbors mutations in the mitochondrial genome causing an progressive increase in systemic oxidative stress, high

level of cell senescence in epididymal adipose tissue [28], retinal cells [29], aorta [30], astrocytes [31], or cochlea [32], and premature aging phenotypes [28-31]. We first verify that SAMP8 prematurely develop OA. To this aim, we analyzed by Micro-CT, bone and cartilage structures in 8-month-old mice revealing a significant higher bone surface/bone volume ratio and a significant lower subchondral bone volume on the lateral femoral subchondral bone area of SAMP8 compared with SAMR1 control mice *(Figure 4a and 4b).* This finding indicates early subchondral bone structure remodeling and degradation as found in OA patients. Ectopic ligamental and meniscal knee calcification were also present in 50% of the analyzed SAMP8 animals *(Figure 4a and 4c*). Furthermore, the knee OA degradation score was significant higher in 11-month-old SAMP8 than SAMR1 control animals (*Figure 4d and 4g*), and was associated with higher synovitis *(Figure 4e)* and osteophytosis scores (*Figure 4f*). Altogether, this indicates that senescence-prone SAMP8 mice develop spontaneous joint OA signs that resemble the human disease.

Intra-articular injection of senescent MSCs isolated from SAMP8 mice is sufficient to induce cartilage degeneration in young wild-type mice.

We next wanted to link premature OA development in these SAMP8 mice and the presence of senescent MSCs. To this aim, we isolated enriched mesenchymal stromal/stem population from 6-months SAMP8 and SAMR1 mice after bone marrow flushing, as previously published and 2 weeks of selection for cell culture adhesion [33]. Several cell cycle inhibitors associated with senescence state such as $p16^{INK4a}$, $p19^{ARF}$ and $p21^{Cdkn1a}$, and some SASP factors namely TGF-β1 and MMP-13, were upregulated in SAMP8 MSCs compared with SAMR1 MSCs *(Figure 5a)* [34,35]. As expected for senescent cells, these SAMP8 MSCs show also an increase in SA-b-galactosidase activity (*Figure 5b*) but a surprisingly non-classical inflammatory SASP as

demonstrated by absence in IL-6 and IL-1β expression levels *(Figure 5a)*. Then, to challenge our hypothesis whether senescent MSCs can contribute to OA development, we intra-articulary delivered $2.5x10^5$ MSCs from SAMP8 or SAMR1 mice in 2-month-old C57BL/6JRj male mice at day 0. At day 42 post-injection, each injected mouse was sacrificed and dissected joints analyzed as in Figure 4 (*Figure 5c*). Histological analysis after Safranin-O/Fast green staining showed that injection of SAMP8 MSCs strongly promoted cartilage degradation compared with SAMR1 MSCs (mean OA score = 12.2 ± 0.69 and 6.1 ± 1.6, respectively; $p<0.05$) *(Figure 5d and 5e)*. Furthermore, subchondral bone analysis by micro-CT revealed, even if not significant, a trend toward a higher bone surface/bone volume ratio and a lower subchondral bone volume in the medial compartment in SAMP8 MSCs injected mice *(Figure 5f)*. These results demonstrate that senescent MSCs are sufficient to trigger alone cartilage and joint dysfunction in young wild-type mice, similar to the phenotypes observed in senescence-accelerated SAMP8 mice and in human patients.

DISCUSSION

The presence of $p16^{INK4a}$-positive senescent cells is a well-recognized hallmark of several age-related pathologies but also ongoing tissue repair processes (for review [36,37]). Indeed, following intrinsic and extrinsic insults, numerous tissues express senescent-induced cell cycle inhibitors such as $p16^{INK4a}$, together with the establishment of a specific micro-environment which is normally required for tissue repair coordination [38,39]. But during aging, secondary to their tissue accumulation, senescent cells contribute instead to the progressive loss of organ functions and to the development of age-related diseases [2].

OA is the most frequent age-related joint degenerative pathology, leading to progressive cartilage erosion and bone sclerosis[40]. Chronic low-grade inflammation and synovial hypertrophy, which is found in 1/3 of patients with OA, contribute to joint remodeling during disease progression[41]. In this work, we showed, using the collagenase-induced OA protocol to mimic articular inflammation and synovial hypertrophy [41], that joint cellular senescence transiently accumulates during disease time-course. This finding confirms recent reports based on other OA experimental-induced models showing that joint senescence is detected and contributes to OA development and cartilage aging [13,42]. In the CIOA model, we notably observed the transient upregulation of the senescence marker $p16^{INK4a}$ and of three SASP factors (IL1-b, IL-6 and MMP13) in the synovial tissue following collagenase injection (*Figure 1*). These results propose that presence of joint senescence either results from attempts to repair tissue injury or contribute to tissue degeneration.

Thus, we try to decipher which impact, negative or positive, could play $p16^{INK4a}$-expression during OA pathogeny in the CIOA model. We used the transgenic $Cdkn2a^{+/luc}$ and $Cdkn2a^{luc/luc}$ mice, in which the $Cdkn2a^{luc/luc}$ lacks $p16^{INK4a}$ expression. We found that after OA induction, absence of $p16^{INK4a}$ expression significantly protects against OA-driven cartilage degradation, demonstrating rather a deleterious role for $p16^{INK4a}$-activated cells within the injured joints (*Figure 1*). $p16^{INK4a}$ regulates, through its kinase inhibitory function, the senescence-induced cell cycle arrest and also the production of articular catabolic SASP factors giving an explanation on such effect [11,43]. However, the observed incomplete cartilage protection in these somatic $p16^{INK4a}$ deficient mice can be due to redundancy in other senescence signaling pathways which are therefore also implicated in the progressive cartilage breakdown [44].

Diekman *et al*. recently reported that inactivation of $p16^{INK4a}$ in joint chondrocytes does not protect against OA [18]. We then wondered whether other joint resident cells can become senescent and thus could be involved in cartilage breakdown and joint loss of functions. Such cells could be tissue-resident MSCs that contribute to cartilage homeostasis through their stemness and articular-supportive properties. They are present in each joint compartment, especially in synovial membrane where we identified $p16^{INK4a}$ expression. Some previous studies in mouse models suggested also that MSCs in sub-chondral bone could trigger OA onset upon increased TGFb1 production [19]. In agreement, TGF-βR type II knock-out in MSCs prevents cartilage degradation following OA induction [19]. MSCs are therefore good candidate cells, when senescent to be at the root of OA during aging.

To challenge this hypothesis, we first induced senescence *in vitro* on human primary MSC by short exposure to the DNA-damaging agent etoposide (*Figure 2*). This led to a reduction of MSC proliferation rate and colony formation units. Upon treatment, MSCs exhibited increased β-galactosidase activity and expression for typical cell-cycle inhibitors ($p16^{INK4a}$, $p21^{Cdkn1a}$ and $p27^{Kip1}$). Furthermore, *in vitro* cartilage differentiation capacities were also impaired following senescence. Finally, protein array analysis of such MSCs revealed a senescence signature that was similar to what previously described for other cell types (*e.g.,* Chi3L1, IL8, MCP-1/CCL2, upregulation) [45]but several other proteins were specifically overexpressed by senescent MSCs. In particularly, we identified DKK1, a secreted factor involved in WNT signaling inhibition during hear, head and forelimb formation [46]. DKK1 level is also increased in the brain from patients with Alzheimer's disease [46], where senescent astrocytes accumulate[47], and also in patients with osteoporosis, where senescent bone cells are found [48]. Altogether, these data and our findings suggest DKK1 as a novel senescence-associated trophic factor potentially participating to the physiological and pathological aspects of senescence during ontogeny and diseases. Although DKK1 role in OA is still unclear, several studies showed an association between high articular DKK1 levels and OA progression [49,50]. Somatic overexpression of DKK1 in mice triggers premature bone remodeling and cartilage degradation related to OA pathogenesis [51,52]. It would be interesting to evaluate in such transgenic model the presence of senescent cells in particular within the pool of resident MSC giving thus an explanation how the SASP of senescent MSC leads to loss of joint homeostasis during OA and aging.

Accordingly, MSCs isolated from older donors show also an increase in senescence marker expression and a decrease in multipotency properties as in mice [48]. By creating a low

inflammatory articular micro-environment, it was speculate that these MSC from elderly can favor the emergence of age-driven osteo-articular diseases [53]. Thus, it seems that senescence not only reduces the pool of functional resident articular stem cells but also their osteo-chondral capacities hence contributing to progressive joint defect with aging (*Figure 2*): here, we found that MSC extrinsic cartilage regenerative properties are also impaired during senescence. In contrast to proliferative cells, senescent MSCs were indeed not able to reduce the levels of senescence and SASP/hypertrophic markers in OA chondrocytes (*Figure 3*). Furthers investigations are required to determine whether senescence in MSC leads to a gain of senescence-promoting functions through the establishment of a deleterious articular SASP (Figure 2) or on the contrary induces the loss of their seno-suppressive functions (Figures 3). Limitations for such studies reside in the absence of available healthy cartilage samples to perform proper co-culture conditions. Nevertheless, following senescence, changes in MSC interplay towards OA chondrocytes contribute to maintain joint dysfunction.

To assess whether senescent MSC can directly affect healthy cartilage functionalities *in vivo*, we injected in the joints of young mice, bone marrow stromal population isolated from senescence-accelerated SAMP8 mice. These senescent MSCs alone are sufficient to mediate OA-like cartilage degradation demonstrating *in vivo* their causative role in OA onset (*Figure 5*). This is reminiscent of the deleterious role of senescent MSCs isolated from SAMP6 mice, a mouse model of spontaneous osteoporosis[54] and are in agreements with the recent finding that injection of senescent human MSCs in SCID mice induces cartilage degradation [55]. Remarkably, injected senescent MSCs were extracted from SAMP8 mice suffering from a spontaneous OA cartilage phenotype, synovial inflammation, osteophytosis and subchondral bone modification (*Figure 4*). This spontaneous osteoarthritic condition

makes SAMP8 strain mouse as an interesting model for senescence-driving OA studies. All these dysfunctional osteo-articular tissues rely normally on MSC for homeostatic maintenance. Finding senescence markers in SAMP8-derived MSCs gave an overview on the impact of senescent stem cells on joint functionality. In agreement with, senescent SAMP8 MSCs when injected into young mice can also trigger such pleiotropic osteo-articular dysfunctional phenotypes resulting from either the non-inflammatory SASP of these cells or from a cell-to-cell mediated interactions. This finding confirms our hypothesis that MSC senescence can have axial deleterious articular functions in some pathological conditions.

It was also shown by others that senescent MSCs can alter the subchondral bone micro-environment and structure by increasing osteoclast differentiation and adipocyte differentiation [56]. We can therefore conclude that cumulative senescence in MSCs will affect all joint compartments, contributing to OA development, progressive bone restructuration and articular aging. This seems to be a global pro-aging driving phenomenon common to other mesodermal tissues. For instance, senescent MSCs are observed in myelodysplasic syndrome [57], accumulate in the nucleus pulposus of the intervertebral degenerative disc in older patients [58], and senescent MSCs are found early in Hutchinson Gilford Progeria syndrome [59]. Altogether, our findings raise the need to identify seno-therapeutic agents that specifically target senescent MSCs with the aim of improving the regenerative potential of all osteo-articular tissues in elderly [45].

METHODS

Animal experiments

6-weeks-old C57BL/6JCj male mice were obtained from Janvier Laboratory. SAMP8 and SAMR1 mice were bought from Envigo laboratory. Transgenic *Cdkn2a*$^{+/luc}$ and *Cdkn2a*$^{luc/luc}$ mice were obtained from K.B. Sharpless's laboratory. Animal experiments were performed in accordance with the guidelines by the local ethics committee on animal research and care (approval CEEA-LR-10042). After sacrifice, soft tissues and muscles around the knee were dissected and removed. Patella was removed and the supra-patellar synovium tissue was isolated and stored in 200µL Trizol at -80°C. The knee joint was separated, fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C for 2 days, and decalcified by incubation at +4°C in a large volume of 14% EDTA for 21 days. The EDTA solution was changed every 3 days. Samples were then stored in PBS at +4°C.

Experimental osteoarthritis and intra-articular injections:

Experimental OA was induced in 6-weeks-old male mice according to the CIOA procedure. Under general anesthesia (isoflurane inhalation), the knee area was disinfected with ethanol and a small cut (a few millimeters) was performed in the cutaneous and subcutaneous tissue to visualize and to access the knee. Then, each mouse received an intra-articular injection of 5µL (1IU) collagenase VII in the left knee to induce OA and 0.9% NaCl in the right knee as control, followed by a second injection two days later. Intra-articular injections of BM-MSCs were performed in 6-weeks-old male mice following the same procedure: 8µL of PBS containing $2.5x10^4$ BM-MSCs isolated from SAMP8 or from SAMR1 mice in the left knee at day 0.

Bioluminescence imaging

For luciferase signal detection, mice were anaesthetized before intraperitoneal (100µL) and intraarticular (10µL) injection of the luciferase substrate Cyc-Luc (300µg/mL) (Merck). A few minutes later, mice were placed in the dark chamber and a grey-scale image was first recorded with dimmed light followed by acquisition of luminescence images using a cooled charged-coupled device (CCD) camera (PIXIS 1024B; Princeton Instruments).

Bone parameter analyses and Safranin-O/Fast Green staining for cartilage analysis

Hind leg paws were dissected to remove smooth tissues and scanned in a micro-CT scanner SkyScan 1176 (Bruker, Belgium, 0.5 mm aluminum filter, 45 kV, 500 µA, 18 µm resolution, 0.5° rotation angle). Scans were reconstructed using CTAn v1.9, Nrecon v1.6 (Bruker, Belgium) and a three-dimensional (3D) model visualization software program (CTVol v2.0). Misalignment compensation, ring artifacts and beam-hardening were adjusted to obtain the correct reconstruction of each paw. Bone degradation was quantified in subchondral bone and the epiphysis region of the medial and/or lateral plateau for each tibia (CTAn software, Bruker, Belgium). Meniscal and ligament calcifications were quantified on the entire knee joint. Reconstructed 3D images of joints were obtained using the Avizo software (Avizo Lite 9.3.0, FEI, France). For cartilage analysis, mouse knees were fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C for 48h, washed in PBS, and then processed for routine histology. Knees were decalcified in 14% EDTA/PBS for three weeks and then paraffin-embedded. Tissue sections (5 µm) were rehydrated through a gradient of ethanol and xylene. Sections were then stained with Safranin-O/Fast Green solution to evaluate cartilage degradation using the OA scoring system adapted for mice[16].

Cell types and culture conditions

Human MSC cultures were established from bone marrow aspirates of healthy donors after signature of the informed written consent and approval by the local and national ethics committees (committee of Hannover Medical school with votum No. 2562). MSCs were isolated and amplified in complete alpha-minimum essential medium (Ozyme; BE12-169F-12) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine, and 1 ng/mL of basic fibroblast growth factor-2 (Miltenyi Biotec; GER 130-104-924). For DNA damage-induced senescence, MSCs were incubated with 12.5 µM etoposide (E1383 Sigma, USA) for 7h. Senescence levels were evaluated after 14 days (medium changed every 3 days). Human OA chondrocytes were isolated from cartilage of patients with OA undergoing knee arthroplasty after signature of the informed written consent and approval by the national ethics committee ('Cellule de bioéthique de la direction générale pour la recherche et innovation, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche'; registration number DC-2009-1052). OA chondrocytes were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum (Sigma, USA), 1% penicillin/streptomycin (Lonza, CH), and 2 mM L-glutamine (Lonza, CH).

Bone marrow mesenchymal stem cell isolation

Bone-marrow MSCs (BM-MSC) were isolated from the right leg of SAMP8 and SAMR1 mice. Femur and tibia were dissected, and diaphyses were flushed with PBS. Cell suspensions were filtered and plated at a concentration of $1x10^6$ cells/cm^2 in DMEM medium supplemented with 10% FBS (Hyclone, Thermo Fisher Scientific), 2mM glutamine, 100U/mL penicillin, 100mg/mL streptomycin (Lonza, Levallois-Perret, France) and 2ng/mL human basic fibroblast

growth factor (R&D Systems, Lille, France). Medium was changed daily to remove red blood cells and non-adherent cells. BM-MSCs were stored at -80°C after passage 1.

Co-culture experiments

Co-culture experiments were performed as previously described [8]. Briefly, $5x10^5$ OA chondrocytes/well were plated on the bottom of 6-well plates and cultured with MSCs ($7x10^4$ cells/insert) in cell culture inserts (PET membranes, 0.4 µm pores, BD Biosciences, UK). Cultures were maintained in 3 mL of minimal medium (DMEM supplemented with 100U/mL penicillin and 100mg/mL streptomycin, 0.35 mmol/L proline, 0.17 mmol/L ascorbic acid, and 1 mmol/L sodium pyruvate) for 7 days when chondrocytes were collected for RT-qPCR analysis.

Gene expression analysis by real-time quantitative PCR

For qPCR experiments, total RNA was extracted from cells using the RNeasy® Mini kit (Qiagen; 74106) according to the manufacturer's instructions. RNA quality was checked by spectral analysis (A260/ 280 nm), and then samples were stored at −80°C. Reverse transcription was performed using the M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen; 28025013; 5U/µL final concentration), 500ng total RNA, a random hexamer primer (Thermo Scientific, GER; S0142; 10ng/µL final concentration), and DNTPs (Roche, CH; 1 277 049; 5mM final concentration) in M-MLV reverse transcriptase buffer (Invitrogen; 18057-018), for a total volume of 20µL. SYBR Green-based quantitative PCR was performed using the LightCycle® 480 SYBR Green I master reaction mix (Roche, 04707516001), 10 ng of cDNA, and the LightCycler 480 real-time PCR system (Roche) (40 cycles of amplification). Raw data (Ct values) were analyzed using the comparative Ct method. Gene expression data were

calculated as relative to the expression of housekeeping genes. The comparative threshold cycle method (ΔΔCT) was used to quantify relative gene expression, and the obtained quantification was transformed to exponential 2−ΔΔCT values. A p-value below 0.05 (Student's *t*-test) was considered as statistically significant. Primers sequences used for RT-qPCR are listed in Supplementary Table 1.

Proliferation, Colony Forming Unit (CFU) assays and BrdU incorporation.

For CFU assays, $3x10^3$ MSCs were homogeneously plated in 60mm dishes. After 10 days, when cell colonies emerged, cultures were fixed with methanol and stained with Giemsa dye solution diluted 20X for counting. For BrdU incorporation analysis, $12x10^3$ MSCs were plated on coverslips 14 days after etoposide treatment or not. Cells were incubated with 10µM of BrdU in fresh culture medium for 21 hours, and then fixed with 3.7% paraformaldehyde solution at room temperature (RT) for 15min. Cells were permeabilized by adding 0.3% Triton X-100 in PBS at RT for 30min. After Triton X-100 removal, 500µL of 2N HCl solution was added at RT for 10min, followed by incubation with 10% donkey serum in PBS at RT for 30 min. Then, cells were incubated with rat anti-BrdU IgG (1:250 in 3% BSA/PBS, Abcam; ab6326) at 37°C for 2 hours, followed by 488 Alexa Fluor® conjugated goat anti-rat IgG (1:500 in PBS, Thermo Fisher Scientific; A-11006) at RT for 1 hour. Coverslips were mounted with Prolong Gold Antifade Reagent (Thermo Fisher Scientific; 11569306) containing 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Cells with nuclear BrdU signal were counted as positive among at least 100 DAPI-positive cells from 10 images of randomly chosen fields for each sample, using the ImageJ software.

***In vitro* chondrogenic differentiation**

Chondrogenic differentiation of MSCs was induced by 21-day culture in micropellet, as explained previously [60]. Briefly, MSCs (2.5×10^5 cells) were pelleted by centrifugation in 15 ml conical tubes and cultured in chondrogenic medium (DMEM supplemented with 0.1 µM dexamethasone, 0.17 mM ascorbic acid, 1% insulin-transferrin-selenic acid (ITS), 350 nM proline, 1 mM sodium pyruvate) supplemented with 20 ng/mL TGFβ-3.

Senescence-associated β-galactosidase activity

Induction of MSC senescence was assessed by staining MSCs with a senescence-associated β-galactosidase (SA-β-Gal) Staining Kit (Sigma-Aldrich; CS0030) according to the manufacturer's instructions. In detail, $12x10^3$ MSCs were plated on coverslips and after 24h, they were fixed with the Kit fixation solution at RT for 8min, and then they were incubated with the SA-β-Gal staining solution overnight to reveal SA-β-Gal activity. Cells displaying blue signal in the cytosol were counted as positive, using the ImageJ software. Ten images of random fields for each sample were taken by microscopy, and at least 100 cells were counted for each sample.

Inflammation protein profile analysis and western blotting

The secretome of senescent and proliferating MSCs was analyzed with the Protome Profiler Human XL Cytokine Array Kit (R&D Systems; ARY022B) according to the manufacturer's instructions for the parallel determination of the relative level of 105 human cytokines, chemokines, and acute phase protein. Capture antibodies were spotted in duplicate on nitrocellulose membranes to bind to specific target proteins present in the cell supernatant. Captured proteins were detected with biotinylated antibodies and visualized using chemiluminescence detection reagents. For western blot analysis, proteins were isolated

from cultured MSCs using Lysis buffer 17 (R&D systems; 895943), supplemented with protease inhibitors (Roche; 11 873 580 001), according to the manufacturer's instructions. Protein concentration was estimated using the BCA Protein assay (Fisher Scientific; 10678484) and 50µg of total proteins was loaded per well after denaturation in Laemmli blue with beta-mercaptoethanol (at 95°C, for 7min). Samples were resolved through Mini-PROTEAN® TGX™ 4-15% gradient gels (Bio-Rad: 456-1084) in Tris-glycerin buffer, and then were transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad Transblot® Turbo™: 170-4157) using the Bio-Rad Trandblot® Turbo™ system (1.3A – 25V – 7 min). After transfer, membranes were washed in Tris-buffered saline (TBS), blocked in 5% non-fat dry milk in TBS-0.1% Tween 20 (TBST) at RT for 1 hour, followed by incubation with primary antibodies at 4°C overnight, except for the anti-β-actin antibody (RT for 3h). The following primary antibodies were used: rabbit IgG anti-human p16 (1:750 in 5% NFDM-TBST, Proteintech; 10883-1-AP), rabbit IgG anti-human p21 (1:1000 in 3% BSA-TBST, Abcam; 109199), mouse IgG anti-human p27 (1:200 in 5% NFDM-TBST, Abcam; 109199), rabbit anti human β-actin (1:1000 in 5% BSA-TBST, Abcam; ab8226). After incubation, membranes were washed in TBST and incubated with goat anti-rabbit IgG (1:2000 in 5% BSA-TBST; Cell Signaling, 7074) or goat anti-mouse IgG (1:2000 in 5% BSA-TBST, Cell Signaling; 7076) horseradish peroxidase (HRP)-conjugated at RT for 2h. Reactions were visualized using the Immobilon ECL HRP Substrate (Millipore; WBLS0500).

STATISTICAL ANALYSIS

All data are presented as the median or mean ±SEM or SD. The Student's *t*-test was used for comparisons between experimental groups, and ANOVA for multiple comparisons. Data were analyzed using the Prism software v6 (GraphPad Software Inc.); p-values <0.05 were

considered significant (*p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001; ****p <0.0001).

ACKNOWLEDGEMENTS

Great thanks Drs N. Sharlpess and D. Darr for the transgenic Cdkn2a$^{+/luc}$ mouse model. Many thanks to Drs Cedric Dray and Jean-Marc Lemaitre for sharing the importation and expansion fees for this mouse model. We thank the RAM Animal facility, the Histology facility RHEM, and the ECELLFRANCE non-clinical platform in Montpellier. We thank Bertrand Coquet's technical support for cartilage analysis. This work was supported by a research grant from the national transversal Project INSERM «AgeMed» and from FOREUM Foundation for Research in Rheumatology (project SEN-OA) and OM is a post-doctoral clinical master specialist supported by F.R.S. - F.N.R.S (Belgium). YT was PhD student supported by Montpellier Hospital. Declaration of interest: none.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

OM: experimental designs, data collection, data analysis, manuscript writing and corrections

YT: experimental designs, data collection, data analysis, manuscript writing and corrections

MC: experimental designs, data collection, data analysis, manuscript writing

MM: experimental designs, data collection, data analysis, manuscript corrections

RF: human cell collection, patient consent, manuscript corrections

SN: human cell collection, characterization and validation, manuscript corrections

CK: human cell collection, characterization and validation, manuscript corrections

DN: experimental designs for bone analysis, manuscript corrections

JI: experimental designs, data collection, manuscript corrections

CJ: experimental designs, manuscript corrections, financial supports

JMB: experimental designs, data collection, data analysis, manuscript writing, corrections, financial supports.

FIGURE LEGEND

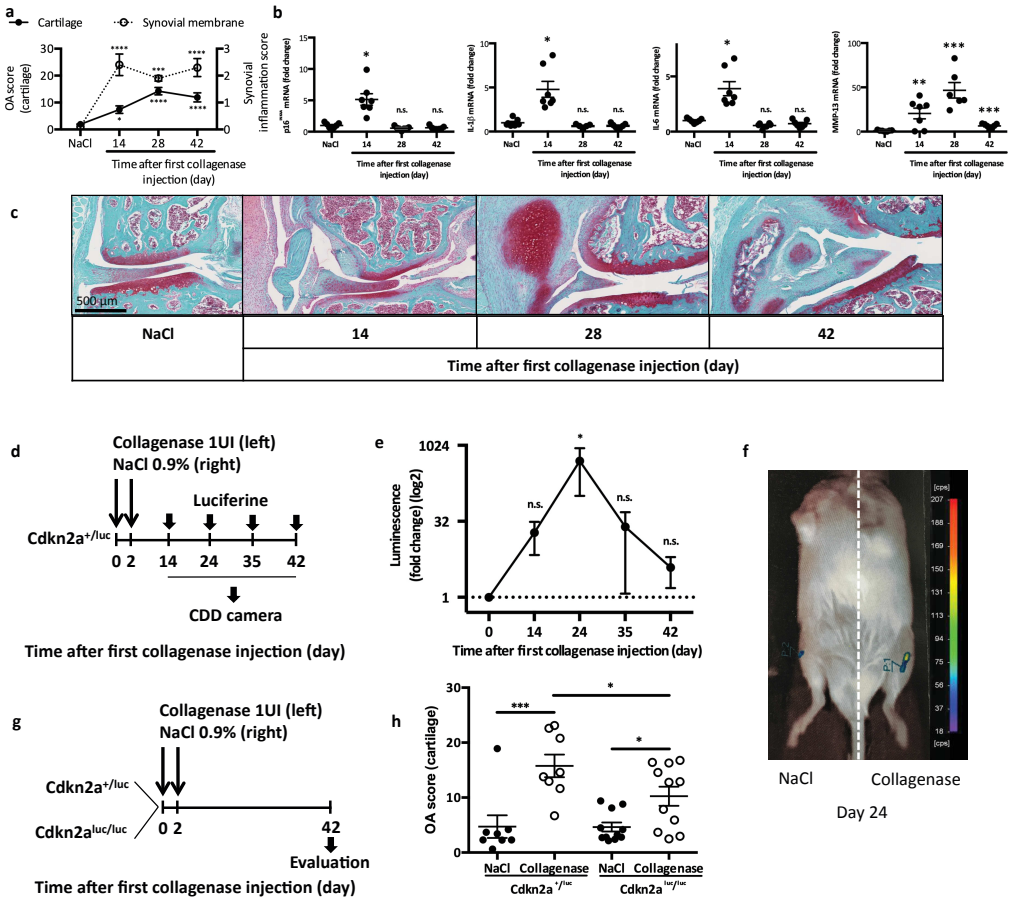


Figure 1. p16^{INK4a} is involved in experimental collagen-induced osteoarthritis.

(a) Osteoarthritis (OA) was induced by collagenase intra-articular injection in the left knee (NaCl injection in the right knee for control) of 2-month-old C57BL/6JRj male mice. After Safranin-O/Fast Green staining, cartilage degradation (OA score according to van den Berg; from 0 to 30) and synovial inflammation (synovitis semi-quantitative score according to van den Berg; from 0 to 3) were analyzed at day 14, 28 and 42 post-injection and compared with control at day 42. Results were compared with control at day 42 for statistical analysis. Data are the mean ± SEM (n=8), * = p<0.05, ***=p<0.001, ****=p<0.001. (b) p16^{INK4a}, IL-1β, IL-6 and MMP-13 mRNA expression levels in the synovial membrane after NaCl or collagenase injection, measured by RT-qPCR. Results were expressed as fold change compared with

control at day 42. Graphs represent the mean ± SEM (n=8); * = p<0.05. (c) Representative images of cartilage degradation and synovial inflammation after OA induction. (d) Experimental design of $p16^{INK4A}$ expression analysis in *Cdkn2a*$^{+/luc}$ after OA induction. (e) Luminescence analysis in both knees with a CDD camera after intra-peritoneal and intra-articular Cyc-Luc injection. Values for the left knee (collagenase injection) were expressed as fold change relative to the right knee (control). Data are the mean ± SEM (day 14, n=13; day 24, n=6; day 35, n=6; day 42 n=8); *=p<0.05. (f) Representative image of luciferase signal in the left (CIOA) and right (NaCl) knee at day 24. (g) Experimental design of OA induction in *Cdkn2a*$^{+/luc}$ and *Cdkn2a*$^{luc/luc}$ mice. (h) Cartilage degradation score (according to the modified van den Berg, from 0 to 30, after Safranin-O/Fast Green staining) at day 42 after NaCl (control) or collagenase (CIOA) injection in 2-month-old *Cdkn2a*$^{+/luc}$ and *Cdkn2a*$^{luc/luc}$ mice. Data the mean ± SEM (n=7, 8, 11 and 11 respectively); *=p<0.05, ***=p<0.001.

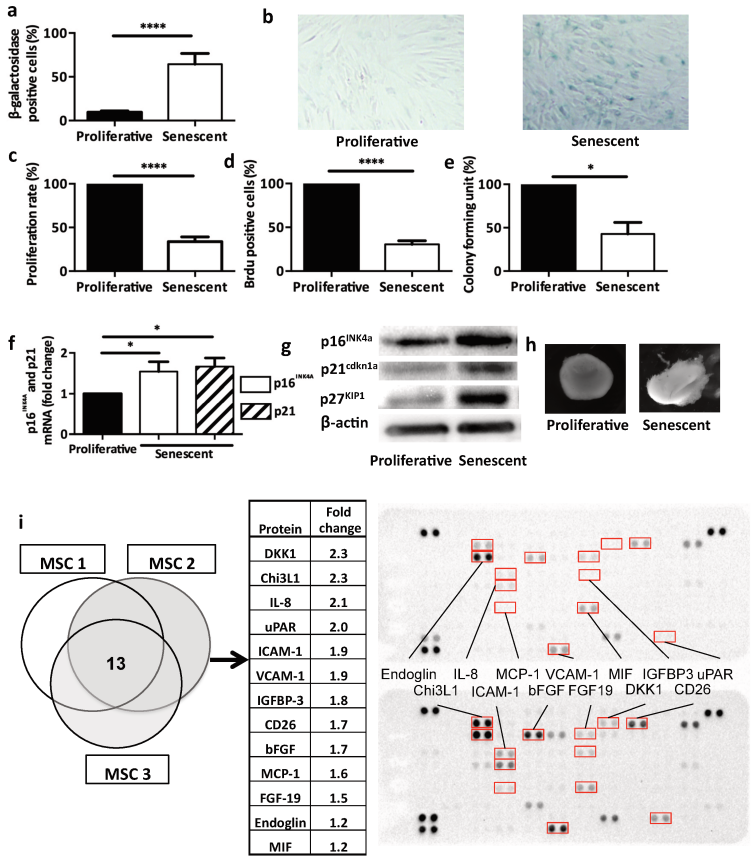


Figure 2. Senescence modulates MSCs intrinsic properties. (a) Beta-galactosidase staining in human MSCs at day 14 after DNA damaged-induced senescence (Senescent) or not (Proliferative). Data are the mean ± SEM (n=5); ****=p<0.0001. (b) Representative images of beta-galactosidase staining in proliferative and senescent human MSCs. (c) Proliferation rate (mean ± SEM) in proliferative and senescent human MSCs (n=6); ****=p<0.0001. (d) BrdU incorporation in proliferative and senescent human MSCs. BrdU-positive cells relative to all DAPI-positive cells were counted using an optical microscope (mean ± SEM; n=5). ****=p<0.0001. (e) Colony forming units in proliferative and senescent human MSCs (mean ± SEM; n=3); *=p<0.05. (f) $p16^{INK4a}$ and $p21^{cdkn1a}$ mRNA expression in human MSCs at day 14 after DNA damaged-induced senescence (Senescent) or not (Proliferative) by RT-qPCR. Data are the fold change relative to proliferative cells (mean ± SEM; n=4 for each condition); *=p<0.05. (g) $p16^{INK4a}$, $p21^{cdkn1a}$ and $p27^{KIP1}$ protein expression in human MSCs at day 14

after DNA damaged-induced senescence (Senescent) or not (Proliferative) by western blotting. Representative images of MSCs from n=3 independent donors. (h) Representative images of one cartilage pellet after chondrogenesis induction in proliferating and senescent human MSCs (from n=3). (i) Protein expression profiles of total cell extracts from senescent (bottom) and proliferating (top) human MSCs from three different healthy donors. The table showed the 13 proteins that were overexpressed in all three MSC samples.

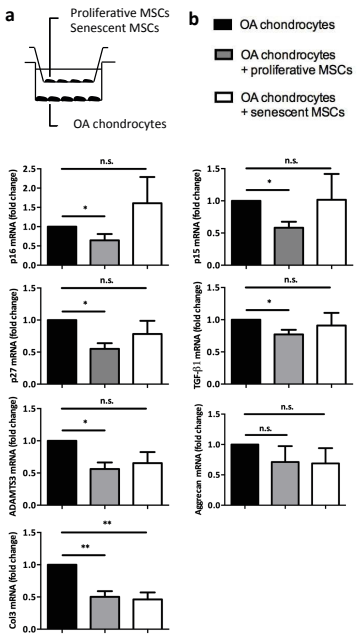


Figure 3. Senescence modulates MSCs extrinsic properties *in vitro*. (a) Experimental design of the without-contact co-culture system to assess the effect of senescent human MSCs on chondrocytes from patients with OA. (b) Expression analysis by RT-qPCR in OA chondrocytes without co-culture (black columns; control), or co-cultured with proliferating MSCs (grey columns), or with senescent MSCs (white columns) for 7 days. Data are expressed as fold change relative to control (mean ± SEM of n=5); *=$p<0.05$.

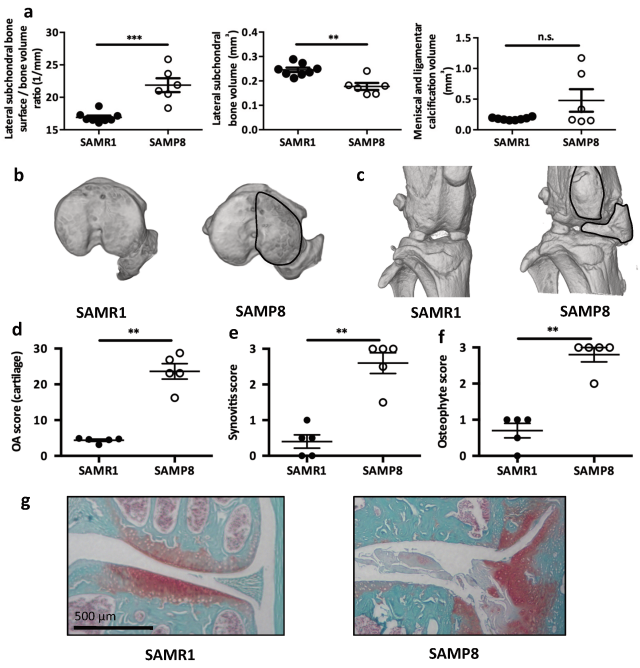


Figure 4. SAMP8 mice display a spontaneous OA phenotype. (a) Histo-morphometric analysis by micro-CT of the left knee in SAMR1 and SAMP8 mice. Graphs represent the mean ± SEM (n=8 for SAMR1, n=5 for SAMP8); *=p<0.05. (b) Representative micro-CT images showing higher sub-chondral bone modification and (c) ligament calcifications in SAMP8 mice compared with SAMR1 mice. Knees from SAMR1 and SAMP8 mice were stained with Safranin-O/Fast Green to quantify: (d) spontaneous cartilage degradation (OA score according to van den Berg, from 0 to 30), (e) spontaneous synovial membrane inflammation (synovitis semi-quantitative score according to van den Berg, from 0 to 3), and (f) osteophytes (osteophyte semi-quantitative score according to van den Berg, from 0 to 3). Data are the mean ± SEM (n=5 for each condition). **=p<0.01. (g) Representative images of the spontaneous OA phenotype in SAMP8 mice with cartilage degradation compared with SAMR1 mice.

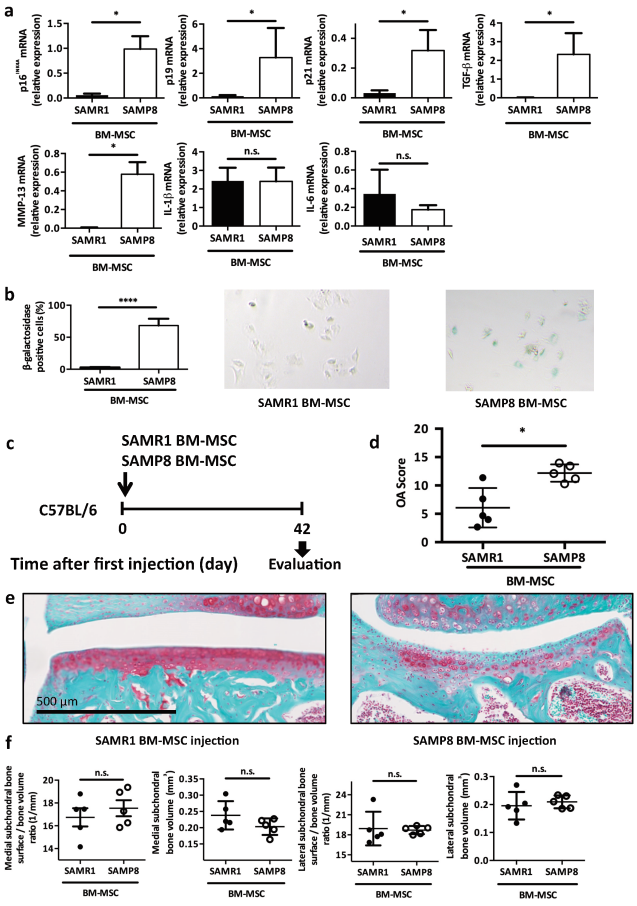


Figure 5. Intra-articular injection of senescent MSCs induces OA-like cartilage degradation.

(a) $p16^{INK4A}$, $p19^{ARF}$, $p21^{cdkn1a}$, TGF-β, MMP-13, IL-1β and IL-6 mRNA expression in MSCs derived from bone marrow (BM) of 6-month-old SAMP8 or SAMR1 mice by RT-qPCR. Data are the mean ± SEM (n=3 for each conditions); *=p<0.05. (b) Beta-galactosidase staining in MSCs derived from BM of SAMP8 or SAMR1 mice. Data are the mean ± SEM (n=5); ****=p<0.0001. (c) Experimental design of BM-MSC injection in the knee of 2-month-old C57BL/6JRj mice. (d) Cartilage degradation (OA score according to van den Berg, from 0 to 30, after Safranin-O/Fast Green staining) at day 42 after SAMP8 or SAMR1 BM-MSC intra-articular injection. Data are the mean ± SEM (n = 5 for both conditions); *=p<0.05. (e) Representative images of cartilage degradation in a C57BL/6JRj mouse after SAMP8 or SAMR-1 BM-MSC injection. (f) Histo-morphometric analyses by micro-CT of the left knee

(medial and lateral compartment) at day 42 after injection of SAMR1 or SAMP8 BM-MSCs. Data are the mean ± SEM (n = 5 for each condition).

BIBIOGRAPHY

1. Oh J, Lee YD, Wagers AJ. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nature medicine.* 2014;20(8):870-880.
2. He S, Sharpless NE. Senescence in Health and Disease. *Cell.* 2017;169(6):1000-1011.
3. Sousa-Victor P, Gutarra S, Garcia-Prat L, et al. Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature.* 2014;506(7488):316-321.
4. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis research & therapy.* 2009;11(3):224.
5. D'Agostino MA, Conaghan P, Le Bars M, et al. EULAR report on the use of ultrasonography in painful knee osteoarthritis. Part 1: prevalence of inflammation in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(12):1703-1709.
6. Chan CKF, Gulati GS, Sinha R, et al. Identification of the Human Skeletal Stem Cell. *Cell.* 2018;175(1):43-56 e21.
7. Gulati GS, Murphy MP, Marecic O, et al. Isolation and functional assessment of mouse skeletal stem cell lineage. *Nature protocols.* 2018;13(6):1294-1309.
8. Maumus M, Manferdini C, Toupet K, et al. Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis. *Stem cell research.* 2013;11(2):834-844.
9. Rodriguez AM, Nakhle J, Griessinger E, Vignais ML. Intercellular mitochondria trafficking highlighting the dual role of mesenchymal stem cells as both sensors and rescuers of tissue injury. *Cell cycle.* 2018;17(6):712-721.
10. Martin JA, Buckwalter JA. Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences.* 2001;56(4):B172-179.
11. Philipot D, Guerit D, Platano D, et al. p16(INK4a) and its regulator miR-24 link senescence and chondrocyte terminal differentiation-associated matrix remodeling in osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy.* 2014;16(1).
12. Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, et al. C/EBPbeta Promotes transition from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through transactivation of p57. *PLoS One.* 2009;4(2):e4543.
13. Jeon OH, Kim C, Laberge RM, et al. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nature medicine.* 2017;23(6):775-781.
14. ter Huurne M, Schelbergen R, Blattes R, et al. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64(11):3604-3613.
15. Chuchana P, Mausset-Bonnefont AL, Mathieu M, et al. Secreted alpha-Klotho maintains cartilage tissue homeostasis by repressing NOS2 and ZIP8-MMP13 catabolic axis. *Aging.* 2018;10(6):1442-1453.
16. Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(1):13-29.
17. Burd CE, Sorrentino JA, Clark KS, et al. Monitoring tumorigenesis and senescence in vivo with a p16(INK4a)-luciferase model. *Cell.* 2013;152(1-2):340-351.
18. Diekman BO, Sessions GA, Collins JA, et al. Expression of p16(INK)(4a) is a biomarker of chondrocyte aging but does not cause osteoarthritis. *Aging cell.* 2018:e12771.

19. Zhen G, Wen C, Jia X, et al. Inhibition of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis. *Nature medicine.* 2013;19(6):704-712.
20. Kurth TB, Dell'accio F, Crouch V, Augello A, Sharpe PT, De Bari C. Functional mesenchymal stem cell niches in adult mouse knee joint synovium in vivo. *Arthritis and rheumatism.* 2011;63(5):1289-1300.
21. Klimczak A, Kozlowska U. Mesenchymal Stromal Cells and Tissue-Specific Progenitor Cells: Their Role in Tissue Homeostasis. *Stem cells international.* 2016;2016:4285215.
22. McGonagle D, Baboolal TG, Jones E. Native joint-resident mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology.* 2017;13(12):719-730.
23. Diarra D, Stolina M, Polzer K, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med.* 2007;13(2):156-163.
24. Guan J, Liu Z, Li F, et al. Increased Synovial Fluid YKL-40 Levels are Linked with Symptomatic Severity in Knee Osteoarthritis Patients. *Clin Lab.* 2015;61(8):991-997.
25. Evans DS, Cailotto F, Parimi N, et al. Genome-wide association and functional studies identify a role for IGFBP3 in hip osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(10):1861-1867.
26. Acosta JC, O'Loghlen A, Banito A, Raguz S, Gil J. Control of senescence by CXCR2 and its ligands. *Cell Cycle.* 2008;7(19):2956-2959.
27. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol.* 2013;15(8):978-990.
28. Rui Y, Yang S, Chen LH, Qin LQ, Wan Z. Chia Seed Supplementation Reduces Senescence Markers in Epididymal Adipose Tissue of High-Fat Diet-Fed SAMP8 Mice. *Journal of medicinal food.* 2018;21(8):755-760.
29. Feng L, Cao L, Zhang Y, Wang F. Detecting Abeta deposition and RPE cell senescence in the retinas of SAMP8 mice. *Discovery medicine.* 2016;21(115):149-158.
30. Jimenez-Altayo F, Onetti Y, Heras M, Dantas AP, Vila E. Western-style diet modulates contractile responses to phenylephrine differently in mesenteric arteries from senescence-accelerated prone (SAMP8) and resistant (SAMR1) mice. *Age.* 2013;35(4):1219-1234.
31. Srivastava J, Siddiq A, Gredler R, et al. Astrocyte elevated gene-1 and c-Myc cooperate to promote hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology.* 2015;61(3):915-929.
32. Benkafadar N, François F, Affortit C, et al. ROS-Induced Activation of DNA Damage Responses Drives Senescence-Like State in Postmitotic Cochlear Cells: Implication for Hearing Preservation. *Mol Neurobiol.* 2019.
33. Luz-Crawford P, Ipseiz N, Espinosa-Carrasco G, et al. PPARβ/δ directs the therapeutic potential of mesenchymal stem cells in arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(12):2166-2174.
34. Seidl CI, Fulga TA, Murphy CL. CRISPR-Cas9 targeting of MMP13 in human chondrocytes leads to significantly reduced levels of the metalloproteinase and enhanced type II collagen accumulation. *Osteoarthritis Cartilage.* 2019;27(1):140-147.
35. Zhen G, Wen C, Jia X, et al. Inhibition of TGF-β signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis. *Nat Med.* 2013;19(6):704-712.

36. Tachikart Y, Malaise O, Mumme M, Jorgensen C, Brondello JM. Seno-suppressive molecules as new therapeutic perspectives in rheumatic diseases. *Biochemical pharmacology.* 2019.
37. Childs BG, Gluscevic M, Baker DJ, et al. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nature reviews Drug discovery.* 2017;16(10):718-735.
38. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell.* 2014;31(6):722-733.
39. Vicente R, Mausset-Bonnefont AL, Jorgensen C, Louis-Plence P, Brondello JM. Cellular senescence impact on immune cell fate and function. *Aging Cell.* 2016;15(3):400-406.
40. Bijlsma JW, Berenbaum F, Lafeber FP. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet.* 2011;377(9783):2115-2126.
41. van Lent PL, Blom AB, Schelbergen RF, et al. Active involvement of alarmins S100A8 and S100A9 in the regulation of synovial activation and joint destruction during mouse and human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64(5):1466-1476.
42. Kang D, Shin J, Cho Y, et al. Stress-activated miR-204 governs senescent phenotypes of chondrocytes to promote osteoarthritis development. *Sci Transl Med.* 2019;11(486).
43. Coppe JP, Rodier F, Patil CK, Freund A, Desprez PY, Campisi J. Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *The Journal of biological chemistry.* 2011;286(42):36396-36403.
44. Prieur A, Besnard E, Babled A, Lemaitre JM. p53 and p16(INK4A) independent induction of senescence by chromatin-dependent alteration of S-phase progression. *Nature communications.* 2011;2:473.
45. Sepulveda JC, Tome M, Fernandez ME, et al. Cell senescence abrogates the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in the lethal endotoxemia model. *Stem cells.* 2014;32(7):1865-1877.
46. Huang Y, Liu L, Liu A. Dickkopf-1: Current knowledge and related diseases. *Life Sci.* 2018;209:249-254.
47. Bitto A, Sell C, Crowe E, et al. Stress-induced senescence in human and rodent astrocytes. *Exp Cell Res.* 2010;316(17):2961-2968.
48. Farr JN, Xu M, Weivoda MM, et al. Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice. *Nat Med.* 2017;23(9):1072-1079.
49. Min S, Wang C, Lu W, et al. Serum levels of the bone turnover markers dickkopf-1, osteoprotegerin, and TNF-alpha in knee osteoarthritis patients. *Clinical rheumatology.* 2017;36(10):2351-2358.
50. Theologis T, Efstathopoulos N, Nikolaou V, et al. Association between serum and synovial fluid Dickkopf-1 levels with radiographic severity in primary knee osteoarthritis patients. *Clinical rheumatology.* 2017;36(8):1865-1872.
51. Weng LH, Ko JY, Wang CJ, Sun YC, Wang FS. Dkk-1 promotes angiogenic responses and cartilage matrix proteinase secretion in synovial fibroblasts from osteoarthritic joints. *Arthritis and rheumatism.* 2012;64(10):3267-3277.
52. Weng LH, Wang CJ, Ko JY, Sun YC, Su YS, Wang FS. Inflammation induction of Dickkopf-1 mediates chondrocyte apoptosis in osteoarthritic joint. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society.* 2009;17(7):933-943.
53. Gnani D, Crippa S, Della Volpe L, et al. An early-senescence state in aged mesenchymal stromal cells contributes to hematopoietic stem and progenitor cell

clonogenic impairment through the activation of a pro-inflammatory program. *Aging Cell.* 2019:e12933.
54. Ueda Y, Inaba M, Takada K, et al. Induction of senile osteoporosis in normal mice by intra-bone marrow-bone marrow transplantation from osteoporosis-prone mice. *Stem Cells.* 2007;25(6):1356-1363.
55. Fu L, Hu Y, Song M, et al. Up-regulation of FOXD1 by YAP alleviates senescence and osteoarthritis. *PLoS Biol.* 2019;17(4):e3000201.
56. Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med.* 2018;24(8):1246-1256.
57. Mattiucci D, Maurizi G, Leoni P, Poloni A. Aging- and Senescence-associated Changes of Mesenchymal Stromal Cells in Myelodysplastic Syndromes. *Cell transplantation.* 2018;27(5):754-764.
58. Zhao Y, Jia Z, Huang S, et al. Age-Related Changes in Nucleus Pulposus Mesenchymal Stem Cells: An In Vitro Study in Rats. *Stem cells international.* 2017;2017:6761572.
59. Zhang J, Lian Q, Zhu G, et al. A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. *Cell Stem Cell.* 2011;8(1):31-45.
60. Djouad F, Delorme B, Maurice M, et al. Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(2):R33.

Supplementary Table 1

Gene (human)	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'
$p16^{INK4a}$	GAAGGTCCCTCAGACATCCCC	CCCTGTAGGACCTTCGGTGAC
$p21^{cdkn1a}$	TGTCCGTCAGAACCCATGC	AAAGTCGAAGTTCCATCGCTC
$p15^{INK4b}$	GACCGGGAATAACCTTCCAT	CACCAGGTCCAGTCAAGGAT
$p27^{KIP1}$	CGGCTAACTCTGAGGACACG	CTTCTGAGGCCAGGCTTCTT
TGF-β1	CTAATGGTGGAAACCCACAACG	TATCGCCAGGAATTGTTGCTG
ADAMTS3	GAACATCGACCAACTCTACTCCG	CAATGCCCACCGAACCATCT
Aggrecan	TCGAGGACAGCGAGGCC	TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA
Col3	AGGGCCTGA AGGACCAGCTT	CGCCCTCCTAATGGTCAAGG
28S	CGATCCATCATCCGCAATG	AGCCAAGCTCAGCGCAAC
Gene (mouse)	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'
$p16^{INK4a}$	CGCAGGTTCTTCGTCACTGT	TGTTCACGAAAGCCAGAGCG
$p19^{ARF}$	GCTCTGGCTTTCGTGAACATG	TCGAATCTGCACCGTAGTTGAG
$p21^{cdkn1a}$	GTACTTCCTCTGCCCTGCTG	TCTGCGCTTGGAGTGATAGA
IL-1β	GTATGGGCTGGACTGTTTC	GCTGTCTGCTCATTCACG
IL-6	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
MMP-13	GGAGCCCTGATGTTTCCCAT	GTCTTCATCGCCTGGACCATA
GAPDH	GGCAAATTCAACGGCACAGT	GTCTCGCTCCTGGAAGATGG

Table S1: primer List

7. Article 2

Comme développé précédemment, l'articulation est sujette à de nombreux stress ce qui se traduit par la mise en place de nombreux mécanismes de régulation et une adaptation des trois compartiments : cartilage, membrane synoviale et os sous-chondral. Nous avons montré que l'altération des propriétés des cellules souches/stromales mésenchymateuses due à la sénescence pouvait être un élément menant au développement de la pathologie. Le remodelage osseux est l'un des autres paramètres important de cette régulation. En effet, celui ci permet une adaptation aux contraintes mécaniques et la conservation de la fonction de soutien de l'os sous chondral. Une hypothèse est que, lorsque cette adaptation du tissue n'est plus possible et que l'équilibre est donc rompu, il y a développement de la pathologie arthrosique.

Chi3L1 a été décrit comme associé à l'arthrose et corrélé à la gravité de la pathologie. Ce lien pourrait trouver une explication dans son rôle dans le remodelage osseux. Ainsi, Di Rosa et al. ont montré que cette chitinase était un facteur important de la différenciation des monocytes en ostéoclastes (Di Rosa et al., 2014b), tandis que Sanchez et al. ont montré une surexpression du gène CHI3L1 au niveau de l'os sous chondral sclérotique, suggérant un mécanisme de compensation de la sclérose et des ostéophytes caractéristiques de l'arthrose (Sanchez et al., 2018). Pour autant, quand bien même ces études suggèreraient un rôle positif de Chi3L1 dans l'environnement articulaire, cette protéine reste associée à des évènements négatifs pour l'articulation, tel la néo-angiogenèse, la stimulation de la prolifération des synoviocytes (reliée à l'hyperplasie de la membrane synoviale) et un effet pro-fibrotique (Shao et al., 2009)(De Ceuninck et al., 2001)(Johansen et al., 1997).

Nos récents travaux nous ont amené à étudier les facteurs du SASP des cellules souches/stromales sénescentes pour expliquer ce lien entre ces résidents de l'articulation et

la pathologie arthrosique. C'est de cette manière que nous avons mis en évidence Chi3L1 comme faisant partie des différents facteurs de ce SASP. Nous avons donc posé l'hypothèse que cette chitinase-like pourrait constituer un élément d'une tentative de ré-établissement de l'homéostasie articulaire, mais se traduisant à terme, de par ses effets négatifs potentiels sur le compartiment synoviale principalement, par le développement de la pathologie. L'objectif du travail présenté ci-après a donc été d'explorer ce lien potentiel entre Chi3L1 d'un côté, et sénescence et arthrose de l'autre. Nous avons donc étudié l'implication de Chi3L1 dans des modèles d'études de l'arthrose *in vivo*, puis *in vitro*. L'article présenté sera complété avec les dernières données d'expériences en cours et soumis prochainement.

Chi3L1 contributes to joint dysfunction by altering mesenchymal stem cell regenerative functions.

Yassin Tachikart[1], Olivier Malaise[1,2], Audrey Sansaloni[1], Marion Loivet[1], Romain Ragimbeau[1], Michael Constantinides[1], Philippe Pastoureau P[6], Fréderic de Ceuninck[6], Sandra Noack[5], Christian Krettek[5], Paul Chuchana[1], Marie-Luce Vignais [1], Christian Jorgensen[1,7] and Jean-Marc Brondello[1#]

[1]IRMB, Univ Montpellier, INSERM, Montpellier, France.

[2]GIGA Research, CHU of Liège & University of Liège, Liège, Belgium.

[3]Hôpital Lapeyronie, Clinical immunology and osteoarticular diseases Therapeutic Unit, Montpellier, France.

[4]Servier Research Institute, Suresne, France

[5]Trauma Department, Hannover Medical School, Hannover, Germany

Running title: Chi3L1 as novel articular seno-converting factor

Key words: senescence, tissue homeostasis, mesenchymal stem cells, osteoarthritis

Corresponding author:

Dr Jean-Marc Brondello Ph.D HDR

IRMB U1183

CHU St Eloi,

80 Avenue A. Fliche

34280 Montpellier cedex 05

Tel: +33(0)4-67-33-57-19

Email: jean-marc.brondello@inserm.fr

ABSTRACT

Accumulation of senescent articular chondrocytes duringosteoarthris (OA) development contributes to cartilage tissue loss of functions through the establishment of one senescence-associated secretory phenotype (SASP). Identifying which articular senescence-associated factor could affect tissue stem cell-dependent repair mechanisms and contributes to senescence spreading and disease progression, is the next issue to solve in order to be able to bring efficient treatments to patients. Using *in vivo* experimental OA-driven murine model, we identified here Chitinase 3-like 1 (Chi3L1) as expressed in synovial tissue and degenerative cartilage. Chi3L1 expression level correlates with synovial senescence markers, $p21^{cdkn1a}$, $p57^{kip2}$, MMP13 and TGFβ1 but also with cartilage degradation. Remarkably, intra-articular delivery of recombinant Chi3L1 potentialized OA-inducing joint remodeling as revealed by morphometric analysis of sub-chondral bone after collagenase injection.

Next to reveal the potential seno-promoting role for articular Ch3L1 factor, we *in vitro* studied the effects of recombinant Chi3L1 on human osteo-chondral progenitors namely mesenchymal stem cells (MSCs). Chi3L1 reduces MSC self-renewal capacities and triggers an increase in senescence markers expression including $p16^{INK4A}$, $p27^{KIP1}$, $p21^{WAF1}$ and SA-βGal staining in dose-dependent manner. As expected with senescence features, stem cells treated by Chi3L1 are resistant to apoptotic induction meanwhile Chi3L1 favors their *in vitro* differentiation toward adipogenic lineage. Finally, co-culture experiments in trans-well setting between primary OA chondrocytes and Chi3L1 pretreated MSC revealed than Chi3L1-induced senescent MSCs loss their seno-suppressive functions, and are able to spread senescence phenotype as shown by increased expressions in chondrocytes of hypertrophic-associated OA markers including VEGF, p21 and p57.

Altogether, we proposed here Chi3L1 as a new articular seno-converting factor that contributes to reduce joint resident stem cells self-renewal, favors adipogenesis and alters MSC regenerative extrinsic chondro-protective properties contributing to the progressive articular tissue loss of functions in aging and OA development.

1. INTRODUCTION

Knee osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease, affecting 33% of adults over 65 years of age in North America and Europe (Martel-Pelletier et al., 2016). This disorder disturb joint homeostasis which results in cartilage degradation, osteophytes formation, sub-chondral sclerosis and synovial hypertrophy and fibrosis. More and more evidences indicates a role of senescence in OA symptoms and onset, giving rise to hope of treatments known as "senotherapies" for patients (Jeon et al., 2018)(Tachikart et al., 2019).

Senescence is a complex cellular syndroma characterized by a robust cell cycle arrest, resistance to apoptosis and a particular secretome called SASP (standing for "*senescence-associated secretory phenotype*") (Childs et al., 2017a). This process is implicated in fight against tumorigenesis and tissue repair (Xue et al., 2007)(Demaria et al., 2014). But as we age, these senescent cells accumulate in every post-mitotic tissues leading to age-related pathologies mainly through their SASP (He and Sharpless, 2017). OA seems not to be an exception since clearance of senescent articular cells has been shown to alleviate disease severity and promote a pro-regenerative articular environment in mice models (Jeon et al., 2017).

Nevertheless, causes of senescent cells accumulation in joint remain unclear. We recently showed that senescent mesenchymal stem/stromal cells (MSC) are able to drive OA (Malaise et al., 2019). These non hematopoietic progenitors are present in every articular compartments and are a key player of joint homeostasis. They regulate inflammation, act as chondrocytes trophic support and promote tissue repair, thus allowing joint adaptability to stress (Li and Hua, 2017)(Pleumeekers et al., 2018). Our previous findings highlighted that senescence impaired MSC properties which contribute to cartilage loss of function and OA

onset. These senescent MSCs secrete several factors that could explain this effect and among them, we took interest in Chi3L1/YKL40.

Chi3L1 is a secreted glycoprotein from the chitinase like protein family, with no enzymatic activity, known to be increased with age and many diseases contexts (Bojesen et al., 2011)(Yeo et al., 2019). This chitinase-like is commonly associated with inflammation and tissue remodeling. Therefore, it is not surprising that many studies showed higher Chi3L1 level in synovial fluid and plasma of patients suffering rheumatologic affections such as OA (Johansen et al., 1993)(Väänänen et al., 2014a). Thus, Chi3L1 has been proposed as a potential marker for cartilage injury and osteoarthritis. However, its precise role in articular joint and OA onset remain to be investigated.

The fact that Chi3L1 favors fibrosis, angiogenesis and inflammation (Johansen et al., 1997)(Shao et al., 2009)(Lee et al., 2011), several deleterious process in joint, encouraged us to explore further its implication in senescence and OA pathogeny. Toward that end, we studied Chi3L1 impact on *in vitro* and *in vivo* OA model.

2. RESULTS

2.1. Chi3L1 levels in synovial tissue correlate with cartilage degradation and OA markers in Collagenase induced OsteoArthritis model

First, we wanted to confirm previous reports associating Chi3L1 expression in articulation with OA onset in Collagenase induced OsteoArthritis (CiOA) model (ter Huurne et al., 2012). This model is characterized by inflammation and synovitis as observed in 1/3 of patients (D'Agostino et al., 2005). The fact that Chi3L1 favors fibrosis, angiogenesis and inflammation (Johansen et al., 1997)(Shao et al., 2009)(Lee et al., 2011) led us to hypothesize that this protein could be involved in synovial tissue hypertrophy, inflammation and fibrosis. In this context, we performed collagenase VII intra-articular injection at day 0 and day 2 in left knee of 2-months old C57BL/6JRj male mice. Then, we monitored Chi3L1 expression in synovial membrane in a time-course experiment by performing RT-qPCR on harvested synovial tissue (figure 1a). Synovial samples analysis showed a significant increase of approximately 9,4-fold of Chi3L1 mARN level at day 28 post collagenase injection compared to control leg. We also looked at several senescence and SASP markers expression levels commonly associated with OA in synovial tissue (supplementary figure 1a). To determine if there could be a link between Chi3L1 and these OA markers, we performed linear regression to estimate their degrees of relation (figure 1c and 1d). Interestingly, cartilage degradation evaluated by OARSI score (Pritzker et al., 2006) and senescence markers showed a positive correlation to Chi3L1 synovial tissue expression : OARSI score (R^2 = 0,47 ; $p < 0,0001$), cyclin kinase inhibitors (p21 ; R^2 = 0,57 ; $p < 0,0001$; p57 ; R^2 = 0,35 ; $p < 0,0001$), Transforming growth factor β (TGFβ ; R^2 = 0,5 ; $p < 0,0001$), metalloprotease 13 (MMP13 ; R^2 = 0,5 ; $p < 0,0001$). These positive correlations suggest that Chi3L1 may be involved senescent cells accumulation and cartilage degradation during OA onset.

2.2. Chi3L1 chronic intra-articular administration aggravate CiOA phenotype

We next hypothesized that Chi3L1 might have a causal role in OA onset. To test this hypothesis, we performed bi-weekly Chi3L1 intra-articular injection in left knee versus saline solution in right knee of 2-months old C57BL/6JRj male mice after Sham or CiOA (*figure 2a*). We chose a dose of 1mM because it is the mean concentration observed in synovial fluid of OA patients (Väänänen et al., 2014b). At day 28, micro-CT analysis of histo-morphometric parameters reveal that during OA onset induced by collagenase injection, Chi3L1 aggravates CiOA phenotype as regards subchondral bone remodeling *(figure 2b, c, d)*. Decreased bone volume (0,17 mm^3 +/- 0,06 vs 0,19 mm^3 +/- 0,09 for CiOA + Vehicle condition) and subchondral bone thickness (0,152 mm^3 +/- 0,003 vs 0,169 mm^3 +/- 0,003 for CiOA + Vehicle condition) and increased ratio bone volume / bone surface (20,79 +/- 0,62 vs 19,01 mm^3 +/- 0,26 for CiOA + Vehicle condition) suggest that Chi3L1 injection is associated with a more severe subchondral bone degradation during CiOA. While, Chi3L1 alone seems not to be sufficient to recapitulate OA phenotype in this model. We next wanted to decipher how Chi3L1 could aggravate the condition of the joint.

2.3. Chi3L1 chronic exposure induces MSCs senescence

MSCs from bone marrow of sub-chondral bones and from synovial tissue are the important effectors of cartilage homeostasis maintenance (Zhen et al., 2013)(Kurth et al., 2011). They contribute to this homeostasis via their self-renewal capacities and differentiation properties (Klimczak and Kozlowska, 2016)(McGonagle et al., 2017). Moreover, we previously reported that senescence affecting MSCs functions could be involved in OA development (Malaise et al., 2019). That's why we asked here, if Chi3L1 chronic treatment could affect MSCs functions. We treated MSCs with gradual doses of

Chi3L1 during 14 days and evaluated their intrinsic properties. Our analysis showed that Chi3L1 affect self renewal capacity as we highlighted in a dose-response manner a decrease of proliferation rate up to 60 +/- 10,87 % ($p < 0,05$) and of the number of colonies in CFU assay up to 38 +/- 7,1 % ($p < 0,05$) with the highest Chi3L1 concentration treatment compared to untreated control (figure 3a and b). Senescence Associated-β-galactosidase activity assay showed higher level of this enzyme in Chi3L1-treated MSCs which is characteristic of senescent cells (figure 3c and d). In order to confirm that Chi3L1-treated MSCs became senescent, we evaluated cyclin kinase inhibitors (CKI) expression and resistance to apoptosis. Robust cell-cycle arrest associated with expression of CKI and resistance to apoptosis are, with the specific secretory phenotype called SASP, the main characteristics of senescent cells (Childs et al., 2017b). RT-qPCR for CKI expression showed significant increases of p16 and p21 no matter the dose, two biomarkers frequently associated with senescence (Hernandez-Segura et al., 2018). Finally, we showed that Chi3L1-treated MSCs were resistant to apoptosis induced by Sin 1, a nitric oxide donor (figure 3g). Together, These findings give strong evidences that Chi3L1 treatment induce a senescence phenotype in MSCs.

2.4. Chi3L1 chronic treatment favors adipogenic differenciation

MSCs function is thought to decline from the age of 30 (Baker et al., 2015). Senescence might contribute to this progressive loss of function by affecting their diferenciation properties. Thus, We assessed MSCs differenciation potential in all three lineages : adipogenic, chondrogenic and osteogenic. We demonstrated that adipogenic differenciation was favored by Chi3L1 treatment as showed by red oil coloration (figure 4a) and adipogenic genes (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 (PPARγ2), Fatty

Acid Binding Protein 4 (FABP4) and LipoProtein Lipase (LPL)) expression significant increase ($p < 0,05$) (figure 4b). Surprisingly, Chi3L1-induced senescence did not affect chondrogenic and osteogenic potential (figure 4c, d and e). Both osteogenic genes (SP7, RUNX2, BGLAP and ALPL) and chondrogenic genes (COL2B, SOX9, COL10 and MMP13) expression levels were equivalent despite Chi3L1 treatment (figure 4d and e). These findings are in line with lipodystrophy observed in elderly and the supposed role of MSCs in this phenomenon (Mansilla et al., 2011). Stimulation of adipose tissue accumulation in joint could explain, in part, Chi3L1 implication in OA pathogeny since this chitinase like has been correlated to adipokines levels known to be involved in OA onset and progression, in synovial fluid after mechanical stress induced by running (Vuolteenaho et al., 2014)(Tu et al., 2019). This underline the importance of articular microenvironment which can be affected by senescent cells accumulation.

2.5. Chi3L1-treated MSCs spread senescence to chondrocytes via paracrine effect

Indeed, MSCs relie on their chondroprotective and trophic support properties to maintain articular homeostasis and chondrocytes healthiness. Transwell coculture experiments showed that MSCs are able to reduce hypertrophy, fibrosis and senescent markers in OA chondrocytes via paracrine effect (Maumus et al., 2013)(Platas et al., 2016). We previously reported that DNA-damage induced senescent MSCs lose their "seno-suppressive" function. Thus, we wanted to confirm this observation on Chi3L1-induced senescent MSCs. We performed transwell coculture experiments for seven days with either OA chondrocytes alone, OA chondrocytes cocultured with proliferative MSCs and OA chondrocytes cocultured with Chi3L1-induced senescent MSCs (figure 5a). As reported in several studies, untreated proliferative MSCs significantly reduced in OA chondrocytes, the

expression of Col3, ADAMTS3 and p16, several markers associated with senescence and SASP and fibrosis. Surprisingly, aggrecan and col2b genes were also significantly decreased with untreated proliferative MSCs as well as with Chi3L1-treated MSCs which was expected. Moreover, we did not show reduction of p21 and p57 expression in OA chondrocytes with untreated MSCs. However, as shown for DNA-damage induced senescence, Chi3L1-treated MSCs harbor a loss of the seno-suppressive function. Even more remarkable, Chi3L1-treated MSCs even induce an increase in p21 and p57 expression in OA chondrocytes, compared to untreated MSCs (figure 5b). This emphasized an ability to spread senescence to chondrocytes via paracrine effect.

3. DISCUSSION

Joints are constantly under stress, which require steady adaptation of the different articular compartments to maintain homeostasis. With this aim, mesenchymal stromal cells communicate with secreted factors to coordinate tissue maintenance and repair. Senescence is involved in this process, but is also linked to a progressive organ loss of function as senescent cells accumulate in tissues over time, leading to age-related diseases. Thence, senescence-related pathologies can be considered as a state of continuous and ineffective efforts to reestablish organ homeostasis. We previously reported that mesenchymal stromal cells' senescence impaires both intrinsic and extrinsic properties and could trigger OA onset. An explanation for this observation could lie in senescent mesenchymal stem cells secreted factors. In this study, we took interest in Chi3L1, that we recently describe as a mesenchymal stromal cell SASP protein. We found that this chitinase can aggravate OA phenotype potentially through its abilities to trigger mesenchymal stromal cell senescence, which result in impaired trophic support function and differentiation potential.

The progressive increase of Chi3L1 level observed in serum is one of aging-associated changes that could affect organ function and homeostasis (Bojesen et al., 2011). Likewise senescence syndroma, Chi3L1 seems to have a positive impact during first parts of lifespan as *CHI3L1* gene is thought to play a key role in developmental chondrogenesis (Zhou et al., 2019). It also favors monocytes differenciation to osteoclastes and is correlated with MMP9 levels, a metalloprotease implicated in osteoclastes recrutment (Di Rosa et al., 2014). On an other part, osteoblasts from sclerosed parts of subchondral bone overexpress Chi3L1

(Sanchez et al., 2018), suggesting a role in articular homeostasis maintenance as a bone resorption regulator. Thus, Chi3L1 might be part of a tissular response to offset bone neoformation observed in OA context. However, Chi3L1 is also associated with poor outcome in many diseases conditions and with an increased all causes mortality (Johansen et al., 2008). Interestingly, increased level of this chitinase-like was also observed in many senescence-related pathologies: diabetes, neurodegenerative diseases, idiopathic pulmonary fibrosis, cancers and OA (Rathcke and Vestergaard, 2006)(Yeo et al., 2019)(Kwon et al., 2011)(Johansen et al., 1993). In addition, several authors hypothesized that Chi3L1 could be the cause of skeletal complications in these diseases (Zhou et al., 2019)(Mylin et al., 2015). These facts led us to investigate a potential link between Chi3L1 and senescence in OA.

Because of Chi3L1 involvement in fibrosis, inflammation and tissue remodeling (Johansen, 2006), we hypothesized its responsibility in synovial membrane OA-associated changes. In this way, it could trigger OA development, since synovial tissue is a recognized OA driver (Mathiessen and Conaghan, 2017). Using collagenase induced osteoarthritis model, we showed a progressive increase of Chi3L1 expression level in synovial tissue in line with previous reports. Strikingly, its expression was correlated to OA severity, cyclin kinase inhibitors (p21, p57) and SASP markers (TGFb and MMP13). Then, we showed that biweekly intra-articular Chi3L1 administration aggravates cartilage degradation and bone morphometric changes, during OA onset. In this way, our results demonstrate an important role of Chi3L1 in OA development, in accordance with previous studies that associated this chitinase like protein with joint injury and disease severity (Johansen et al., 1993)(Guan et

al., 2015). With these observations, Chi3L1 could be one of the missing pieces of the jigsaw puzzle to link senescence to OA.

In our last study, we showed that senescence impaired mesenchymal stromal cells properties and that this alteration could lead to OA development. This finding led us to investigate Chi3L1 effect on mesenchymal stromal cells. Thus, we demonstrated that chronical Chi3L1 treatment induces in a dose-dependant manner, among several senescence features, a proliferation rate decrease, higher β-galactosidase level and increased cell cycle inhibitors' expressions (p14, p16, P21 and p27). Moreover, Chi3L1-treated mesenchymal stromal cells are more prone to differenciate in adipocytes. This observation recalls elderly physiology in whom we find lipodystrophy and senescent cells accumulation (Diekman et al., 2018). Finally, coculture experiments showed that Chi3L1-treated mesenchymal stromal cells are able to spread senescence features to chondrocytes by paracrine effect, as shown by p21 and p57 gene expression in chondrocytes. Taken together, these results suggest that Chi3L1 could be a secreted factor involved in articular homeostasis loss. In a vicious circle, senescent cells could secrete Chi3L1, which may in turn induce senescent phenotype, leading to OA development.

Since mesenchymal stromal cells are important effectors of articular homeostasis maintenance, our approach focused on them. Indeed, it is considered that the phenotype of articular progenitors in OA correlates with cartilage degradation (Zhou et al., 2019). So as senescence syndroma alters their properties, it is not surprising that senescent MSCs have been implicated in physiopathologies of osteoporosis, intervertebral disc degeneration and OA among others (Zhou et al., 2019)(Zhao et al., 2017). While, mesenchymal stromal cells

are able to reduce chondrocytes senescence markers *in vitro* via paracrine effect (Zhou et al., 2019), senescent ones lose this property. Therefore, disruption of a such tight regulation will affect articular tissue and function and contribute to articular aging and OA development. Increased chitinase like protein levels related to aging could cause this break in balance.

Further explorations are still needed to confirm our study. Others chitinases and chitinase-like roles in senescence-related pathologies also deserved to be investigated as this gene family has been strongly conserved and seems to have similarities of function (Funkhouser and Aronson, 2007)(Sutherland et al., 2014). Furthermore, given our findings that Chi3L1 may be responsible of synovial membrane phenotype and progenitors senescence in OA context, it could be interesting to investigate OA onset in a transgenic mouse IL13Rα2 KO, the Chi3L1 receptor (He et al., 2013), in chondroprogenitors and synovial cells characterized by *Prg4* gene expression (Kozhemyakina et al., 2015)(Jay et al., 2000). If successful, therapies based on Chi3L1 targeting could be considered. For instance, antibodies against Chi3L1 have been tested in cancer and showed interesting results (Faibish et al., 2011). However, we did not have the opportunity to test this approach feasibility and if Chi3L1 KO mice could be resistant to OA induction. We must also keep in mind that Chi3L1 have positive roles in physiological process like fight against infection, immune response modulation and bone resorption regulation (Cruz et al., 2012)(Di Rosa et al., 2014). Although interesting, targeting directly Chi3L1 may not be the panacea.

Hope for patients could come from a new class of medicine called "*senotherapies*". These molecules target specifically senescent cells and have shown great promise in OA treatment (Jeon et al., 2018)(Tachikart et al., 2019). In fact, clearance of articular senescent

cells create a proregenerative environment (Jeon et al., 2017). Our results could help to improve this approach. We suggest that precise characterizations of Chi3L1-induced senescence phenotype may allow to bring out new therapeutic targets, not only in OA. Moreover, Chi3L1 serum and synovial fluid levels could be a relevant biomarker to diagnose senescence-related diseases and to follow senotherapies treatment-response.

4. Experimental procedures

4.1. Animal experiments

6-weeks-old C57BL/6JCj male mice were obtained from Janvier Laboratory. Animal experiments were performed in accordance with the guidelines by the local ethics committee on animal research and care (approval CEEA-LR-10042). After sacrifice, soft tissues and muscles around the knee were dissected and removed. Patella was removed and the supra-patellar synovium tissue was isolated and stored in 200µL Trizol at -80°C. The knee joint was separated, fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C for 2 days, and decalcified by incubation at +4°C in a large volume of 14% EDTA for 21 days. The EDTA solution was changed every 2 to 3 days. Samples were then stored in PBS at +4°C.

4.2. Experimental osteoarthritis and intra-articular injections:

Experimental OA was induced in 8-weeks-old male mice according to the CiOA procedure. Under general anesthesia (isoflurane inhalation), the knee area was disinfected with ethanol and a small cut (a few millimeters) was performed in the cutaneous and subcutaneous tissue to visualize and to access the knee. Then, each mouse received an intra-articular injection of 5µl (1IU) collagenase VII in the left knee to induce OA and 0.9% NaCl in the right knee as control, followed by a second injection two days later. For Chi3L1 experiment, these mouse received injection of 5 µl (1µmole/l) murine Chi3L1 in the left knee, and 0,9% NaCl in the right knee as control, every 3 to 4 days.

4.3. Bone parameter analyses and Safranin-O/Fast Green staining for cartilage analysis

Hind leg paws were dissected to remove smooth tissues and scanned in a micro-CT scanner

SkyScan 1176 (Bruker, Belgium, 0.5 mm aluminum filter, 45 kV, 500 µA, 18 µm resolution, 0.5° rotation angle). Scans were reconstructed using CTAn v1.9, Nrecon v1.6 (Bruker, Belgium) and a three-dimensional (3D) model visualization software program (CTVol v2.0). Misalignment compensation, ring artifacts and beam hardening were adjusted to obtain the correct reconstruction of each paw. Bone degradation was quantified in subchondral bone and the epiphysis region of the medial and/or lateral plateau for each tibia (CTAn software, Bruker, Belgium). Meniscal and ligament calcifications were quantified on the entire knee joint. Reconstructed 3D images of joints were obtained using the Avizo software (Avizo Lite 9.3.0, FEI, France). For cartilage analysis, mouse knees were fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C for 48h, washed in PBS, and then processed for routine histology. Knees were decalcified in 14% EDTA/PBS for three weeks and then paraffin-embedded. Tissue sections (5 µm) were rehydrated through a gradient of ethanol and xylene. Sections were then stained with Safranin-O/Fast Green solution to evaluate cartilage degradation using the OA scoring system adapted for mice (Pritzker et al., 2006).

4.4. Cell types and culture conditions

Human MSC cultures were established from bone marrow aspirates of healthy donors after signature of the informed written consent and approval by the local and national ethics committees (committee of Hannover Medical school with votum No. 2562). MSCs were isolated and amplified in complete alpha-minimum essential medium (Ozyme; BE12-169F-12) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine, and 1 ng/mL of basic fibroblast growth factor-2 (Miltenyi Biotec; GER 130-104-924). For senescence induction, MSCs were incubated with 12.5 µM etoposide (E1383 Sigma, USA. Senescence levels were evaluated after 14 days (medium changed every 3

days). Human OA chondrocytes were isolated from cartilage of patients with OA undergoing knee arthroplasty after signature of the informed written consent and approval by the national ethics committee ('Cellule de bioéthique de la direction générale pour la recherche et innovation, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche'; registration number DC-2009-1052). OA chondrocytes were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum (Sigma, USA), 1% penicillin/streptomycin (Lonza, CH), and 2 mM L-glutamine (Lonza, CH).

4.5. Bone marrow mesenchymal stem cell isolation

Bone-marrow MSCs (BM-MSC) were isolated from the right leg of SAMP8 and SAMR1 mice. Femur and tibia were dissected, and diaphyses were flushed with PBS. Cell suspensions were filtered and plated at a concentration of $1x10^6$ cells/cm^2 in DMEM medium supplemented with 10% FBS (Hyclone, Thermo Fisher Scientific), 2mM glutamine, 100U/mL penicillin, 100mg/mL streptomycin (Lonza, Levallois-Perret, France) and 2ng/mL human basic fibroblast growth factor (R&D Systems, Lille, France). Medium was changed daily to remove red blood cells and non-adherent cells. BM-MSCs were stored at -80°C after passage 1.

4.6. Co-culture experiments

Co-culture experiments were performed as previously described [8]. Briefly, $5x10^5$ OA chondrocytes/well were plated on the bottom of 6-well plates and cultured with MSCs ($7x10^4$ cells/insert) in cell culture inserts (PET membranes, 0.4 µm pores, BD Biosciences, UK). Cultures were maintained in 3 mL of minimal medium (DMEM supplemented with 100U/mL penicillin and 100mg/mL streptomycin, 0.35 mmol/L proline, 0.17 mmol/L ascorbic acid, and 1 mmol/L sodium pyruvate) for 7 days when chondrocytes were collected for RT-

qPCR analysis.

4.7. Gene expression analysis by real-time quantitative PCR

For qPCR experiments, total RNA was extracted from cells using the RNeasy® Mini kit (Qiagen; 74106) according to the manufacturer's instructions. RNA quality was checked by spectral analysis (A260/ 280 nm), and then samples were stored at −80°C. Reverse transcription was performed using the M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen; 28025013; 5U/µL final concentration), 500ng total RNA, a random hexamer primer (Thermo Scientific, GER; S0142; 10ng/µL final concentration), and DNTPs (Roche, CH; 1 277 049; 5mM final concentration) in M-MLV reverse transcriptase buffer (Invitrogen; 18057-018), for a total volume of 20µL. SYBR Green-based quantitative PCR was performed using the LightCycle® 480 SYBR Green I master reaction mix (Roche, 04707516001), 10 ng of cDNA, and the LightCycler 480 real-time PCR system (Roche) (40 cycles of amplification). Raw data (Ct values) were analyzed using the comparative Ct method. Gene expression data were calculated as relative to the expression of housekeeping genes. The comparative threshold cycle method (ΔΔCT) was used to quantify relative gene expression, and the obtained quantification was transformed to exponential $2^{-\Delta\Delta CT}$ values. A p-value below 0.05 (Student's *t*-test) was considered as statistically significant. Primers sequences used for RT-qPCR are listed in Supplementary Table 1.

4.8. Proliferation, Colony Forming Unit (CFU) assays

For CFU assays, $3x10^3$ MSCs were homogeneously plated in 60mm dishes. After 14 days, when cell colonies emerged, cultures were fixed with methanol and stained with Giemsa dye solution diluted 20X for counting.

4.9. *In vitro* chondrogenic differentiation

Chondrogenic differentiation of MSCs was induced by 21-day culture in micropellet, as explained previously (Djouad et al., 2007). Briefly, MSCs (2.5×10^5 cells) were pelleted by centrifugation in 15 ml conical tubes and cultured in chondrogenic medium (DMEM supplemented with 0.1 µM dexamethasone, 0.17 mM ascorbic acid, 1% insulin-transferrin-selenic acid (ITS), 350 nM proline, 1 mM sodium pyruvate) supplemented with 20 ng/mL TGFβ-3.

4.10. *In vitro* adipogenic differentiation

Adipogenic differentiation of MSCs was induced for 14 days as described previously (Noël et al., 2008). Briefly, MSCs ($4{,}5\times 10^4$ cells) were plated in 6-wells plate. Adipogenic differentiation was induced in DMEM:F12 supplemented with 10% FBS, 1 µM dexamethasone, 0.5 mM isobutyl-methylxanthine (IBMX) and 60 µM indomethacin for 3 days. Medium was changed every 2 days and replaced with DMEM:F12 supplemented with 10% FBS. Oil red O staining allow adipocytes characterization while the differentiation was quantified by RT-qPCR.

4.11. *In vitro* osteogenic differentiation

Osteogenic differentiation of MSCs was induced for 14 days as described previously (Noël et al., 2008). Briefly, MSCs (1.5×10^5 cells) were cultured in osteogenic differentiation medium consisting in DMEM (high glucose) with 10% FBS, 0.1 µM dexamethasone, 3 mM NaH_2PO_4 and 50 µg/ml ascorbic acid. Osteoblasts were characterized by alizarine red staining. Osteogenic differentiation was quantified by RT-qPCR.

4.12. Senescence-associated β-galactosidase activity

Induction of MSC senescence was assessed by staining MSCs with a senescence-associated β-galactosidase (SA-β-Gal) Staining Kit (Sigma-Aldrich; CS0030) according to the manufacturer's instructions. In detail, $12x10^3$ MSCs were plated on coverslips and after 24h, they were fixed with the Kit fixation solution at RT for 8min, and then they were incubated with the SA-β-Gal staining solution overnight to reveal SA-β-Gal activity. Cells displaying blue signal in the cytosol were counted as positive, using the ImageJ software. Ten images of random fields for each sample were taken by microscopy, and at least 100 cells were counted for each sample.

4.13. Statistical analysis

All data are presented as the median or mean ±SEM. The Student's *t*-test was used for comparisons between experimental groups, and ANOVA for multiple comparisons. Data were analyzed using the Prism software v6 (GraphPad Software Inc.); p-values <0.05 were considered significant (*p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001; ****p <0.0001).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

YT: experimental designs, data collection, data analysis, manuscript writing and corrections

OM: experimental designs, data collection, data analysis, manuscript writing and corrections

AS: experimental designs, data collection, data analysis and manuscript corrections

MC: experimental designs, data collection, data analysis

ML: experimental designs, data collection, data analysis

RR : experimental designs, data collection, data analysis

MLV : experimental designs, data collection, manuscript corrections

RF: human cell collection, patient consent, manuscript corrections

PP : experimental designs, manuscript corrections, financial supports

FDC : experimental designs, manuscript corrections, financial supports

SN: human cell collection, characterization and validation, manuscript corrections

CK: human cell collection, characterization and validation, manuscript corrections

PC : experimental designs, biostatistical analysis

CJ: experimental designs, manuscript corrections, financial supports

JMB: experimental designs, data collection, data analysis, manuscript writing, corrections, financial supports.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the RAM Animal facility, the Histology facility RHEM, and the ECELLFRANCE non-clinical platform in Montpellier. This work was supported by a research grant from Servier and OM is a post-doctoral clinical master specialist supported by F.R.S. - F.N.R.S (Belgium). YT,PharmD was a PhD student supported by Montpellier Hospital.

REFERENCES

Bojesen, S.E., Johansen, J.S., and Nordestgaard, B.G. (2011). Plasma YKL-40 levels in healthy subjects from the general population. Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem. *412*, 709–712.

Childs, B.G., Gluscevic, M., Baker, D.J., Laberge, R.-M., Marquess, D., Dananberg, J., and van Deursen, J.M. (2017a). Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. Nat. Rev. Drug Discov. *16*, 718–735.

Childs, B.G., Gluscevic, M., Baker, D.J., Laberge, R.-M., Marquess, D., Dananberg, J., and van Deursen, J.M. (2017b). Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. Nat. Rev. Drug Discov. *16*, 718–735.

Coppé, J.-P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. PLoS Biol. *6*, 2853–2868.

Cruz, C.S.D., Liu, W., He, C.H., Jacoby, A., Gornitzky, A., Ma, B., Flavell, R., Lee, C.G., and Elias, J.A. (2012). Chitinase 3-like-1 Promotes Streptococcus pneumoniae Killing and Augments Host Tolerance to Lung Antibacterial Responses. Cell Host Microbe *12*, 34–46.

D'Agostino, M.A., Conaghan, P., Le Bars, M., Baron, G., Grassi, W., Martin-Mola, E., Wakefield, R., Brasseur, J.-L., So, A., Backhaus, M., et al. (2005). EULAR report on the use of ultrasonography in painful knee osteoarthritis. Part 1: prevalence of inflammation in osteoarthritis. Ann. Rheum. Dis. *64*, 1703–1709.

Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S.A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J.R., Laberge, R.-M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dollé, M.E.T., et al. (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. Dev. Cell *31*, 722–733.

Di Rosa, M., Tibullo, D., Vecchio, M., Nunnari, G., Saccone, S., Di Raimondo, F., and Malaguarnera, L. (2014). Determination of chitinases family during osteoclastogenesis. Bone *61*, 55–63.

Diekman, B.O., Sessions, G.A., Collins, J.A., Knecht, A.K., Strum, S.L., Mitin, N.K., Carlson, C.S., Loeser, R.F., and Sharpless, N.E. (2018). Expression of p16INK4a is a biomarker of chondrocyte aging but does not cause osteoarthritis. Aging Cell *17*, e12771.

Djouad, F., Delorme, B., Maurice, M., Bony, C., Apparailly, F., Louis-Plence, P., Canovas, F., Charbord, P., Noël, D., and Jorgensen, C. (2007). Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. Arthritis Res. Ther. *9*, R33.

Faibish, M., Francescone, R., Bentley, B., Yan, W., and Shao, R. (2011). A YKL-40 neutralizing antibody blocks tumor angiogenesis and progression: a potential therapeutic agent in cancers. Mol. Cancer Ther. *10*, 742–751.

Funkhouser, J.D., and Aronson, N.N. (2007). Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. BMC Evol. Biol. *7*, 96.

Guan, J., Liu, Z., Li, F., Feng, J.-S., Wang, H.-J., Chu, J.-G., Song, Y.-Z., Xie, L., and Ding, L.-B. (2015). Increased Synovial Fluid YKL-40 Levels are Linked with Symptomatic Severity in Knee Osteoarthritis Patients. Clin. Lab. *61*, 991–997.

He, S., and Sharpless, N.E. (2017). Senescence in Health and Disease. Cell *169*, 1000–1011.
He, C.H., Lee, C.G., Dela Cruz, C.S., Lee, C.-M., Zhou, Y., Ahangari, F., Ma, B., Herzog, E.L., Rosenberg, S.A., Li, Y., et al. (2013). Chitinase 3-like 1 Regulates Cellular and Tissue Responses via IL-13 Receptor α2. Cell Rep. *4*, 830–841.

Hernandez-Segura, A., Nehme, J., and Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. Trends Cell Biol. *28*, 436–453.

ter Huurne, M., Schelbergen, R., Blattes, R., Blom, A., de Munter, W., Grevers, L.C., Jeanson, J., Noël, D., Casteilla, L., Jorgensen, C., et al. (2012). Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. Arthritis Rheum. *64*, 3604–3613.

Jay, G.D., Britt, D.E., and Cha, C.J. (2000). Lubricin is a product of megakaryocyte stimulating factor gene expression by human synovial fibroblasts. J. Rheumatol. *27*, 594–600.

Jeon, O.H., Kim, C., Laberge, R.-M., Demaria, M., Rathod, S., Vasserot, A.P., Chung, J.W., Kim, D.H., Poon, Y., David, N., et al. (2017). Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. Nat. Med. *23*, 775–781.

Jeon, O.H., David, N., Campisi, J., and Elisseeff, J.H. (2018). Senescent cells and osteoarthritis: a painful connection. J. Clin. Invest. *128*, 1229–1237.

Johansen, J.S. (2006). Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer. Dan. Med. Bull. *53*, 172–209.

Johansen, J.S., Jensen, H.S., and Price, P.A. (1993). A new biochemical marker for joint injury. Analysis of YKL-40 in serum and synovial fluid. Br. J. Rheumatol. *32*, 949–955.

Johansen, J.S., Møller, S., Price, P.A., Bendtsen, F., Junge, J., Garbarsch, C., and Henriksen, J.H. (1997). Plasma YKL-40: a new potential marker of fibrosis in patients with alcoholic cirrhosis? Scand. J. Gastroenterol. *32*, 582–590.

Johansen, J.S., Pedersen, A.N., Schroll, M., Jørgensen, T., Pedersen, B.K., and Bruunsgaard, H. (2008). High serum YKL-40 level in a cohort of octogenarians is associated with increased risk of all-cause mortality. Clin. Exp. Immunol. *151*, 260–266.

Klimczak, A., and Kozlowska, U. (2016). Mesenchymal Stromal Cells and Tissue-Specific Progenitor Cells: Their Role in Tissue Homeostasis. Stem Cells Int. *2016*, 4285215.

Kozhemyakina, E., Zhang, M., Ionescu, A., Ayturk, U.M., Ono, N., Kobayashi, A., Kronenberg, H., Warman, M.L., and Lassar, A.B. (2015). Identification of a Prg4-positive articular cartilage progenitor cell population. Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ *67*, 1261–1273.

Kurth, T.B., Dell'accio, F., Crouch, V., Augello, A., Sharpe, P.T., and De Bari, C. (2011). Functional mesenchymal stem cell niches in adult mouse knee joint synovium in vivo. Arthritis Rheum. *63*, 1289–1300.

Kwon, J.-W., Kim, T.-W., Cho, S.-H., Min, K.-U., and Park, H.-W. (2011). Serum YKL-40 levels are correlated with symptom severity in patients with allergic rhinitis. Allergy *66*, 1252–1253.

Lee, C.G., Da Silva, C.A., Dela Cruz, C.S., Ahangari, F., Ma, B., Kang, M.-J., He, C.-H., Takyar, S., and Elias, J.A. (2011). Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. Annu. Rev. Physiol. *73*, 479–501.

Li, N., and Hua, J. (2017). Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *74*, 2345–2360.

Mansilla, E., Díaz Aquino, V., Zambón, D., Marin, G.H., Mártire, K., Roque, G., Ichim, T., Riordan, N.H., Patel, A., Sturla, F., et al. (2011). Could metabolic syndrome, lipodystrophy, and aging be mesenchymal stem cell exhaustion syndromes? Stem Cells Int. *2011*, 943216.

Martel-Pelletier, J., Barr, A.J., Cicuttini, F.M., Conaghan, P.G., Cooper, C., Goldring, M.B., Goldring, S.R., Jones, G., Teichtahl, A.J., and Pelletier, J.-P. (2016). Osteoarthritis. Nat. Rev. Dis. Primer *2*, 16072.

Mathiessen, A., and Conaghan, P.G. (2017). Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. Arthritis Res. Ther. *19*, 18.

Maumus, M., Manferdini, C., Toupet, K., Peyrafitte, J.-A., Ferreira, R., Facchini, A., Gabusi, E., Bourin, P., Jorgensen, C., Lisignoli, G., et al. (2013). Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis. Stem Cell Res. *11*, 834–844.

McGonagle, D., Baboolal, T.G., and Jones, E. (2017). Native joint-resident mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. Nat. Rev. Rheumatol. *13*, 719–730.

Mylin, A.K., Abildgaard, N., Johansen, J.S., Heickendorff, L., Kreiner, S., Waage, A., Turesson, I., Gimsing, P., and Nordic Myeloma Study Group (2015). Serum YKL-40: a new independent prognostic marker for skeletal complications in patients with multiple myeloma. Leuk. Lymphoma *56*, 2650–2659.

Noël, D., Caton, D., Roche, S., Bony, C., Lehmann, S., Casteilla, L., Jorgensen, C., and Cousin, B. (2008). Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal–stromal cells despite similar differentiation potentials. Exp. Cell Res. *314*, 1575–1584.

Platas, J., Guillén, M.I., Pérez Del Caz, M.D., Gomar, F., Castejón, M.A., Mirabet, V., and

Alcaraz, M.J. (2016). Paracrine effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells in inflammatory stress-induced senescence features of osteoarthritic chondrocytes. Aging *8*, 1703–1717.

Pleumeekers, M.M., Nimeskern, L., Koevoet, J.L.M., Karperien, M., Stok, K.S., and van Osch, G.J.V.M. (2018). Trophic effects of adipose-tissue-derived and bone-marrow-derived mesenchymal stem cells enhance cartilage generation by chondrocytes in co-culture. PloS One *13*, e0190744.

Pritzker, K.P.H., Gay, S., Jimenez, S.A., Ostergaard, K., Pelletier, J.-P., Revell, P.A., Salter, D., and van den Berg, W.B. (2006). Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. Osteoarthritis Cartilage *14*, 13–29.

Rathcke, C.N., and Vestergaard, H. (2006). YKL-40, a new inflammatory marker with relation to insulin resistance and with a role in endothelial dysfunction and atherosclerosis. Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al *55*, 221–227.

Sanchez, C., Mazzucchelli, G., Lambert, C., Comblain, F., DePauw, E., and Henrotin, Y. (2018). Comparison of secretome from osteoblasts derived from sclerotic versus non-sclerotic subchondral bone in OA: A pilot study. PLoS ONE *13*.

Shao, R., Hamel, K., Petersen, L., Cao, Q.J., Arenas, R.B., Bigelow, C., Bentley, B., and Yan, W. (2009). YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis. Oncogene *28*, 4456–4468.

Sutherland, T.E., Logan, N., Rückerl, D., Humbles, A.A., Allan, S.M., Papayannopoulos, V., Stockinger, B., Maizels, R.M., and Allen, J.E. (2014). Chitinase-like proteins promote IL-17-mediated neutrophilia in a trade-off between nematode killing and host damage. Nat. Immunol. *15*, 1116–1125.

Tachikart, Y., Malaise, O., Mumme, M., Jorgensen, C., and Brondello, J.-M. (2019). Seno-suppressive molecules as new therapeutic perspectives in rheumatic diseases. Biochem. Pharmacol. *165*, 126–133.

Tu, C., He, J., Wu, B., Wang, W., and Li, Z. (2019). An extensive review regarding the adipokines in the pathogenesis and progression of osteoarthritis. Cytokine *113*, 1–12.

Väänänen, T., Koskinen, A., Paukkeri, E.-L., Hämäläinen, M., Moilanen, T., Moilanen, E., and Vuolteenaho, K. (2014a). YKL-40 as a novel factor associated with inflammation and catabolic mechanisms in osteoarthritic joints. Mediators Inflamm. *2014*, 215140.

Väänänen, T., Koskinen, A., Paukkeri, E.-L., Hämäläinen, M., Moilanen, T., Moilanen, E., and Vuolteenaho, K. (2014b). YKL-40 as a Novel Factor Associated with Inflammation and Catabolic Mechanisms in Osteoarthritic Joints. Mediators Inflamm. *2014*.

Vuolteenaho, K., Leppänen, T., Kekkonen, R., Korpela, R., and Moilanen, E. (2014). Running a marathon induces changes in adipokine levels and in markers of cartilage degradation--novel

role for resistin. PloS One *9*, e110481.

Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. Nature *445*, 656–660.

Yeo, I.J., Lee, C.-K., Han, S.-B., Yun, J., and Hong, J.T. (2019). Roles of chitinase 3-like 1 in the development of cancer, neurodegenerative diseases, and inflammatory diseases. Pharmacol. Ther. 107394.

Zhao, Y., Jia, Z., Huang, S., Wu, Y., Liu, L., Lin, L., Wang, D., He, Q., and Ruan, D. (2017). Age-Related Changes in Nucleus Pulposus Mesenchymal Stem Cells: An In Vitro Study in Rats. Stem Cells Int. *2017*, 6761572.

Zhen, G., Wen, C., Jia, X., Li, Y., Crane, J.L., Mears, S.C., Askin, F.B., Frassica, F.J., Chang, W., Yao, J., et al. (2013). Inhibition of TGF-β signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis. Nat. Med. *19*, 704–712.

Zhou, J., Li, C., Yu, A., Jie, S., Du, X., Liu, T., Wang, W., and Luo, Y. (2019). Bioinformatics analysis of differentially expressed genes involved in human developmental chondrogenesis. Medicine (Baltimore) *98*.

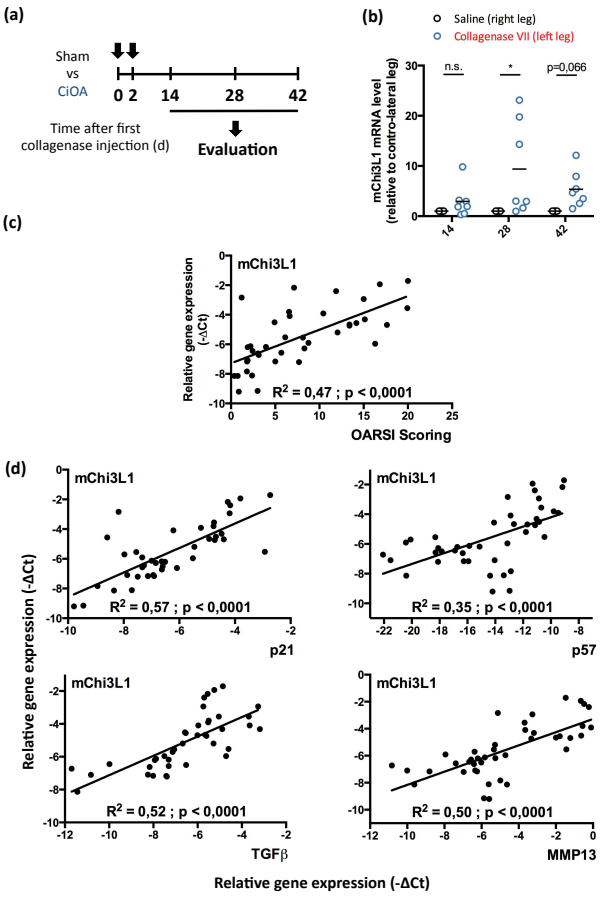


Figure 1 : Chi3L1 levels in synovial tissue correlate with cartilage degradation and OA markers in Collagenase induced OsteoArthritis model

(a) design of the experiment. (b) Chi3L1 mRNA expression level in the synovial membrane after NaCl or collagenase injection, measured by RT-qPCR. Results were expressed as fold change compared with contro-lateral leg. Graphs represent the mean ± SEM (n=7); * = p<0.05. (c) Chi3L1 expression in synovial membrane with cartilage degradation (OA score according to van den Berg; from 0 to 30). R^2 and *p* values from linear regression analysis shown (d) Chi3L1 expression with senescence and SASP markers expression in synovial membrane R^2 and *p* values from linear regression analysis shown.

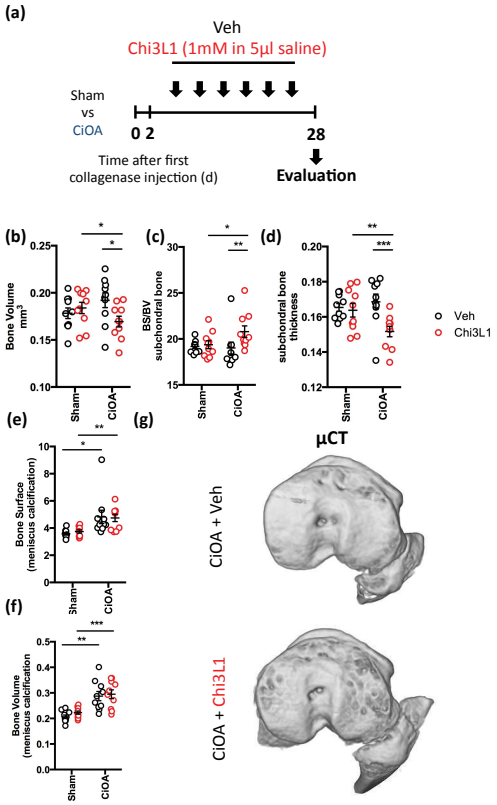


Figure 2 : Chi3L1 chronic intra-articular administration aggravate CiOA phenotype

(a) design of the experiment ; (b) (c) (d) (e) (f) Histo-morphometric analysis by micro-CT at day 28. Graphs represent the mean ± SEM (n=10 for each group); *=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001, ****=p<0.001. (g) Representative micro-CT images showing higher sub-chondral bone modification.

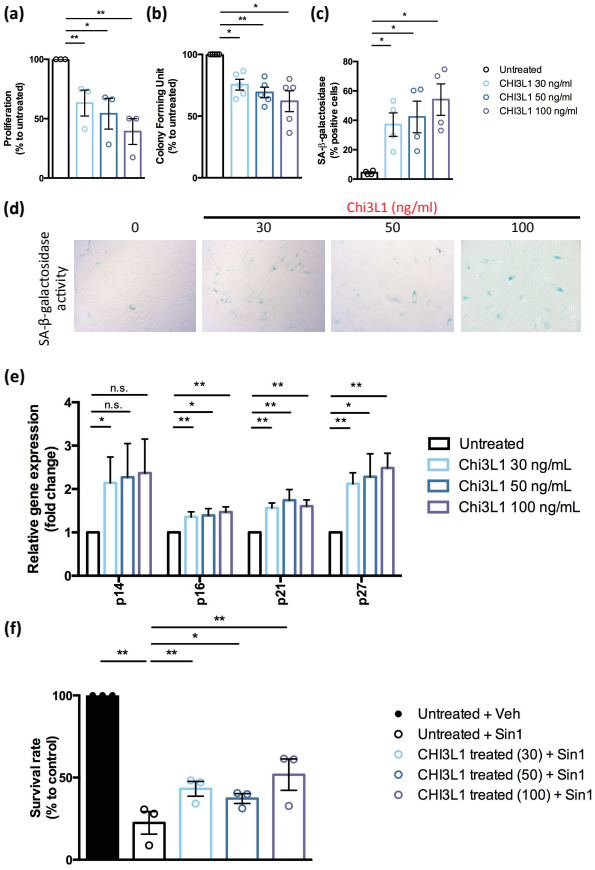


Figure 3 : Chi3L1 chronic exposure induces MSCs senescence

(a) Proliferation rate (mean ± SEM) in human MSCs after 14 days Chi3L1 treatment at different doses normalized to untreated control (n=3) ; (b) Colony forming units in Chi3L1-treated MSCs compared to untreated control MSCs (n=5) ; (c) Beta-galactosidase staining in human MSCs after 14 days Chi3L1 treatment at different doses (n=4) ; (d) Representative images of beta-galactosidase staining in proliferative and Chi3L1-treated human MSCs ; (e) p14, p16, P21 and p27 mRNA expression in human MSCs after 14 days Chi3L1 treatment at different doses by RT-qPCR. Data are the fold change relative to untreated cells (mean ± SEM; n=5 for each condition). (f) survival rate after Sin1 treatment of human MSCs after 14 days Chi3L1 treatment at different doses normalized to untreated control (n=3)

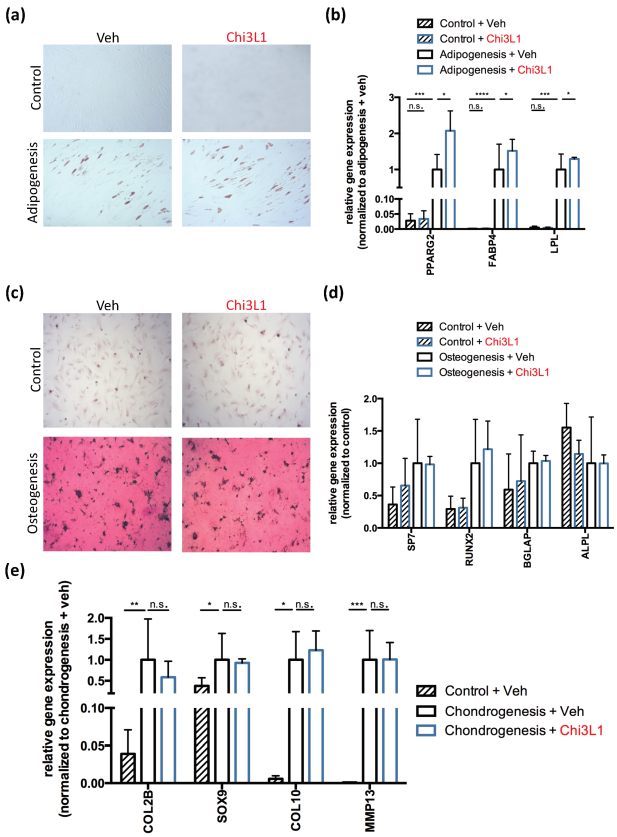


Figure 4 : Chi3L1 chronic treatment favors adipogenic differenciation

Adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiations of proliferative MSC and Chi3L1-induced senescent MSCs. (a) Oil Red O (c) alizarine red staining of proliferative MSC and Chi3L1-induced senescent MSCs revealing respectively adipogenic and osteogenic. Relative expression of adipogenic (b), osteogenic (d) and chondrogenic (e) markers proliferative MSC versus Chi3L1-induced senescent MSCs before (d0, crossed bars) or after (d21, white bars) induction of differentiation, *=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001, ****=p<0.001.

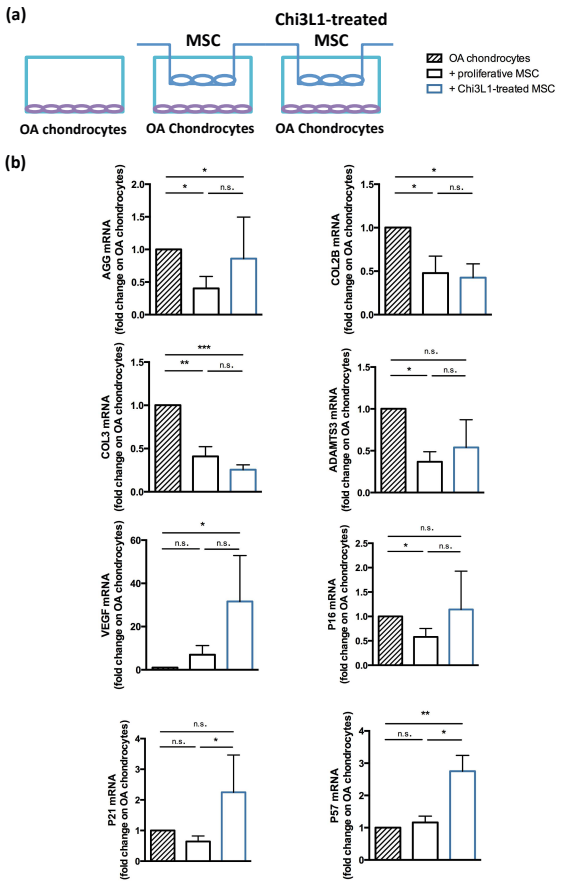


Figure 5 : Chi3L1-treated MSCs spread senescence to chondrocytes via paracrine effect

(a) Experimental design of the without-contact co-culture system to assess the effect of senescent human MSCs on chondrocytes from patients with OA. (b) Expression analysis by RT-qPCR in OA chondrocytes without co-culture (crossed columns; control), or co-cultured with proliferating MSCs (white columns), or with senescent MSCs (blue columns) for 7 days. Data are expressed as fold change relative to control (mean ± SEM of n=5); *=p<0.05 **=p<0,01.

8. Discussions et perspectives

L'arthrose est une pathologie dégénérative de l'articulation se traduisant par une dégradation du cartilage. C'est la maladie rhumatologique la plus fréquente, touchant particulièrement la population âgée, avec une incidence de 33% des plus de 65 ans rien que pour la gonarthrose (Martel-Pelletier et al., 2016). La prise en charge actuelle n'empêche pas la progression de la maladie d'où la nécessité d'étudier et de mieux comprendre sa physiopathologie afin d'apporter des solutions à ces nombreux patients. L'âge étant un facteur de risque prédominant, la question du lien entre l'arthrose et la sénescence cellulaire s'est posé depuis le début des années 2000 (Martin and Buckwalter, 2002). Ce syndrome est caractérisé par un arrêt robuste du cycle cellulaire associé à un sécrétome particulier. Au cours de la vie, ces cellules sénescentes s'accumulent dans nos tissus de manière corrélée à la survenue de pathologies dites liées à l'âge (He and Sharpless, 2017).

Durant ma thèse, j'ai été chargé d'établir ou non le lien entre l'arthrose, la sénescence et les cellules souches articulaires chargées de la réparation et du maintien de l'homéostasie articulaire, les cellules stromales/souches mésenchymateuses.

8.1. CSMs et OA

Bien qu'il n'existe pas de marqueur universel, l'inhibiteur du cycle cellulaire p16 est considéré comme une caractéristique majeure des cellules sénescentes. De cette manière, l'accumulation de cellules p16 positives dans les tissus est communément associée à la présence de cellules sénescentes et aux pathologies liées à l'âge. Le premier objectif de mes travaux était de mettre au point le modèle de suivi de ces cellules p16 positives pour établir une cinétique de leur apparition dans l'articulation au cours de l'induction de l'arthrose. Cette mission a été réalisée à l'aide des modèles murins transgéniques "*p16-driven*

luciferase" homozygote et hétérozygote. Il s'agit d'un knockin du gène codant pour la luciférase sous le contrôle du promoteur de p16 (Burd et al., 2013). Nous avons ainsi, tout d'abord, mis en évidence l'expression transitoire de p16, et donc l'apparition de cellules sénescentes, dans l'articulation au cours de l'induction par collagénase de la pathologie. Ensuite, profitant du fait que la souris homozygote soit donc également KO pour ce gène, nous avons montré que l'absence de p16 protégeait en partie l'articulation de la dégradation du cartilage. Ces données suggèrent un rôle délétère de la sénescence dans ce modèle. Nos observations corroborent les résultats de Jeon et al. dans le modèle p16-3MR avec induction de l'arthrose par transsection du ligament crucial antérieur (Jeon et al., 2017). Seulement, le mécanisme exact ainsi que le type cellulaire dont la sénescence serait impliqué dans la physiopathologie reste inconnu. Deux faits nous ont amené à nous intéresser à la membrane synoviale. D'abord, nous avons observé l'apparition au cours du temps de marquages positifs pour p16 par immunohistochimie au niveau de la membrane synoviale hypertrophique durant l'induction de l'arthrose (données non montrées). Ensuite, le signal de luminescence visible à la caméra CCD était visible principalement après injection de luciférine en systémique, suggérant que les cellules p16 positive à l'origine du signal étaient dans un tissu vascularisé. De plus, récemment, L'inactivation somatique de p16 dans les chondrocytes a été montrée comme inefficace pour empêcher le développement de l'arthrose (Diekman et al., 2018). Nous nous sommes alors intéressés à la membrane synoviale et au rôle des CSM, l'une des populations cellulaires localisées à ce niveau. Les CSM sont chargées du maintien de l'homéostasie articulaire grâce à leurs propriétés intrinsèques (souches, différenciation) et extrinsèque (support trophique et chondroprotecteur). Une étude de Zhen et al. a montré que l'absence du TGFβRII sur les CSMs Nestin+ empêchait la dégradation du cartilage, explicitant ainsi un rôle potentiellement causal des CSMs dans l'arthrose (Zhen et al., 2013).

Ce type cellulaire constituait donc un candidat idéal de par sa fonction. Nous avons ainsi mis en place différents modèles d'étude *in vitro* de la sénescence des CSMs et mis en évidence leurs altérations des propriétés intrinsèques et extrinsèques liée à la sénescence. De manière intéressante, les cocultures en transwell ont révélé une propriété "anti-sénescente" des CSMs proliférantes sur les chondrocytes de patients arthrosique. Cette propriété est perdue chez les CSMs sénescentes. Mais celles-ci semblent également avoir acquis une fonction supplémentaire délétère comme le montre nos résultats *in vivo* avec l'injection intra-articulaire de CSMs issues d'un modèle murin de vieillissement accéléré qui se traduit par une dégradation du cartilage visible au jour 42.

Ces résultats proposent les CSMs sénescentes comme acteur important de la physiopathologie de l'arthrose. Nous proposons donc de cibler spécifiquement ces CSMs avec des "*sénothérapies*". L'approche dite "*sénolytique*" (i.e. l'élimination spécifique des cellules sénescentes) s'est déjà révélée efficace dans des modèles murins d'arthrose post-traumatique et l'étude clinique de phase I qui a découlé de ces résultats a également montré des résultats prometteurs (Jeon et al., 2017b)(http://ir.unitybiotechnology.com/news-releases/news-release-details/unity-biotechnology-inc-announces-plan-phase-2-clinical-study). Néanmoins, l'arthrose semble être un syndrome plus qu'une pathologie unique. Différents phénotypes et causes sont à mettre en évidence, et l'implication de la sénescence dans chacun est encore à déterminer. De la même manière, le phénotype précis de ces cellules sénescentes est à caractériser pour pouvoir apporter les traitements les plus efficaces possibles. Dans cette optique, il pourra être envisageable de comparer le profil transcriptomique des CSMs proliférantes avec celui des CSMs sénescentes ou de réaliser un screen large CRISPR pour mettre en évidence les gènes centraux dans l'établissement du SASP ou de la résistance à l'apoptose (Liu et al., 2019). Notre étude pourra également

trouver des implications en thérapie cellulaire, afin de mieux caractériser les lots cellulaires destinés à être apporté aux patients et d'améliorer l'efficacité et les taux de réponses aux traitements. Il pourra être envisagé d'évaluer différents marqueurs de sénescence dans chaque lot pour les valider. Les lots présentant un taux élevé de cellules sénescentes pourront être traités afin de sélectionner les CSMs les plus aptes à apporter un effet thérapeutique. L'utilisation d'*induced pluripotent stem cells* (iPSC) différenciées en iCSM pourrait également constituer une approche prometteuse dans cette voie.

8.2. Microenvironnement, sénescence et OA

Lors de notre première étude, nous avons analysé, grâce à des immunoblots, le sécrétome des CSMs sénescentes. De manière intéressante, deux protéines déjà reliées aux pathologies rhumatologiques ont attirés notre attention, DKK1 et Chi3L1. Ces deux protéines sont impliquées dans la régulation de la balance résorption/formation osseuse, dans le sens de la résorption osseuse principalement. DKK1 a déjà été relié à la RA, mais, en ce qui concerne Chi3L1, peu d'études ont poursuivi plus loin que l'établissement de corrélations entre taux sériques ou articulaires et sévérité des pathologies rhumatologiques étudiées (Diarra et al., 2007)(Johansen et al., 1993)(Guan et al., 2015). Dans ce cadre où on peut observer des ostéophytes (i.e. des néoformations d'os), la présence de ces protéines pouvait être interprétée comme une réponse de l'articulation pour favoriser la réparation du tissu et le retour à l'homéostasie. Pour le rôle de Chi3L1 déjà connu dans la fibrose, l'inflammation et le remodelage tissulaire, nous avons émis l'hypothèse que les symptômes observés au niveau de la membrane synoviale (fibrose, hypertrophie, inflammation) seraient liés à cette chitinase-like (Johansen, 2006). De manière intéressante, les niveaux d'expression génique de Chi3L1 dans le tissu synovial sont corrélés avec plusieurs marqueurs de la sénescence et

du SASP, ainsi qu'avec le niveau de dégradation du cartilage. Cette chitinase étant connue pour avoir des effets anaboliques sur le chondrocytes, nous nous sommes posés la question si les CSMs ne pouvait pas, comme nous l'avons montré précedemment, être ce lien entre Chi3L1, sénescence et développement de la pathologie (De Ceuninck et al., 2001). Nous avons ainsi mis en évidence la première preuve du lien direct entre Chi3L1 et sénescence. En effet, le traitement chronique des CSMs par cette protéine induit un phénotype sénescent comme l'ont montré les altérations de leurs propriétés intrinsèques. Ce phénotype est également caractérisé par une différenciation adipogénique favorisée, faisant écho à la lipodystrophie du sujet âgé et aux adipokines, des cytokines sécrétées par les adipocytes et impliquées dans l'inflammation et le développement de l'arthrose (Tu et al., 2019). Les fonctions extrinsèques des CSMs après traitement par Chi3L1 se sont révélées également altérées, avec une fonction paracrine ayant un effet pro-sénescent sur les chondrocytes. Ces CSMs dont la sénescence est liée à Chi3L1 pourront constituer des cibles thérapeutiques intéressantes dans la lutte contre l'arthrose. Malheureusement, nous n'avons pas pu tester nos hypothèses sur la souris Chi3L1 -/-. Egalement, pour confirmer le rôle de la membrane synoviale comme driver de la pathologie, il devrait être envisagé l'étude d'un modèle murin KO spécifique des cellules Ptrg4 pour le récepteur de Chi3L1, l'IL13Rα2 (He et al., 2013). Il serait aussi intéressant de s'intéresser à l'implication du système immunitaire. En effet, l'arthrose est associée à une infiltration de cellules de l'immunité dans le tissu synoviale, parmi lesquelles on trouve les macrophages qui peuvent être recrutés par Chi3L1 (Kawada et al., 2012). Ceux ci ont un rôle prépondérant dans la réparation tissulaire et la régulation de la réponse inflammatoire. Les macrophages pro-inflammatoires de type M1 produisent Chi3L1 et pourraient également expliquer en partie nos résultats dans le tissu synovial (Boot et al., 1995)(Kunz et al., 2015). Une étude transcriptomique en single-cell du tissu synovial

pourrait constituer une approche pour apporter des réponses à ces questions encore en suspens.

Notre étude souligne le rôle du microenvironnement dans la pathologie arthrosique. Chi3L1 constituerait un lien entre la sénescence observée dans l'articulation et le développement de l'arthrose, à la fois spontanée/liée à l'âge et post-traumatique. En effet, les taux sériques de cette protéine augmente avec l'âge et avec nombre de pathologies ayant été décrites comme liées à la sénescence (Bojesen et al., 2011)(Johansen et al., 2008). Cette augmentation des taux de Chi3L1 pourrait être liée au SASP de cellules sénescentes périphériques, se traduisant potentiellement par le développement d'une arthrose ou d'autres pathologies liées à la sénescence. Dans le diabète par exemple, relié récemment à l'accumulation de cellules sénescentes pancréatiques, des taux élevés de Chi3L1 ont été observés (Aguayo-Mazzucato et al., 2019)(Thompson et al., 2019). Ce fait pourrait expliquer le risque plus élevé chez ces patients de développer de l'arthrose, avec des phénotypes plus sévères (Zhou et al., 2019). Il serait intéressant d'évaluer si Chi3L1 et les autres chitinases humaines constituerait des marqueurs de la sénescence dans différentes conditions. Les taux sériques de ces protéines pourraient permettre l'évaluation de la réponse aux sénothérapies. Chi3L1 elle même pourrait être une cible thérapeutique comme cela a déjà été évalué avec des résultats prometteurs dans certains cancers (Faibish et al., 2011). Néanmoins, ses rôles positif dans la réponse aux infections et potentiel dans la régulation du métabolisme osseux poussent à la prudence (Cruz et al., 2012)(Di Rosa et al., 2014b). Des développements précliniques supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cet effet délétère avant de pouvoir proposer de nouveaux traitements aux patients.

8.3. OA et sénothérapies

De plus en plus de preuves amènent à un rôle causal de la sénescence dans la pathologie arthrosique. Nos travaux s'inscrivent dans cette lignée et souligne à nouveau l'intérêt d'étudier ce phénomène pour ce qu'il impliquera pour les patients, à la fois en terme de diagnostic et de traitements. L'idée de cibler les cellules sénescentes prend ainsi de la popularité au fur et à mesure que de nouvelles études les inculpent. Trois approches de sénothérapies (i.e. thérapie ciblant spécifiquement les cellules sénescentes : Figure 22) coexistent avec chacune leurs avantages et inconvénients supposés. Les sénolytiques éliminent les cellules sénescentes. Les sénosuppresseurs restaurent certaines de leurs fonctions réversant ainsi le phénotype. Enfin, les modulateurs du SASP ciblent les voies impliquant dans l'établissement du sécrétome pour empêcher son effet délétère (Tachikart et al., 2019).

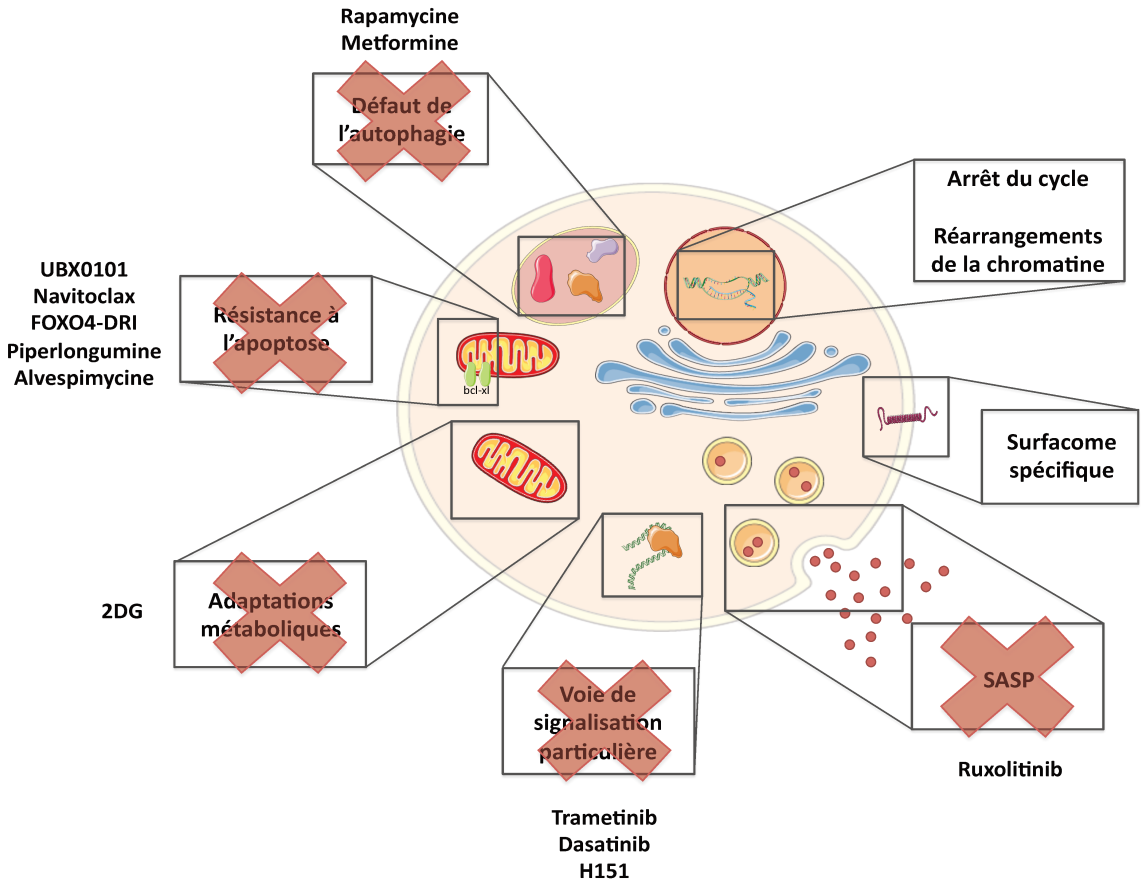


FIGURE 22 : LES SENOTHERAPIES ET LEURS CIBLES

Cette nouvelle classe médicamenteuse va constituer une véritable révolution médicale pour les patients atteints d'arthrose, mais pas seulement. La première étude clinique est prometteuse, néanmoins, plusieurs questions restent en suspens et seront à résoudre avant de généraliser ces approches dans la pratique courante. Premièrement, comme mentionné précédemment, la sénescence cellulaire est un processus physiologique qui coordonne la réparation des tissus, et la différentiation de certains types cellulaires (He and Sharpless, 2017). L'administration au long cours de sénothérapies, principalement en systémique pose question sur leur innocuité, particulièrement pour les sénosuppresseurs et les modulateurs du SASP. Car s'il est envisageable de proposer au patient un traitement sénolytique sous forme de cures plus ou moins espacées dans le temps, laissant la

sénescence "physiologique" remplir son rôle entre les différentes administrations, ce n'est pas le cas pour les deux autres classes de sénothérapies. La perturbation de ces processus n'est pas anodine, car il s'agit bien d'un équilibre entre d'un côté, l'apparition de pathologies liées à l'âge, et de l'autre, la survenue de cancers, et une mauvaise compréhension de cet enjeu, n'aurait pour conséquence que de remplacer un problème par l'autre. Les nouveaux traitements anticancéreux dont le principe est la réinduction de l'arrêt de la prolifération par l'induction de la sénescence (palbociclib par exemple) pose cette même question. Il faut garder en tête que nous sommes devant la première génération de sénothérapie, et qu'elle connaitra logiquement des échecs. Heureusement, la sénescence existe sous différents phénotypes selon le type de cellule concernée et le mode d'induction. La découverte d'un composé sénothérapeutique universel comme fantasmé dans les légendes tel la fontaine de jouvence, qui pourrait cibler toutes les cellules sénescentes d'un organisme n'est pas à l'ordre du jour. Pour chaque pathologie, le ou les phénotypes de sénescence impliqués devront être caractérisés. Comme pour les traitements anticancéreux, il sera essentiel de classer ces sous-types de sénescence trouvés dans chaque condition physiopathologique pour les accorder à la sénothérapie la plus adaptée et ainsi limiter les effets secondaires autant que possible. Ces sénothérapies ciblées seraient prochainement appliquées à des patients souffrant de diverses pathologies ostéo-articulaires, notamment l'arthrose, l'ostéoporose, mais également d'autres maladies inflammatoires chroniques. L'administration de telles thérapies, sous forme de traitements systémiques ou même localisées à un seul organe comme dans l'articulation arthrosique, laisseront la possibilité à d'autres cellules sénescentes, ailleurs dans l'organisme, d'exprimer leurs propriétés bénéfiques. Enfin, il ne faut pas oublier non plus que notre système immunitaire est le

"premier sénolytique" et l'un des plus efficaces (Ruscetti et al., 2018). Les perspectives de l'immunothérapie n'en sont que plus larges.

9. Bibliographie

Acosta, J.C., O'Loghlen, A., Banito, A., Raguz, S., and Gil, J. (2008a). Control of senescence by CXCR2 and its ligands. Cell Cycle Georget. Tex *7*, 2956–2959.

Acosta, J.C., O'Loghlen, A., Banito, A., Guijarro, M.V., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C., Popov, N., et al. (2008b). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. Cell *133*, 1006–1018.

Aguayo-Mazzucato, C., Andle, J., Lee, T.B., Midha, A., Talemal, L., Chipashvili, V., Hollister-Lock, J., Deursen, J. van, Weir, G., and Bonner-Weir, S. (2019). Acceleration of β Cell Aging Determines Diabetes and Senolysis Improves Disease Outcomes. Cell Metab. *30*, 129-142.e4.

Akiyama, Y., Ashizawa, T., Komiyama, M., Miyata, H., Oshita, C., Omiya, M., Iizuka, A., Kume, A., Sugino, T., Hayashi, N., et al. (2014). YKL-40 downregulation is a key factor to overcome temozolomide resistance in a glioblastoma cell line. Oncol. Rep. *32*, 159–166.

Atkins, R.J., Stylli, S.S., Kurganovs, N., Mangiola, S., Nowell, C.J., Ware, T.M., Corcoran, N.M., Brown, D.V., Kaye, A.H., Morokoff, A., et al. (2019). Cell quiescence correlates with enhanced glioblastoma cell invasion and cytotoxic resistance. Exp. Cell Res. *374*, 353–364.

Baar, M.P., Brandt, R.M.C., Putavet, D.A., Klein, J.D.D., Derks, K.W.J., Bourgeois, B.R.M., Stryeck, S., Rijksen, Y., van Willigenburg, H., Feijtel, D.A., et al. (2017). Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. Cell *169*, 132-147.e16.

Baeten, D., Boots, A.M.H., Steenbakkers, P.G.A., Elewaut, D., Bos, E., Verheijden, G.F.M., Verbruggen, G., Miltenburg, A.M.M., Rijnders, A.W.M., Veys, E.M., et al. (2000). Human

cartilage gp-39+,CD16+ monocytes in peripheral blood and synovium: Correlation with joint destruction in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. *43*, 1233–1243.

Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonia, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., van de Sluis, B., Kirkland, J.L., and van Deursen, J.M. (2011a). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. Nature *479*, 232–236.

Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonia, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., van de Sluis, B., Kirkland, J.L., and van Deursen, J.M. (2011b). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. Nature *479*, 232–236.

Baker, D.J., Childs, B.G., Durik, M., Wijers, M.E., Sieben, C.J., Zhong, J., Saltness, R.A., Jeganathan, K.B., Verzosa, G.C., Pezeshki, A., et al. (2016). Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. Nature *530*, 184–189.

Barradas, M., Anderton, E., Acosta, J.C., Li, S., Banito, A., Rodriguez-Niedenführ, M., Maertens, G., Banck, M., Zhou, M.-M., Walsh, M.J., et al. (2009). Histone demethylase JMJD3 contributes to epigenetic control of INK4a/ARF by oncogenic RAS. Genes Dev. *23*, 1177–1182.

Bartek, J., Bartkova, J., and Lukas, J. (2007). DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. Oncogene *26*, 7773–7779.

Bernal, A., and Arranz, L. (2018). Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. Cell. Mol. Life Sci. *75*, 2177–2195.

Bhardwaj, R., Yester, J.W., Singh, S.K., Biswas, D.D., Surace, M.J., Waters, M.R., Hauser, K.F., Yao, Z., Boyce, B.F., and Kordula, T. (2015). RelB/p50 complexes regulate cytokine-induced YKL-40 expression. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *194*, 2862–2870.

Bhaumik, D., Scott, G.K., Schokrpur, S., Patil, C.K., Orjalo, A.V., Rodier, F., Lithgow, G.J., and Campisi, J. (2009). MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8. Aging *1*, 402–411.

Bigg, H.F., Wait, R., Rowan, A.D., and Cawston, T.E. (2006). The mammalian chitinase-like lectin, YKL-40, binds specifically to type I collagen and modulates the rate of type I collagen fibril formation. J. Biol. Chem. *281*, 21082–21095.

Biggar, R.J., Johansen, J.S., Smedby, K.E., Rostgaard, K., Chang, E.T., Adami, H.-O., Glimelius, B., Molin, D., Hamilton-Dutoit, S., Melbye, M., et al. (2008). Serum YKL-40 and IL-6 Levels in Hodgkin Lymphoma. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *14*, 6974–6978.

Blayo, Y. (1975). Mouvement naturel de la population française de 1740 à 1829. Population *30*, 15–64.

Bohr, S., Patel, S.J., Vasko, R., Shen, K., Golberg, A., Berthiaume, F., and Yarmush, M.L. (2015). The Role of CHI3L1 (Chitinase-3-Like-1) in the Pathogenesis of Infections in Burns in a Mouse Model. PLoS ONE *10*.

Bojesen, S.E., Johansen, J.S., and Nordestgaard, B.G. (2011). Plasma YKL-40 levels in healthy subjects from the general population. Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem. *412*, 709–712.

Bonney, E.A. (2017). Mapping out p38MAPK. Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N 1989 *77*.

Boot, R.G., Renkema, G.H., Strijland, A., van Zonneveld, A.J., and Aerts, J.M. (1995). Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. J. Biol. Chem. *270*, 26252–26256.

Booth, L.N., and Brunet, A. (2016). The Aging Epigenome. Mol. Cell *62*, 728–744.

Bracken, A.P., Kleine-Kohlbrecher, D., Dietrich, N., Pasini, D., Gargiulo, G., Beekman, C., Theilgaard-Mönch, K., Minucci, S., Porse, B.T., Marine, J.-C., et al. (2007). The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. Genes Dev. *21*, 525–530.

Braun, H., Schmidt, B.M.W., Raiss, M., Baisantry, A., Mircea-Constantin, D., Wang, S., Gross, M.-L., Serrano, M., Schmitt, R., and Melk, A. (2012). Cellular senescence limits regenerative capacity and allograft survival. J. Am. Soc. Nephrol. JASN *23*, 1467–1473.

Brondello, J.-M., Prieur, A., Philipot, D., Lemaitre, J.-M., Lenaers, G., Piette, J., and Dulić, V. (2012). La sénescence cellulaire - Un nouveau mythe de Janus? médecine/sciences *28*, 288–296.

Burd, C.E., Sorrentino, J.A., Clark, K.S., Darr, D.B., Krishnamurthy, J., Deal, A.M., Bardeesy, N., Castrillon, D.H., Beach, D.H., and Sharpless, N.E. (2013). Monitoring tumorigenesis and senescence in vivo with a p16(INK4a)-luciferase model. Cell *152*, 340–351.

Burgess, R.C., Burman, B., Kruhlak, M.J., and Misteli, T. (2014). Activation of DNA damage response signaling by condensed chromatin. Cell Rep. *9*, 1703–1717.

Bussian, T.J., Aziz, A., Meyer, C.F., Swenson, B.L., van Deursen, J.M., and Baker, D.J. (2018). Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. Nature *562*, 578–582.

Cahu, J., Bustany, S., and Sola, B. (2012). Senescence-associated secretory phenotype favors the emergence of cancer stem-like cells. Cell Death Dis. *3*, e446.

Campisi, J. (2005). Aging, tumor suppression and cancer: high wire-act! Mech. Ageing Dev. *126*, 51–58.

Capell, B.C., Drake, A.M., Zhu, J., Shah, P.P., Dou, Z., Dorsey, J., Simola, D.F., Donahue, G., Sammons, M., Rai, T.S., et al. (2016). MLL1 is essential for the senescence-associated secretory phenotype. Genes Dev. *30*, 321–336.

Caplan, A.I. (2017a). New MSC: MSCs as pericytes are Sentinels and gatekeepers. J. Orthop. Res. *35*, 1151–1159.

Caplan, A.I. (2017b). Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! Stem Cells Transl. Med. *6*, 1445–1451.

Capone, M., Maggi, L., Santarlasci, V., Rossi, M.C., Mazzoni, A., Montaini, G., Cimaz, R., Ramazzotti, M., Piccinni, M.P., Barra, G., et al. (2016). Chitinase 3-like-1 is produced by human Th17 cells and correlates with the level of inflammation in juvenile idiopathic arthritis patients. Clin. Mol. Allergy *14*, 16.

Carr, M.J., Toma, J.S., Johnston, A.P.W., Steadman, P.E., Yuzwa, S.A., Mahmud, N., Frankland, P.W., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2019). Mesenchymal Precursor Cells in Adult Nerves Contribute to Mammalian Tissue Repair and Regeneration. Cell Stem Cell *24*, 240-256.e9.

Castrechini, N.M., Murthi, P., Qin, S., Kusuma, G.D., Wilton, L., Abumaree, M., Gronthos, S., Zannettino, A., Gude, N.M., Brennecke, S.P., et al. (2012). Decidua parietalis-derived mesenchymal stromal cells reside in a vascular niche within the choriodecidua. Reprod. Sci. Thousand Oaks Calif *19*, 1302–1314.

Chan, C.K.F., Gulati, G.S., Sinha, R., Tompkins, J.V., Lopez, M., Carter, A.C., Ransom, R.C., Reinisch, A., Wearda, T., Murphy, M., et al. (2018). Identification of the Human Skeletal Stem Cell. Cell *175*, 43-56.e21.

Chandler, H., and Peters, G. (2013). Stressing the cell cycle in senescence and aging. Curr. Opin. Cell Biol. *25*, 765–771.

Chandra, T., Kirschner, K., Thuret, J.-Y., Pope, B.D., Ryba, T., Newman, S., Ahmed, K., Samarajiwa, S.A., Salama, R., Carroll, T., et al. (2012). Independence of Repressive Histone Marks and Chromatin Compaction during Senescent Heterochromatic Layer Formation. Mol. Cell *47*, 203–214.

Chevalier, X., Conrozier, T., and Richette, P. (2011). Desperately looking for the right target in osteoarthritis: the anti-IL-1 strategy. Arthritis Res. Ther. *13*, 124.

Chiang, Y.-C., Lin, H.-W., Chang, C.-F., Chang, M.-C., Fu, C.-F., Chen, T.-C., Hsieh, S.-F., Chen, C.-A., and Cheng, W.-F. (2015). Overexpression of CHI3L1 is associated with chemoresistance and poor outcome of epithelial ovarian carcinoma. Oncotarget *6*, 39740–39755.

Chicas, A., Wang, X., Zhang, C., McCurrach, M., Zhao, Z., Mert, O., Dickins, R.A., Narita, M., Zhang, M., and Lowe, S.W. (2010). Dissecting the Unique Role of the Retinoblastoma Tumor Suppressor during Cellular Senescence. Cancer Cell *17*, 376–387.

Childs, B.G., Baker, D.J., Wijshake, T., Conover, C.A., Campisi, J., and van Deursen, J.M. (2016). Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. Science *354*, 472–477.

Childs, B.G., Gluscevic, M., Baker, D.J., Laberge, R.-M., Marquess, D., Dananberg, J., and van Deursen, J.M. (2017a). Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. Nat. Rev. Drug Discov. *16*, 718–735.

Childs, B.G., Gluscevic, M., Baker, D.J., Laberge, R.-M., Marquess, D., Dananberg, J., and van Deursen, J.M. (2017b). Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. Nat. Rev. Drug Discov. *16*, 718–735.

Chinta, S.J., Woods, G., Demaria, M., Rane, A., Zou, Y., McQuade, A., Rajagopalan, S., Limbad, C., Madden, D.T., Campisi, J., et al. (2018). Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease. Cell Rep. *22*, 930–940.

Chupp, G.L., Lee, C.G., Jarjour, N., Shim, Y.M., Holm, C.T., He, S., Dziura, J.D., Reed, J., Coyle, A.J., Kiener, P., et al. (2007). A Chitinase-like Protein in the Lung and Circulation of Patients with Severe Asthma.

Cintin, C., Johansen, J.S., Christensen, I.J., Price, P.A., Sørensen, S., and Nielsen, H.J. (1999). Serum YKL-40 and colorectal cancer. Br. J. Cancer *79*, 1494–1499.

Coffman, F.D. (2008). Chitinase 3-Like-1 (CHI3L1): A Putative Disease Marker at the Interface of Proteomics and Glycomics. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. *45*, 531–562.

Cohen, N., Shani, O., Raz, Y., Sharon, Y., Hoffman, D., Abramovitz, L., and Erez, N. (2017). Fibroblasts drive an immunosuppressive and growth-promoting microenvironment in breast cancer via secretion of Chitinase 3-like 1. Oncogene *36*, 4457–4468.

Cohen, S.B., Proudman, S., Kivitz, A.J., Burch, F.X., Donohue, J.P., Burstein, D., Sun, Y.-N., Banfield, C., Vincent, M.S., Ni, L., et al. (2011). A randomized, double-blind study of AMG 108 (a fully human monoclonal antibody to IL-1R1) in patients with osteoarthritis of the knee. Arthritis Res. Ther. *13*, R125.

Collado, M., and Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. Nat. Rev. Cancer *10*, 51–57.

Conboy, I.M., Conboy, M.J., Wagers, A.J., Girma, E.R., Weissman, I.L., and Rando, T.A. (2005). Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. Nature *433*, 760–764.

Cooke, H.J., and Smith, B.A. (1986). Variability at the telomeres of the human X/Y pseudoautosomal region. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *51 Pt 1*, 213–219.

Coppé, J.-P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. PLOS Biol. *6*, e301.

Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. Annu. Rev. Pathol. *5*, 99–118.

Coutinho, H.D.M., Falcão-Silva, V.S., Gonçalves, G.F., and da Nóbrega, R.B. (2009). Molecular ageing in progeroid syndromes: Hutchinson-Gilford progeria syndrome as a model. Immun. Ageing *6*, 4.

Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., et al. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. Cell Stem Cell *3*, 301–313.

Criscione, S.W., Teo, Y.V., and Neretti, N. (2016). The Chromatin Landscape of Cellular Senescence. Trends Genet. TIG *32*, 751–761.

Cross, M., Smith, E., Hoy, D., Nolte, S., Ackerman, I., Fransen, M., Bridgett, L., Williams, S., Guillemin, F., Hill, C.L., et al. (2014). The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. Ann. Rheum. Dis. *73*, 1323–1330.

Cruz, C.S.D., Liu, W., He, C.H., Jacoby, A., Gornitzky, A., Ma, B., Flavell, R., Lee, C.G., and Elias, J.A. (2012). Chitinase 3-like-1 Promotes Streptococcus pneumoniae Killing and Augments Host Tolerance to Lung Antibacterial Responses. Cell Host Microbe *12*, 34–46.

Darr, C., Krafft, U., Hadaschik, B., Tschirdewahn, S., Sevcenco, S., Csizmarik, A., Nyirady, P., Küronya, Z., Reis, H., Maj-Hes, A., et al. (2018). The Role of YKL-40 in Predicting Resistance to Docetaxel Chemotherapy in Prostate Cancer. Urol. Int. *101*, 65–73.

De Ceuninck, F., Pastoureau, P., Bouet, F., Bonnet, J., and Vanhoutte, P.M. (1998). Purification of guinea pig YKL40 and modulation of its secretion by cultured articular chondrocytes. J. Cell. Biochem. *69*, 414–424.

De Ceuninck, F., Gaufillier, S., Bonnaud, A., Sabatini, M., Lesur, C., and Pastoureau, P. (2001). YKL-40 (cartilage gp-39) induces proliferative events in cultured chondrocytes and synoviocytes and increases glycosaminoglycan synthesis in chondrocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. *285*, 926–931.

Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S.A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J.R., Laberge, R.-M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dollé, M.E.T., et al. (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. Dev. Cell *31*, 722–733.

Di, G.-H., Liu, Y., Lu, Y., Liu, J., Wu, C., and Duan, H.-F. (2014). IL-6 secreted from senescent mesenchymal stem cells promotes proliferation and migration of breast cancer cells. PloS One *9*, e113572.

Di Rosa, M., Szychlinska, M.A., Tibullo, D., Malaguarnera, L., and Musumeci, G. (2014a). Expression of CHI3L1 and CHIT1 in Osteoarthritic Rat Cartilage Model. A Morphological Study. Eur. J. Histochem. EJH *58*.

Di Rosa, M., Tibullo, D., Vecchio, M., Nunnari, G., Saccone, S., Di Raimondo, F., and Malaguarnera, L. (2014b). Determination of chitinases family during osteoclastogenesis. Bone *61*, 55–63.

Diarra, D., Stolina, M., Polzer, K., Zwerina, J., Ominsky, M.S., Dwyer, D., Korb, A., Smolen, J., Hoffmann, M., Scheinecker, C., et al. (2007). Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. Nat. Med. *13*, 156.

Diekman, B.O., Sessions, G.A., Collins, J.A., Knecht, A.K., Strum, S.L., Mitin, N.K., Carlson, C.S., Loeser, R.F., and Sharpless, N.E. (2018). Expression of p16INK4a is a biomarker of chondrocyte aging but does not cause osteoarthritis. Aging Cell *17*, e12771.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy *8*, 315–317.

Donell, S. (2019). Subchondral bone remodelling in osteoarthritis. EFORT Open Rev. *4*, 221–229.

Du, W., Li, X., Chi, Y., Ma, F., Li, Z., Yang, S., Song, B., Cui, J., Ma, T., Li, J., et al. (2016). VCAM-1+ placenta chorionic villi-derived mesenchymal stem cells display potent pro-angiogenic activity. Stem Cell Res. Ther. *7*.

Ebeling, A. A TEN YEAR OLD STRAIN OF FIBROBLASTS. - PubMed - NCBI.

Ebendal, T. (1992). Function and evolution in the NGF family and its receptors. J. Neurosci. Res. *32*, 461–470.

El-Galaly, T.C., Bilgrau, A.E., Gaarsdal, E., Klausen, T.W., Pedersen, L.M., Nielsen, K.R., Bæch, J., Bøgsted, M., Dybkær, K., Johansen, J.S., et al. (2015). Circulating tumor necrosis factor-α and YKL-40 level is associated with remission status following salvage therapy in relapsed non-Hodgkin lymphoma. Leuk. Lymphoma *56*, 2476–2478.

Engsig, M.T., Chen, Q.-J., Vu, T.H., Pedersen, A.-C., Therkidsen, B., Lund, L.R., Henriksen, K., Lenhard, T., Foged, N.T., Werb, Z., et al. (2000). Matrix Metalloproteinase 9 and Vascular

Endothelial Growth Factor Are Essential for Osteoclast Recruitment into Developing Long Bones. J. Cell Biol. *151*, 879–890.

Erdman, L.K., Petes, C., Lu, Z., Dhabangi, A., Musoke, C., Cserti-Gazdewich, C.M., Lee, C.G., Liles, W.C., Elias, J.A., and Kain, K.C. (2014). Chitinase 3-like 1 is induced by Plasmodium falciparum malaria and predicts outcome of cerebral malaria and severe malarial anaemia in a case–control study of African children. Malar. J. *13*, 279.

Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (2001). Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA J. Am. Med. Assoc. *285*, 2486–2497.

d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. Nature *426*, 194–198.

Faibish, M., Francescone, R., Bentley, B., Yan, W., and Shao, R. (2011). A YKL-40 neutralizing antibody blocks tumor angiogenesis and progression: a potential therapeutic agent in cancers. Mol. Cancer Ther. *10*, 742–751.

Fan, M., Chen, W., Liu, W., Du, G.-Q., Jiang, S.-L., Tian, W.-C., Sun, L., Li, R.-K., and Tian, H. (2010). The Effect of Age on the Efficacy of Human Mesenchymal Stem Cell Transplantation after a Myocardial Infarction. Rejuvenation Res. *13*, 429–438.

Farr, J.N., Xu, M., Weivoda, M.M., Monroe, D.G., Fraser, D.G., Onken, J.L., Negley, B.A., Sfeir, J.G., Ogrodnik, M.B., Hachfeld, C.M., et al. (2017). Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice. Nat. Med. *23*, 1072–1079.

Felson, D.T., Zhang, Y., Hannan, M.T., Naimark, A., Weissman, B.N., Aliabadi, P., and Levy, D. (1995). The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. Arthritis Rheum. *38*, 1500–1505.

Fivenson, E.M., Lautrup, S., Sun, N., Scheibye-Knudsen, M., Stevnsner, T., Nilsen, H., Bohr, V.A., and Fang, E.F. (2017). Mitophagy in neurodegeneration and aging. Neurochem. Int. *109*, 202–209.

Franceschi, C., Garagnani, P., Vitale, G., Capri, M., and Salvioli, S. (2017). Inflammaging and 'Garb-aging.' Trends Endocrinol. Metab. *28*, 199–212.

Francescone, R.A., Scully, S., Faibish, M., Taylor, S.L., Oh, D., Moral, L., Yan, W., Bentley, B., and Shao, R. (2011). Role of YKL-40 in the Angiogenesis, Radioresistance, and Progression of Glioblastoma. J. Biol. Chem. *286*, 15332–15343.

Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., and Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet. *3*, 393–403.

Fu, X., Liu, G., Halim, A., Ju, Y., Luo, Q., and Song, G. (2019). Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. Cells *8*, 784.

Fukiage, K., Aoyama, T., Shibata, K.R., Otsuka, S., Furu, M., Kohno, Y., Ito, K., Jin, Y., Fujita, S., Fujibayashi, S., et al. (2008). Expression of vascular cell adhesion molecule-1 indicates the

differentiation potential of human bone marrow stromal cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *365*, 406–412.

Funkhouser, J.D., and Aronson, N.N. (2007). Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. BMC Evol. Biol. *7*, 96.

Furuhashi, K., Suda, T., Nakamura, Y., Inui, N., Hashimoto, D., Miwa, S., Hayakawa, H., Kusagaya, H., Nakano, Y., Nakamura, H., et al. (2010). Increased expression of YKL-40, a chitinase-like protein, in serum and lung of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Respir. Med. *104*, 1204–1210.

Fusetti, F., Pijning, T., Kalk, K.H., Bos, E., and Dijkstra, B.W. (2003). Crystal Structure and Carbohydrate-binding Properties of the Human Cartilage Glycoprotein-39. J. Biol. Chem. *278*, 37753–37760.

Gao, N., and Yu, F.-S.X. (2015). Chitinase 3-Like 1 Promotes Candida albicans Killing and Preserves Corneal Structure and Function by Controlling Host Antifungal Responses. Infect. Immun. *83*, 4154–4164.

García-Prat, L., Martínez-Vicente, M., Perdiguero, E., Ortet, L., Rodríguez-Ubreva, J., Rebollo, E., Ruiz-Bonilla, V., Gutarra, S., Ballestar, E., Serrano, A.L., et al. (2016). Autophagy maintains stemness by preventing senescence. Nature *529*, 37–42.

Gil, J., and Peters, G. (2006). Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *7*, 667–677.

Glück, S., Guey, B., Gulen, M.F., Wolter, K., Kang, T.-W., Schmacke, N.A., Bridgeman, A., Rehwinkel, J., Zender, L., and Ablasser, A. (2017). Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. Nat. Cell Biol. *19*, 1061–1070.

Goldring, M.B., and Goldring, S.R. (2010). Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1192*, 230–237.

Goldring, S.R., and Goldring, M.B. (2007). Eating bone or adding it: the Wnt pathway decides. Nat. Med. *13*, 133.

Gomez, J.L., Crisafi, G.M., Holm, C.T., Meyers, D.A., Hawkins, G.A., Bleecker, E.R., Jarjour, N., Cohn, L., and Chupp, G.L. (2015). Genetic Variation in CHI3L1 Contributes to Asthma Severity and Airway Expression of YKL-40. J. Allergy Clin. Immunol. *136*, 51-58.e10.

Gorgoulis, V.G., and Halazonetis, T.D. (2010). Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response. Curr. Opin. Cell Biol. *22*, 816–827.

Guan, J., Liu, Z., Li, F., Feng, J.-S., Wang, H.-J., Chu, J.-G., Song, Y.-Z., Xie, L., and Ding, L.-B. (2015). Increased Synovial Fluid YKL-40 Levels are Linked with Symptomatic Severity in Knee Osteoarthritis Patients. Clin. Lab. *61*, 991–997.

Guan, Y., Wang, S.-R., Huang, X.-Z., Xie, Q.-H., Xu, Y.-Y., Shang, D., and Hao, C.-M. (2017). Nicotinamide Mononucleotide, an NAD+ Precursor, Rescues Age-Associated Susceptibility to AKI in a Sirtuin 1-Dependent Manner. J. Am. Soc. Nephrol. JASN *28*, 2337–2352.

Guerra, S., Melén, E., Sunyer, J., Xu, C.-J., Lavi, I., Benet, M., Bustamante, M., Carsin, A.-E., Dobaño, C., Guxens, M., et al. (2018). Genetic and epigenetic regulation of YKL-40 in childhood. J. Allergy Clin. Immunol. *141*, 1105–1114.

Guimarães-Camboa, N., Cattaneo, P., Sun, Y., Moore-Morris, T., Gu, Y., Dalton, N.D., Rockenstein, E., Masliah, E., Peterson, K.L., Stallcup, W.B., et al. (2017). Pericytes of Multiple Organs Do Not Behave as Mesenchymal Stem Cells In Vivo. Cell Stem Cell *20*, 345-359.e5.

Haddad, R., and Saldanha-Araujo, F. (2014). Mechanisms of T-Cell Immunosuppression by Mesenchymal Stromal Cells: What Do We Know So Far? BioMed Res. Int. *2014*.

Hannon, G.J., and Beach, D. (1994). pl5 INK4B is a potentia| effector of TGF-β-induced cell cycle arrest. Nature *371*, 257.

Harhouri, K., Kebir, A., Guillet, B., Foucault-Bertaud, A., Voytenko, S., Piercecchi-Marti, M.-D., Berenguer, C., Lamy, E., Vely, F., Pisano, P., et al. (2010). Soluble CD146 displays angiogenic properties and promotes neovascularization in experimental hind-limb ischemia. Blood *115*, 3843–3851.

Harkness, L., Zaher, W., Ditzel, N., Isa, A., and Kassem, M. (2016). CD146/MCAM defines functionality of human bone marrow stromal stem cell populations. Stem Cell Res. Ther. *7*.

Hawker, G.A., Stewart, L., French, M.R., Cibere, J., Jordan, J.M., March, L., Suarez-Almazor, M., and Gooberman-Hill, R. (2008). Understanding the pain experience in hip and knee osteoarthritis--an OARSI/OMERACT initiative. Osteoarthritis Cartilage *16*, 415–422.

Hayashi, D., Roemer, F.W., and Guermazi, A. (2016). Imaging for osteoarthritis. Ann. Phys. Rehabil. Med. *59*, 161–169.

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

He, S., and Sharpless, N.E. (2017a). Senescence in Health and Disease. Cell *169*, 1000–1011.

He, S., and Sharpless, N.E. (2017b). Senescence in Health and Disease. Cell *169*, 1000–1011.

He, C.H., Lee, C.G., Dela Cruz, C.S., Lee, C.-M., Zhou, Y., Ahangari, F., Ma, B., Herzog, E.L., Rosenberg, S.A., Li, Y., et al. (2013). Chitinase 3-like 1 Regulates Cellular and Tissue Responses via IL-13 Receptor α2. Cell Rep. *4*, 830–841.

Helman, A., Klochendler, A., Azazmeh, N., Gabai, Y., Horwitz, E., Anzi, S., Swisa, A., Condiotti, R., Granit, R.Z., Nevo, Y., et al. (2016). p16(Ink4a)-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin secretion. Nat. Med. *22*, 412–420.

Herbert, K.E., Mistry, Y., Hastings, R., Poolman, T., Niklason, L., and Williams, B. (2008). Angiotensin II-mediated oxidative DNA damage accelerates cellular senescence in cultured human vascular smooth muscle cells via telomere-dependent and independent pathways. Circ. Res. *102*, 201–208.

Hermida-Gómez, T., Fuentes-Boquete, I., Gimeno-Longas, M.J., Muiños-López, E., Díaz-Prado, S., de Toro, F.J., and Blanco, F.J. (2010). Bone Marrow Cells Immunomagnetically Selected For CD271+ Antigen Promote In Vitro the Repair of Articular Cartilage Defects. Tissue Eng. Part A *17*, 1169–1179.

Hermida-Gómez, T., Fuentes-Boquete, I., Gimeno-Longas, M.J., Muiños-López, E., Díaz-Prado, S., de Toro, F.J., and Blanco, F.J. (2011). Quantification of cells expressing mesenchymal stem cell markers in healthy and osteoarthritic synovial membranes. J. Rheumatol. *38*, 339–349.

Hernandez-Segura, A., Nehme, J., and Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. Trends Cell Biol. *28*, 436–453.

Hirosue, A., Ishihara, K., Tokunaga, K., Watanabe, T., Saitoh, N., Nakamoto, M., Chandra, T., Narita, M., Shinohara, M., and Nakao, M. (2012). Quantitative assessment of higher-order chromatin structure of the INK4/ARF locus in human senescent cells. Aging Cell *11*, 553–556.

Hoare, M., Ito, Y., Kang, T.-W., Weekes, M.P., Matheson, N.J., Patten, D.A., Shetty, S., Parry, A.J., Menon, S., Salama, R., et al. (2016). NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. Nat. Cell Biol. *18*, 979–992.

Høgdall, E.V.S., Ringsholt, M., Høgdall, C.K., Christensen, I.J., Johansen, J.S., Kjaer, S.K., Blaakaer, J., Ostenfeld-Møller, L., Price, P.A., and Christensen, L.H. (2009). YKL-40 tissue expression and plasma levels in patients with ovarian cancer. BMC Cancer *9*, 8.

http://ir.unitybiotechnology.com/news-releases/news-release-details/unity-biotechnology-inc-announces-plan-phase-2-clinical-study UNITY Biotechnology, Inc. Announces Plan for Phase 2 Clinical Study of UBX0101 in Osteoarthritis of the Knee.

https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03176628 Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Safety of Basis in Acute Kidney Injury Study - Full Text View - ClinicalTrials.gov.

https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03310034 NAD Supplementation Study - Full Text View - ClinicalTrials.gov.

https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03754842 Effect of Nicotinamide Riboside and Pterostilbene Supplementation on Muscle Regeneration in Elderly Humans - Full Text View - ClinicalTrials.gov.

http://www.cazy.org/GH18.html CAZy - GH18.

Huang, G.T.-J., Gronthos, S., and Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. J. Dent. Res. *88*, 792–806.

Huang, Y.-H., Yang, P.-M., Chuah, Q.-Y., Lee, Y.-J., Hsieh, Y.-F., Peng, C.-W., and Chiu, S.-J. (2014). Autophagy promotes radiation-induced senescence but inhibits bystander effects in human breast cancer cells. Autophagy *10*, 1212–1228.

Iannello, A., Thompson, T.W., Ardolino, M., Lowe, S.W., and Raulet, D.H. (2013). p53-dependent chemokine production by senescent tumor cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells. J. Exp. Med. *210*, 2057–2069.

Isern, J., García-García, A., Martín, A.M., Arranz, L., Martín-Pérez, D., Torroja, C., Sánchez-Cabo, F., and Méndez-Ferrer, S. (2014). The neural crest is a source of mesenchymal stem cells with specialized hematopoietic stem cell niche function. ELife *3*.

Ivanov, A., Pawlikowski, J., Manoharan, I., van Tuyn, J., Nelson, D.M., Rai, T.S., Shah, P.P., Hewitt, G., Korolchuk, V.I., Passos, J.F., et al. (2013). Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. J. Cell Biol. *202*, 129–143.

Jacques, C., Recklies, A.D., Levy, A., and Berenbaum, F. (2007). HC-gp39 contributes to chondrocyte differentiation by inducing SOX9 and type II collagen expressions. Osteoarthritis Cartilage *15*, 138–146.

James, A.J., Reinius, L.E., Verhoek, M., Gomes, A., Kupczyk, M., Hammar, U., Ono, J., Ohta, S., Izuhara, K., Bel, E., et al. (2016). Increased YKL-40 and Chitotriosidase in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *193*, 131–142.

Jefri, M., Huang, Y.-N., Huang, W.-C., Tai, C.-S., and Chen, W.-L. (2015). YKL-40 regulated epithelial-mesenchymal transition and migration/invasion enhancement in non-small cell lung cancer. BMC Cancer *15*.

Jeon, O.H., Kim, C., Laberge, R.-M., Demaria, M., Rathod, S., Vasserot, A.P., Chung, J.W., Kim, D.H., Poon, Y., David, N., et al. (2017a). Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. Nat. Med. *23*, 775–781.

Jeon, O.H., Kim, C., Laberge, R.-M., Demaria, M., Rathod, S., Vasserot, A.P., Chung, J.W., Kim, D.H., Poon, Y., David, N., et al. (2017b). Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. Nat. Med. *23*, 775–781.

Johansen, J.S. (2006). Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer. Dan. Med. Bull. *53*, 172–209.

Johansen, J.S., Williamson, M.K., Rice, J.S., and Price, P.A. (1992). Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. J. Bone Miner. Res. *7*, 501–512.

Johansen, J.S., Jensen, H.S., and Price, P.A. (1993). A new biochemical marker for joint injury. Analysis of YKL-40 in serum and synovial fluid. Br. J. Rheumatol. *32*, 949–955.

Johansen, J.S., Møller, S., Price, P.A., Bendtsen, F., Junge, J., Garbarsch, C., and Henriksen, J.H. (1997). Plasma YKL-40: a new potential marker of fibrosis in patients with alcoholic cirrhosis? Scand. J. Gastroenterol. *32*, 582–590.

Johansen, J.S., Stoltenberg, M., Hansen, M., Florescu, A., Hørslev-Petersen, K., Lorenzen, I., and Price, P.A. (1999). Serum YKL-40 concentrations in patients with rheumatoid arthritis: relation to disease activity. Rheumatology *38*, 618–626.

Johansen, J.S., Olee, T., Price, P.A., Hashimoto, S., Ochs, R.L., and Lotz, M. (2001). Regulation of YKL-40 production by human articular chondrocytes. Arthritis Rheum. *44*, 826–837.

Johansen, J.S., Pedersen, A.N., Schroll, M., Jørgensen, T., Pedersen, B.K., and Bruunsgaard, H. (2008). High serum YKL-40 level in a cohort of octogenarians is associated with increased risk of all-cause mortality. Clin. Exp. Immunol. *151*, 260–266.

Johnson, V.L., and Hunter, D.J. (2014). The epidemiology of osteoarthritis. Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. *28*, 5–15.

Kaeberlein, M., McVey, M., and Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in Saccharomyces cerevisiae by two different mechanisms. Genes Dev. *13*, 2570–2580.

Kang, C., and Elledge, S.J. (2016). How autophagy both activates and inhibits cellular senescence. Autophagy *12*, 898–899.

Karalilova, R., Kazakova, M., Batalov, A., and Sarafian, V. (2018). Correlation between protein YKL-40 and ultrasonographic findings in active knee osteoarthritis. Med. Ultrason. *20*, 57–63.

Kawada, M., Seno, H., Kanda, K., Nakanishi, Y., Akitake, R., Komekado, H., Kawada, K., Sakai, Y., Mizoguchi, E., and Chiba, T. (2012). Chitinase 3-like 1 promotes macrophage recruitment and angiogenesis in colorectal cancer. Oncogene *31*, 3111–3123.

Kennedy, B.K., Austriaco, N.R., Zhang, J., and Guarente, L. (1995). Mutation in the silencing gene SIR4 can delay aging in S. cerevisiae. Cell *80*, 485–496.

Khanh et al. (2018). Aging impairs beige adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells via the reduced expression of Sirtuin 1. Biochem. Biophys. Res. Commun. *500*, 682–690.

Kim, W.Y., and Sharpless, N.E. (2006). The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. Cell *127*, 265–275.

Kim, C., Nevitt, M.C., Niu, J., Clancy, M.M., Lane, N.E., Link, T.M., Vlad, S., Tolstykh, I., Jungmann, P.M., Felson, D.T., et al. (2015). Association of hip pain with radiographic evidence of hip osteoarthritis: diagnostic test study. BMJ *351*, h5983.

Kim, K.C., Yun, J., Son, D.J., Kim, J.Y., Jung, J.-K., Choi, J.S., Kim, Y.R., Song, J.K., Kim, S.Y., Kang, S.K., et al. (2018a). Suppression of metastasis through inhibition of chitinase 3-like 1 expression by miR-125a-3p-mediated up-regulation of USF1. Theranostics *8*, 4409–4428.

Kim, K.M., Noh, J.H., Bodogai, M., Martindale, J.L., Yang, X., Indig, F.E., Basu, S.K., Ohnuma, K., Morimoto, C., Johnson, P.F., et al. (2017). Identification of senescent cell surface targetable protein DPP4. Genes Dev. *31*, 1529–1534.

Kim, K.M., Noh, J.H., Bodogai, M., Martindale, J.L., Pandey, P.R., Yang, X., Biragyn, A., Abdelmohsen, K., and Gorospe, M. (2018b). SCAMP4 enhances the senescent cell secretome. Genes Dev. *32*, 909–914.

Kjaergaard, A.D., Nordestgaard, B.G., Johansen, J.S., and Bojesen, S.E. (2015). Observational and genetic plasma YKL-40 and cancer in 96,099 individuals from the general population. Int. J. Cancer *137*, 2696–2704.

Kozlowska, U., Krawczenko, A., Futoma, K., Jurek, T., Rorat, M., Patrzalek, D., and Klimczak, A. (2019). Similarities and differences between mesenchymal stem/progenitor cells derived from various human tissues. World J. Stem Cells *11*, 347–374.

Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M.R., Kovalev, G.I., Al-Regaiey, K., Su, L., and Sharpless, N.E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. J. Clin. Invest. *114*, 1299–1307.

Krishnan, Y., and Grodzinsky, A.J. (2018). Cartilage diseases. Matrix Biol. *71–72*, 51–69.

Kuçi, S., Kuçi, Z., Kreyenberg, H., Deak, E., Pütsch, K., Huenecke, S., Amara, C., Koller, S., Rettinger, E., Grez, M., et al. (2010). CD271 antigen defines a subset of multipotent stromal cells with immunosuppressive and lymphohematopoietic engraftment-promoting properties. Haematologica *95*, 651–659.

Kuepper et al. (2008). Chitinase-like Protein and Asthma. N. Engl. J. Med. *358*, 1073–1075.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C.J., Aarden, L.A., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. Cell *133*, 1019–1031.

Kujoth, G.C., Hiona, A., Pugh, T.D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S.E., Hofer, T., Seo, A.Y., Sullivan, R., Jobling, W.A., et al. (2005). Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. Science *309*, 481–484.

Kunz, L.I.Z., van't Wout, E.F.A., van Schadewijk, A., Postma, D.S., Kerstjens, H.A.M., Sterk, P.J., and Hiemstra, P.S. (2015). Regulation of YKL-40 expression by corticosteroids: effect on pro-inflammatory macrophages in vitro and its modulation in COPD in vivo. Respir. Res. *16*.

Kwon, J.-W., Kim, T.-W., Cho, S.-H., Min, K.-U., and Park, H.-W. (2011). Serum YKL-40 levels are correlated with symptom severity in patients with allergic rhinitis. Allergy *66*, 1252–1253.

Lai, T., Chen, M., Deng, Z., Lǔ, Y., Wu, D., Li, D., and Wu, B. (2015). YKL-40 is correlated with FEV1 and the asthma control test (ACT) in asthmatic patients: influence of treatment. BMC Pulm. Med. *15*.

Lange, T. de (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. Genes Dev. *19*, 2100–2110.

Lawrence, R.C., Felson, D.T., Helmick, C.G., Arnold, L.M., Choi, H., Deyo, R.A., Gabriel, S., Hirsch, R., Hochberg, M.C., Hunder, G.G., et al. (2008). Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. Arthritis Rheum. *58*, 26–35.

Le Pen, C., Reygrobellet, C., and Gérentes, I. (2005). Financial cost of osteoarthritis in France: The "COART"11Study on the "COûts de l'ARThrose", or the costs engendered by Arthritis, in France, on the initiative of Laboratoires NEGMA-LERADS. France study. Joint Bone Spine *72*, 567–570.

Lee, C.-M., He, C.H., Nour, A.M., Zhou, Y., Ma, B., Park, J.W., Kim, K.H., Cruz, C.D., Sharma, L., Nasr, M.L., et al. (2016). IL-13Rα2 uses TMEM219 in chitinase 3-like-1-induced signalling and effector responses. Nat. Commun. *7*.

Leijten, J.C.H., Emons, J., Sticht, C., van Gool, S., Decker, E., Uitterlinden, A., Rappold, G., Hofman, A., Rivadeneira, F., Scherjon, S., et al. (2012). Gremlin 1, frizzled-related protein,

and Dkk-1 are key regulators of human articular cartilage homeostasis. Arthritis Rheum. *64*, 3302–3312.

Lenaers, G., Amati-Bonneau, P., Delettre, C., Chevrollier, A., Verny, C., Miléa, D., Procaccio, V., Bonneau, D., Hamel, C., and Reynier, P. (2010). De la levure aux maladies neurodégénératives - Dix ans d'exploration des pathologies de la dynamique mitochondriale. médecine/sciences *26*, 836–841.

Lesina, M., Wörmann, S.M., Morton, J., Diakopoulos, K.N., Korneeva, O., Wimmer, M., Einwächter, H., Sperveslage, J., Demir, I.E., Kehl, T., et al. (2016). RelA regulates CXCL1/CXCR2-dependent oncogene-induced senescence in murine Kras-driven pancreatic carcinogenesis. J. Clin. Invest. *126*, 2919–2932.

Létuvé, S., Kozhich, A., Arouche, N., Grandsaigne, M., Reed, J., Dombret, M.-C., Kiener, P.A., Aubier, M., Coyle, A.J., and Pretolani, M. (2008). YKL-40 is elevated in patients with chronic obstructive pulmonary disease and activates alveolar macrophages. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *181*, 5167–5173.

Li, N., and Hua, J. (2017). Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. Cell. Mol. Life Sci. *74*, 2345–2360.

Li, H., Yang, H.H., Sun, Z.G., Tang, H.B., and Min, J.K. (2019a). Whole-transcriptome sequencing of knee joint cartilage from osteoarthritis patients. Bone Jt. Res. *8*, 288–301.

Li, X., Guo, W., Zha, K., Jing, X., Wang, M., Zhang, Y., Hao, C., Gao, S., Chen, M., Yuan, Z., et al. (2019b). Enrichment of CD146+ Adipose-Derived Stem Cells in Combination with Articular

Cartilage Extracellular Matrix Scaffold Promotes Cartilage Regeneration. Theranostics *9*, 5105–5121.

Lin, H.-W., Chiang, Y.-C., Sun, N.-Y., Chen, Y.-L., Chang, C.-F., Tai, Y.-J., Chen, C.-A., and Cheng, W.-F. (2019a). CHI3L1 results in poor outcome of ovarian cancer by promoting properties of stem-like cells. Endocr. Relat. Cancer *26*, 73–88.

Lin, H.-W., Chiang, Y.-C., Sun, N.-Y., Chen, Y.-L., Chang, C.-F., Tai, Y.-J., Chen, C.-A., and Cheng, W.-F. (2019b). CHI3L1 results in poor outcome of ovarian cancer by promoting properties of stem-like cells. Endocr. Relat. Cancer *26*, 73–88.

Liu et al. (2019). Aging | A large-scale CRISPR screen and identification of essential genes in cellular senescence bypass - Full Text.

Loeser, R.F. (2009). Aging and Osteoarthritis: The Role of Chondrocyte Senescence and Aging Changes in the Cartilage Matrix. Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc. *17*, 971–979.

López-Soto, A., Huergo-Zapico, L., Acebes-Huerta, A., Villa-Alvarez, M., and Gonzalez, S. (2015). NKG2D signaling in cancer immunosurveillance. Int. J. Cancer *136*, 1741–1750.

Lorenz, H., Wenz, W., Ivancic, M., Steck, E., and Richter, W. (2005). Early and stable upregulation of collagen type II, collagen type I and YKL40 expression levels in cartilage during early experimental osteoarthritis occurs independent of joint location and histological grading. Arthritis Res. Ther. *7*, R156–R165.

Lorger, M., Krueger, J.S., O'Neal, M., Staflin, K., and Felding-Habermann, B. (2009). Activation of tumor cell integrin alphavbeta3 controls angiogenesis and metastatic growth in the brain. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 10666–10671.

Lossaint, G., Besnard, E., Fisher, D., Piette, J., and Dulić, V. (2011). Chk1 is dispensable for G2 arrest in response to sustained DNA damage when the ATM/p53/p21 pathway is functional. Oncogene *30*, 4261–4274.

Lv, F.-J., Tuan, R.S., Cheung, K.M.C., and Leung, V.Y.L. (2014). Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. STEM CELLS *32*, 1408–1419.

Ma, B., Herzog, E.L., Lee, C.G., Peng, X., Lee, C.-M., Chen, X., Rockwell, S., Koo, J.S., Kluger, H., Herbst, R.S., et al. (2015). Role of Chitinase 3-like-1 and Semaphorin 7a in Pulmonary Melanoma Metastasis. Cancer Res. *75*, 487–496.

Madry, H., van Dijk, C.N., and Mueller-Gerbl, M. (2010). The basic science of the subchondral bone. Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. Off. J. ESSKA *18*, 419–433.

Maegdefessel, L., Spin, J.M., Raaz, U., Eken, S.M., Toh, R., Azuma, J., Adam, M., Nakagami, F., Nagakami, F., Heymann, H.M., et al. (2014). miR-24 limits aortic vascular inflammation and murine abdominal aneurysm development. Nat. Commun. *5*, 5214.

Maijenburg, M.W., Kleijer, M., Vermeul, K., Mul, E.P.J., van Alphen, F.P.J., van der Schoot, C.E., and Voermans, C. (2012). The composition of the mesenchymal stromal cell compartment in human bone marrow changes during development and aging. Haematologica *97*, 179–183.

Mansilla, E., Díaz Aquino, V., Zambón, D., Marin, G.H., Mártire, K., Roque, G., Ichim, T., Riordan, N.H., Patel, A., Sturla, F., et al. (2011). Could Metabolic Syndrome, Lipodystrophy, and Aging Be Mesenchymal Stem Cell Exhaustion Syndromes?

Mareschi, K., Ferrero, I., Rustichelli, D., Aschero, S., Gammaitoni, L., Aglietta, M., Madon, E., and Fagioli, F. (2006). Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. J. Cell. Biochem. *97*, 744–754.

Martel-Pelletier, J., Barr, A.J., Cicuttini, F.M., Conaghan, P.G., Cooper, C., Goldring, M.B., Goldring, S.R., Jones, G., Teichtahl, A.J., and Pelletier, J.-P. (2016). Osteoarthritis. Nat. Rev. Dis. Primer *2*, 16072.

Martin, J.A., and Buckwalter, J.A. (2001). Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. *56*, B172-179.

Martin, J.A., and Buckwalter, J.A. (2002). Human chondrocyte senescence and osteoarthritis. Biorheology *39*, 145–152.

Maumus, M., Manferdini, C., Toupet, K., Peyrafitte, J.-A., Ferreira, R., Facchini, A., Gabusi, E., Bourin, P., Jorgensen, C., Lisignoli, G., et al. (2013). Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis. Stem Cell Res. *11*, 834–844.

McAlindon, T.E., Bannuru, R.R., Sullivan, M.C., Arden, N.K., Berenbaum, F., Bierma-Zeinstra, S.M., Hawker, G.A., Henrotin, Y., Hunter, D.J., Kawaguchi, H., et al. (2014). OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage *22*, 363–388.

McCulloch, K., Litherland, G.J., and Rai, T.S. (2017). Cellular senescence in osteoarthritis pathology. Aging Cell *16*, 210–218.

McElligott, R., and Wellinger, R.J. (1997). The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. EMBO J. *16*, 3705–3714.

Méndez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. Nature *466*, 829–834.

Michalczyk, K., and Ziman, M. (2005). Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. Histol. Histopathol. *20*, 665–671.

Minina, E., Kreschel, C., Naski, M.C., Ornitz, D.M., and Vortkamp, A. (2002). Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. Dev. Cell *3*, 439–449.

Mostoslavsky, R., Chua, K.F., Lombard, D.B., Pang, W.W., Fischer, M.R., Gellon, L., Liu, P., Mostoslavsky, G., Franco, S., Murphy, M.M., et al. (2006). Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. Cell *124*, 315–329.

Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L., and Wu, J.R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)n, present at the telomeres of human chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *85*, 6622–6626.

Mueller, M.B., and Tuan, R.S. (2008). Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. Arthritis Rheum. *58*, 1377–1388.

Muñoz-Espín, D., and Serrano, M. (2014a). Cellular senescence: from physiology to pathology. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *15*, 482–496.

Muñoz-Espín, D., and Serrano, M. (2014b). Cellular senescence: from physiology to pathology. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *15*, 482–496.

Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., et al. (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. Cell *155*, 1104–1118.

Nacher, V., Carretero, A., Navarro, M., Armengol, C., Llombart, C., Rodríguez, A., Herrero-Fresneda, I., Ayuso, E., and Ruberte, J. (2006). The quail mesonephros: a new model for renal senescence? J. Vasc. Res. *43*, 581–586.

Narita, M., Nũnez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. Cell *113*, 703–716.

National Collaborating Centre for Chronic Conditions (UK) (2008). Osteoarthritis: National Clinical Guideline for Care and Management in Adults (London: Royal College of Physicians (UK)).

Nelson, D.M., Jaber-Hijazi, F., Cole, J.J., Robertson, N.A., Pawlikowski, J.S., Norris, K.T., Criscione, S.W., Pchelintsev, N.A., Piscitello, D., Stong, N., et al. (2016). Mapping H4K20me3 onto the chromatin landscape of senescent cells indicates a function in control of cell senescence and tumor suppression through preservation of genetic and epigenetic stability. Genome Biol. *17*, 158.

Nordenbaek, C., Johansen, J.S., Junker, P., Borregaard, N., Sørensen, O., and Price, P.A. (1999). YKL-40, a Matrix Protein of Specific Granules in Neutrophils, Is Elevated in Serum of Patients with Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization. J. Infect. Dis. *180*, 1722–1726.

Ober, C., Tan, Z., Sun, Y., Possick, J.D., Pan, L., Nicolae, R., Radford, S., Parry, R.R., Heinzmann, A., Deichmann, K.A., et al. (2008). Effect of Variation in CHI3L1 on Serum YKL-40 Level, Risk of Asthma, and Lung Function. N. Engl. J. Med. *358*, 1682–1691.

Ogata, T., Ideno, Y., Akai, M., Seichi, A., Hagino, H., Iwaya, T., Doi, T., Yamada, K., Chen, A.-Z., Li, Y., et al. (2018). Effects of glucosamine in patients with osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis. Clin. Rheumatol. *37*, 2479–2487.

Ogrodnik, M., Zhu, Y., Langhi, L.G.P., Tchkonia, T., Krüger, P., Fielder, E., Victorelli, S., Ruswhandi, R.A., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., et al. (2018). Obesity-Induced Cellular Senescence Drives Anxiety and Impairs Neurogenesis. Cell Metab.

Øiestad, B.E., Engebretsen, L., Storheim, K., and Risberg, M.A. (2009). Knee osteoarthritis after anterior cruciate ligament injury: a systematic review. Am. J. Sports Med. *37*, 1434–1443.

Olovnikov, A.M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. J. Theor. Biol. *41*, 181–190.

Orjalo, A.V., Bhaumik, D., Gengler, B.K., Scott, G.K., and Campisi, J. (2009). Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 17031–17036.

Passos, J.F., Saretzki, G., and von Zglinicki, T. (2007). DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? Nucleic Acids Res. *35*, 7505–7513.

Philipot, D., Guérit, D., Platano, D., Chuchana, P., Olivotto, E., Espinoza, F., Dorandeu, A., Pers, Y.-M., Piette, J., Borzi, R.M., et al. (2014). p16INK4a and its regulator miR-24 link senescence and chondrocyte terminal differentiation-associated matrix remodeling in osteoarthritis. Arthritis Res. Ther. *16*, R58.

Pinet, S., Bessette, B., Vedrenne, N., Lacroix, A., Richard, L., Jauberteau, M.-O., Battu, S., and Lalloué, F. (2016). TrkB-containing exosomes promote the transfer of glioblastoma aggressiveness to YKL-40-inactivated glioblastoma cells. Oncotarget *7*, 50349–50364.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science *284*, 143–147.

Pleumeekers, M.M., Nimeskern, L., Koevoet, J.L.M., Karperien, M., Stok, K.S., and van Osch, G.J.V.M. (2018). Trophic effects of adipose-tissue-derived and bone-marrow-derived mesenchymal stem cells enhance cartilage generation by chondrocytes in co-culture. PLoS ONE *13*.

Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., and Lemaitre, J.-M. (2011). p53 and p16(INK4A) independent induction of senescence by chromatin-dependent alteration of S-phase progression. Nat. Commun. *2*, 473.

Psaltis, P.J., Paton, S., See, F., Arthur, A., Martin, S., Itescu, S., Worthley, S.G., Gronthos, S., and Zannettino, A.C.W. (2010). Enrichment for STRO-1 expression enhances the cardiovascular paracrine activity of human bone marrow-derived mesenchymal cell populations. J. Cell. Physiol. *223*, 530–540.

Recklies, A.D., Ling, H., White, C., and Bernier, S.M. (2005). Inflammatory Cytokines Induce Production of CHI3L1 by Articular Chondrocytes. J. Biol. Chem. *280*, 41213–41221.

Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L'Huillier, A., Ling, W., Roberts, A.I., Le, A.D., Shi, S., Shao, C., et al. (2010). Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *184*, 2321–2328.

Rhee, D.K., Marcelino, J., Baker, M., Gong, Y., Smits, P., Lefebvre, V., Jay, G.D., Stewart, M., Wang, H., Warman, M.L., et al. (2005). The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. J. Clin. Invest. *115*, 622–631.

Roake, C.M., and Artandi, S.E. (2017). Control of Cellular Aging, Tissue Function, and Cancer by p53 Downstream of Telomeres. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *7*.

Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., and Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. Nature *434*, 113–118.

Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C.K., Hoeijmakers, W.A.M., Muñoz, D.P., Raza, S.R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A.R., and Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. Nat. Cell Biol. *11*, 973–979.

Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. J. Biol. Chem. *273*, 5858–5868.

Roslind, A., Johansen, J.S., Christensen, I.J., Kiss, K., Balslev, E., Nielsen, D.L., Bentzen, J., Price, P.A., and Andersen, E. (2008a). High serum levels of YKL-40 in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck are associated with short survival. Int. J. Cancer *122*, 857–863.

Roslind, A., Balslev, E., Kruse, H., Staergaard, B., and Horn, T. (2008b). Subcellular localization of YKL-40 in normal and malignant epithelial cells of the breast. Ultrastruct. Pathol. *32*, 101–106.

Ruscetti, M., Leibold, J., Bott, M.J., Fennell, M., Kulick, A., Salgado, N.R., Chen, C.-C., Ho, Y.-J., Sanchez-Rivera, F.J., Feucht, J., et al. (2018). NK cell-mediated cytotoxicity contributes to tumor control by a cytostatic drug combination. Science *362*, 1416–1422.

Sakellariou, G., Conaghan, P.G., Zhang, W., Bijlsma, J.W.J., Boyesen, P., D'Agostino, M.A., Doherty, M., Fodor, D., Kloppenburg, M., Miese, F., et al. (2017). EULAR recommendations for the use of imaging in the clinical management of peripheral joint osteoarthritis. Ann. Rheum. Dis. *76*, 1484–1494.

Sanchez, C., Mazzucchelli, G., Lambert, C., Comblain, F., DePauw, E., and Henrotin, Y. (2018). Comparison of secretome from osteoblasts derived from sclerotic versus non-sclerotic subchondral bone in OA: A pilot study. PLoS ONE *13*.

Scanzello, C.R., and Goldring, S.R. (2012). The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. Bone *51*, 249–257.

Schmidt, H., Johansen, J.S., Gehl, J., Geertsen, P.F., Fode, K., and von der Maase, H. (2006). Elevated serum level of YKL-40 is an independent prognostic factor for poor survival in patients with metastatic melanoma. Cancer *106*, 1130–1139.

Search of: mesenchymal stem cell - List Results - ClinicalTrials.gov Search of: mesenchymal stem cell - List Results - ClinicalTrials.gov.

Sekine, T., Masuko-Hongo, K., Matsui, T., Asahara, H., Takigawa, M., Nishioka, K., and Kato, T. (2001). Recognition of YKL-39, a human cartilage related protein, as a target antigen in patients with rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. *60*, 49–54.

Senetta, R., Duregon, E., Sonetto, C., Spadi, R., Mistrangelo, M., Racca, P., Chiusa, L., Munoz, F.H., Ricardi, U., Arezzo, A., et al. (2015). YKL-40/c-Met Expression in Rectal Cancer Biopsies Predicts Tumor Regression following Neoadjuvant Chemoradiotherapy: A Multi-Institutional Study. PLoS ONE *10*.

Shah, S., Ulm, J., Sifri, Z., Mohr, A., and Livingston, D. (2009). Mobilization of Bone Marrow Cells to the Site of Injury is Necessary for Wound Healing. J. Trauma Inj. Infect. Crit. Care *67*, 315–322.

Shao, R., Hamel, K., Petersen, L., Cao, J.Q., Arenas, R.B., Bigelow, C., Bentley, B., and Yan, W. (2009a). YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis. Oncogene *28*, 4456–4468.

Shao, R., Hamel, K., Petersen, L., Cao, Q.J., Arenas, R.B., Bigelow, C., Bentley, B., and Yan, W. (2009b). YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis. Oncogene *28*, 4456–4468.

Sharpless, N.E., and Sherr, C.J. (2015). Forging a signature of *in vivo* senescence. Nat. Rev. Cancer *15*, 397–408.

Shay, J.W., Pereira-Smith, O.M., and Wright, W.E. (1991). A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. Exp. Cell Res. *196*, 33–39.

Shostak, K., Labunskyy, V., Dmitrenko, V., Malisheva, T., Shamayev, M., Rozumenko, V., Zozulya, Y., Zehetner, G., and Kavsan, V. (2003). HC gp-39 gene is upregulated in glioblastomas. Cancer Lett. *198*, 203–210.

Siegel, G., Kluba, T., Hermanutz-Klein, U., Bieback, K., Northoff, H., and Schäfer, R. (2013). Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. BMC Med. *11*, 146.

Simmons, P.J., Masinovsky, B., Longenecker, B.M., Berenson, R., Torok-Storb, B., and Gallatin, W.M. (1992). Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. Blood *80*, 388–395.

Soriani, A., Zingoni, A., Cerboni, C., Iannitto, M.L., Ricciardi, M.R., Di Gialleonardo, V., Cippitelli, M., Fionda, C., Petrucci, M.T., Guarini, A., et al. (2009). ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. Blood *113*, 3503–3511.

Sorrentino et al. (2008). Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. Exp. Hematol. *36*, 1035–1046.

Sousa-Victor, P., Gutarra, S., García-Prat, L., Rodriguez-Ubreva, J., Ortet, L., Ruiz-Bonilla, V., Jardí, M., Ballestar, E., González, S., Serrano, A.L., et al. (2014). Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. Nature *506*, 316–321.

Spector, T.D., and MacGregor, A.J. (2004). Risk factors for osteoarthritis: genetics. Osteoarthritis Cartilage *12 Suppl A*, S39-44.

Srikanth, V.K., Fryer, J.L., Zhai, G., Winzenberg, T.M., Hosmer, D., and Jones, G. (2005). A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage *13*, 769–781.

Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M.C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J., et al. (2013). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. Cell *155*, 1119–1130.

Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. Cell *123*, 1213–1226.

Sun, N., Youle, R.J., and Finkel, T. (2016). The Mitochondrial Basis of Aging. Mol. Cell *61*, 654–666.

Sun, P., Yoshizuka, N., New, L., Moser, B.A., Li, Y., Liao, R., Xie, C., Chen, J., Deng, Q., Yamout, M., et al. (2007). PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. Cell *128*, 295–308.

Sutherland, T.E., Logan, N., Rückerl, D., Humbles, A.A., Allan, S.M., Papayannopoulos, V., Stockinger, B., Maizels, R.M., and Allen, J.E. (2014). Chitinase-like proteins promote IL-17-

mediated neutrophilia in a trade-off between nematode killing and host damage. Nat. Immunol. *15*, 1116–1125.

Tachikart, Y., Malaise, O., Mumme, M., Jorgensen, C., and Brondello, J.-M. (2019). Seno-suppressive molecules as new therapeutic perspectives in rheumatic diseases. Biochem. Pharmacol. *165*, 126–133.

Tai, H., Wang, Z., Gong, H., Han, X., Zhou, J., Wang, X., Wei, X., Ding, Y., Huang, N., Qin, J., et al. (2017). Autophagy impairment with lysosomal and mitochondrial dysfunction is an important characteristic of oxidative stress-induced senescence. Autophagy *13*, 99–113.

Tanwar, M.K., Gilbert, M.R., and Holland, E.C. (2002). Gene Expression Microarray Analysis Reveals YKL-40 to Be a Potential Serum Marker for Malignant Character in Human Glioma. Cancer Res. *62*, 4364–4368.

Terzibasi-Tozzini, E., Martinez-Nicolas, A., and Lucas-Sánchez, A. (2017). The clock is ticking. Ageing of the circadian system: From physiology to cell cycle. Semin. Cell Dev. Biol. *70*, 164–176.

Thomas, A.C., Hubbard-Turner, T., Wikstrom, E.A., and Palmieri-Smith, R.M. (2017). Epidemiology of Posttraumatic Osteoarthritis. J. Athl. Train. *52*, 491–496.

Thompson, P.J., Shah, A., Ntranos, V., Gool, F.V., Atkinson, M., and Bhushan, A. (2019). Targeted Elimination of Senescent Beta Cells Prevents Type 1 Diabetes. Cell Metab. *29*, 1045-1060.e10.

Tomita, S., Li, R.K., Weisel, R.D., Mickle, D.A., Kim, E.J., Sakai, T., and Jia, Z.Q. (1999). Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. Circulation *100*, II247-256.

Trusolino, L., and Comoglio, P.M. (2002). Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. Nat. Rev. Cancer *2*, 289–300.

Tu, C., He, J., Wu, B., Wang, W., and Li, Z. (2019). An extensive review regarding the adipokines in the pathogenesis and progression of osteoarthritis. Cytokine *113*, 1–12.

Väänänen, T., Koskinen, A., Paukkeri, E.-L., Hämäläinen, M., Moilanen, T., Moilanen, E., and Vuolteenaho, K. (2014). YKL-40 as a Novel Factor Associated with Inflammation and Catabolic Mechanisms in Osteoarthritic Joints. Mediators Inflamm. *2014*.

Väänänen, T., Vuolteenaho, K., Kautiainen, H., Nieminen, R., Möttönen, T., Hannonen, P., Korpela, M., Kauppi, M.J., Laiho, K., Kaipiainen-Seppänen, O., et al. (2017). Glycoprotein YKL-40: A potential biomarker of disease activity in rheumatoid arthritis during intensive treatment with csDMARDs and infliximab. Evidence from the randomised controlled NEO-RACo trial. PLoS ONE *12*.

Verheijden, G.F.M., Rijnders, A.W.M., Bos, E., Roo, C.J.J.C.-D., Staveren, C.J. van, Miltenburg, A.M.M., Meijerink, J.H., Elewaut, D., Keyser, F. de, Veys, E., et al. (1997). Human cartilage glycoprotein-39 as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. *40*, 1115–1125.

Vernier, M., Bourdeau, V., Gaumont-Leclerc, M.-F., Moiseeva, O., Bégin, V., Saad, F., Mes-Masson, A.-M., and Ferbeyre, G. (2011). Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. Genes Dev. *25*, 41–50.

Vicente, R., Mausset-Bonnefont, A.-L., Jorgensen, C., Louis-Plence, P., and Brondello, J.-M. (2016). Cellular senescence impact on immune cell fate and function. Aging Cell *15*, 400–406.

Wagner, W., Bork, S., Horn, P., Krunic, D., Walenda, T., Diehlmann, A., Benes, V., Blake, J., Huber, F.-X., Eckstein, V., et al. (2009). Aging and Replicative Senescence Have Related Effects on Human Stem and Progenitor Cells. PLOS ONE *4*, e5846.

Wang, W., and Han, Z.C. (2019). Heterogeneity of Human Mesenchymal Stromal/Stem Cells. Adv. Exp. Med. Biol. *1123*, 165–177.

Watson, J.D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. Nature. New Biol. *239*, 197–201.

Weismann, A. (1834-1914) A. du texte (1892). Essais sur l'hérédité et la sélection naturelle, par A. Weismann,... Traduction française par Henry de Varigny,...

Wiley, C.D., Velarde, M.C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E.A., Freund, A., Shirakawa, K., Lim, H.W., Davis, S.S., Ramanathan, A., et al. (2016). Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. Cell Metab. *23*, 303–314.

Williams, G.C. (1957). Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence. Evolution *11*, 398–411.

Witkowski, J.A. (1980). Dr. Carrel's immortal cells. Med. Hist. *24*, 129–142.

Wood, N., Whitters, M.J., Jacobson, B.A., Witek, J., Sypek, J.P., Kasaian, M., Eppihimer, M.J., Unger, M., Tanaka, T., Goldman, S.J., et al. (2003). Enhanced Interleukin (IL)-13 Responses in Mice Lacking IL-13 Receptor α 2. J. Exp. Med. *197*, 703–709.

Wu, P., Takai, H., and de Lange, T. (2012). Telomeric 3′ overhangs derive from resection by Exo1 and Apollo and fill-in by POT1b-associated CST. Cell *150*, 39–52.

Wu, Y., Yang, J., Ai, Z., Yu, M., Li, J., and Li, S. (2019). Identification of key genes and transcription factors in aging mesenchymal stem cells by DNA microarray data. Gene *692*, 79–87.

Xie, M., Kamenev, D., Kaucka, M., Kastriti, M.E., Zhou, B., Artemov, A.V., Storer, M., Fried, K., Adameyko, I., Dyachuk, V., et al. (2019). Schwann cell precursors contribute to skeletal formation during embryonic development in mice and zebrafish. Proc. Natl. Acad. Sci. *116*, 15068–15073.

Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature *366*, 701–704.

Xu, M., Tchkonia, T., Ding, H., Ogrodnik, M., Lubbers, E.R., Pirtskhalava, T., White, T.A., Johnson, K.O., Stout, M.B., Mezera, V., et al. (2015). JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, E6301-6310.

Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. Nature *445*, 656–660.

Yanai, H., Shteinberg, A., Porat, Z., Budovsky, A., Braiman, A., Ziesche, R., Zeische, R., and Fraifeld, V.E. (2015). Cellular senescence-like features of lung fibroblasts derived from idiopathic pulmonary fibrosis patients. Aging *7*, 664–672.

Yang, H., Wang, H., Ren, J., Chen, Q., and Chen, Z.J. (2017). cGAS is essential for cellular senescence. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *114*, E4612–E4620.

Yang, Z.X., Han, Z.-B., Ji, Y.R., Wang, Y.W., Liang, L., Chi, Y., Yang, S.G., Li, L.N., Luo, W.F., Li, J.P., et al. (2013). CD106 Identifies a Subpopulation of Mesenchymal Stem Cells with Unique Immunomodulatory Properties. PLOS ONE *8*, e59354.

Yap, K.L., Li, S., Muñoz-Cabello, A.M., Raguz, S., Zeng, L., Mujtaba, S., Gil, J., Walsh, M.J., and Zhou, M.-M. (2010). Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. Mol. Cell *38*, 662–674.

Yoon, Y.-S., Yoon, D.-S., Lim, I.K., Yoon, S.-H., Chung, H.-Y., Rojo, M., Malka, F., Jou, M.-J., Martinou, J.-C., and Yoon, G. (2006). Formation of elongated giant mitochondria in DFO-induced cellular senescence: involvement of enhanced fusion process through modulation of Fis1. J. Cell. Physiol. *209*, 468–480.

Young, A.R.J., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J.F.J., Tavaré, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F.M., et al. (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. Genes Dev. *23*, 798–803.

Yu, D., Xu, J., Liu, F., Wang, X., Mao, Y., and Zhu, Z. (2016). Subchondral bone changes and the impacts on joint pain and articular cartilage degeneration in osteoarthritis. Clin. Exp. Rheumatol. *34*, 929–934.

Yun, M.H., Davaapil, H., and Brockes, J.P. (2015). Recurrent turnover of senescent cells during regeneration of a complex structure. ELife *4*, e05505.

Zhen, G., Wen, C., Jia, X., Li, Y., Crane, J.L., Mears, S.C., Askin, F.B., Frassica, F.J., Chang, W., Yao, J., et al. (2013). Inhibition of TGF-β signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis. Nat. Med. *19*, 704–712.

Zhou, J., Li, C., Yu, A., Jie, S., Du, X., Liu, T., Wang, W., and Luo, Y. (2019). Bioinformatics analysis of differentially expressed genes involved in human developmental chondrogenesis. Medicine (Baltimore) *98*.

Zhou, Y., He, C.H., Herzog, E.L., Peng, X., Lee, C.-M., Nguyen, T.H., Gulati, M., Gochuico, B.R., Gahl, W.A., Slade, M.L., et al. (2015). Chitinase 3-like-1 and its receptors in Hermansky-Pudlak syndrome-associated lung disease. J. Clin. Invest. *125*, 3178–3192.

Zhou, Y., He, C.H., Yang, D.S., Nguyen, T., Cao, Y., Kamle, S., Lee, C., Gochuico, B.R., Gahl, W.A., Shea, B.S., et al. (2018). Galectin-3 Interacts with the CHI3L1 Axis and Contributes to Hermansky–Pudlak Syndrome Lung Disease. J. Immunol. *200*, 2140–2153.

Zhu, Y., Tchkonia, T., Pirtskhalava, T., Gower, A.C., Ding, H., Giorgadze, N., Palmer, A.K., Ikeno, Y., Hubbard, G.B., Lenburg, M., et al. (2015). The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. Aging Cell *14*, 644–658.

Zhu, Z., Zheng, T., Homer, R.J., Kim, Y.-K., Chen, N.Y., Cohn, L., Hamid, Q., and Elias, J.A. (2004). Acidic Mammalian Chitinase in Asthmatic Th2 Inflammation and IL-13 Pathway Activation. Science *304*, 1678–1682.

Projections de population à l'horizon 2060 - Insee Première - 1320.

Rôle du transfert mitochondrial et du microenvironnement sur le rajeunissement des cellules souches mésenchymateuses de sujets âgés appliqué à la médecine

Le vieillissement des populations amène avec lui son lot de maladies chroniques dégénératives dites "liées à l'âge", dont font partie un grand nombre de pathologies des os et des articulations. Parmi ces pathologies rhumatologiques, l'arthrose est la plus fréquente. Il s'agit d'une atteinte dégénérative complexe des articulations qui entraine douleur et handicap. Depuis quelques années, de nombreux indices convergent vers un lien entre le développement de l'arthrose et l'accumulation de cellules dites "sénescentes".

Nous nous sommes intéressés aux cellules souches/stromales mésenchymateuses, ces cellules de l'articulation chargées du maintien de l'homéostasie tissulaire. L'altération de leurs propriétés lié au syndrome de sénescence cellulaire, défini comme "un arrêt robuste du cycle cellulaire" associé à un sécrétome particulier, pourrait être à l'origine d'une rupture de l'homéostasie et du développement de la pathologie. Nous avons ainsi caractérisé les cellules souches/stromales mésenchymateuses sénescentes et montré qu'elles perdaient leurs propriétés "anti-sénescente" sur les chondrocytes *in vitro* et qu'elles étaient capables d'induire la pathologie *in vivo*.

Dans un deuxième temps, nous avons montré l'implication de l'une des protéines sécrétées par les cellules souches/stromales mésenchymateuses sénescentes, "*Chitinase-3-like protein 1*" dans la physiopathologie de l'arthrose. Son niveau d'expression dans la membrane synoviale est corrélé à la dégradation du cartilage et à l'expression de marqueurs de la sénescence et de l'arthrose. De plus, Chi3L1 provoque la sénescence des cellules souches/stromales mésenchymateuses qui à leur tour sont capables de propager ce syndrome sénescent aux chondrocytes.

L'ensemble de nos résultats démontre l'importance de la sénescence cellulaire et du microenvironnement associé, dans la physiopathologie de l'arthrose. Ils suggèrent également que le ciblage spécifique des cellules souches/stromales mésenchymateuses sénescentes pourrait constituer une option thérapeutique intéressante.

Involvement of mitochondrial transfer and niche microenvironment in aged mesenchymal stem cell rejuvenation applied to regenerative medecine

Aging is associated with an increased incidence of chronic degenerative diseases, including several joints diseases. Among them, Osteoarthritis is the most common. It is a complex degenerative joints discorder that causes pain and disability. in recent years, more and more evidences associate senescent cells accumulation to the development of osteoarthritis.

We were interested in mesenchymal stem/stromal cells, the cells responsible for joint homeostasis maintenance. The alteration of their properties induced by senescence syndroma, defined as a "robust cell cycle arrest" associated with a particular secretome, could be at the root of a break in homeostasis and the development of the disease. We characterized senescent mesenchymal stem/stromal cells and showed that these cells lost their anti-senescent properties on chondrocytes in vitro and were able to drive the pathology in vivo.

In a second step, we showed the implication of one of the proteins secreted by senescent mesenchymal stem/stromal cells, "Chitinase-3-like protein 1" in the pathophysiology of osteoarthritis. Its expression level in synovial tissue is correlated with cartilage degradation and with senescence- and osteoarthritis- markers expression. In addition, Chi3L1 causes mesenchymal stem/stromal cells senescence which in turn are able to spread senescence syndroma to chondrocytes.

Taken together, our results demonstrate the importance of cellular senescence and senescent-associated microenvironment in the pathophysiology of osteoarthritis. We also suggest that specific targeting of senescent mesenchymal stem/stromal cells could be an promising therapy to cure Osteoarthritis.