



Étude des voies de mort cellulaire induites par les rayons UVB dans les fibroblastes de derme humain

Thèse

Anne-Sophie Gary

Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

Étude des voies de mort cellulaire induites par les rayons UVB dans les fibroblastes de derme humain

Thèse

Anne-Sophie Gary

Sous la direction de :

Patrick Rochette, directeur de recherche

Résumé

Les rayons ultraviolets (UVR) font partie du spectre solaire et sont classés selon leur longueur d'onde en UVA (315 nm-400 nm), UVB (280 nm-315 nm) et UVC (100 nm-280 nm). Les UVA et une portion des UVB traversent la couche d'ozone et atteignent la surface terrestre, affectant la peau et les yeux. La peau se compose de l'épiderme, du derme et de l'hypoderme. Les UVR peuvent causer des dommages cellulaires et des dommages directs à l'ADN sous forme de dimères de pyrimidines (CPD et 6-4PP). Les dommages à l'ADN peuvent mener à la formation de mutations impliquées dans l'initiation et la progression des cancers de peau. La réparation des dommages à l'ADN couplée à l'arrêt du cycle cellulaire, ainsi que la mort cellulaire programmée sont des mécanismes de protection contre la transformation tumorale. En effet, la mort cellulaire régulée (RCD), permet de supprimer les cellules endommagées. Il existe de nombreuses voies de RCD, parmi lesquelles se trouve l'apoptose, la nécroptose, la ferroptose et la parthanatos. L'apoptose est connue pour être activée par les UVR, tandis que peu d'études examinent les voies non-apoptotiques initiées par les UVR. Cette thèse s'intéresse à l'étude des voies de RCD activées par les UVB dans les fibroblastes de derme humain (NHDF).

En premier lieu, l'activation potentielle des voies non-apoptotiques de nécroptose, ferroptose et parthanatos par les UVB, a été étudiée, en plus de l'apoptose. L'investigation de ces voies a été réalisée à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques de la nécroptose, ferroptose, parthanatos et de l'apoptose, suite à une irradiation létale d'UVB. Nos résultats démontrent que seule l'apoptose est mesurable dans les NHDF exposés aux UVB, tandis que la nécroptose, ferroptose et parthanatos ne sont pas activées par les UVB, et ce, même suite à l'inhibition de l'apoptose. Ainsi, l'apoptose est la réponse principale des NHDF à une exposition létale d'UVB. En parallèle de la mort cellulaire, une déplétion du pool de NAD⁺ est observée dans les NHDF, dû en partie à l'activation de la protéine de polyADP-ribosylation PARP1. Par la suite, la participation des protéines RIPK3 et MLKL dans la mort UV-induite a été étudiée. En effet, une précédente étude a mis en évidence une augmentation de la transcription de RIPK3 à la suite d'irradiations chroniques d'UVB, faisant de RIPK3 une protéine d'intérêt. RIPK3, sous forme phosphorylée, est connue pour être impliquée dans la nécroptose au côté de la protéine MLKL. Dans cette partie, la contribution de RIPK3 et de MLKL dans la mort UVB-induite des NHDF a été mise en évidence par déplétion partielle

des protéines cibles. L'utilisation d'inhibiteurs de la nécroptose et l'étude des niveaux de phosphorylation de RIPK3 et MLKL démontre que cette implication est indépendante de leur activité nécroptotique. RIPK3 protège les NHDF de la mort UV-induite par un mécanisme indirect à l'apoptose, tandis que MLKL sensibilise les cellules à l'apoptose UV-induite.

Enfin, le régime d'irradiation, soit l'exposition des cellules à une irradiation unique ou à des irradiations chroniques d'UVB, peut influencer la réponse cellulaire. En effet, la réparation des dommages à l'ADN des NHDF a été étudiée au sein du laboratoire et est modifiée selon le régime d'irradiation. Le rôle du régime d'irradiation, unique et chronique, sur la mort cellulaire induite par les rayons UVB dans les NHDF a donc aussi été étudiée. Pour ce faire, les cellules ont été prétraitées ou non par de faibles irradiations chroniques d'UVB (CLUV) puis ont été exposées à une dose létale d'UVB. Les résultats montrent que le régime d'irradiation chronique ne modifie pas la voie de mort activée par les UVB, qui reste apoptotique, et n'entraîne pas de changement dans la proportion de cellules en voie de mort. Ainsi, la réponse de mort cellulaire des NHDF n'est pas modifiée par le régime d'irradiation UVB, contrairement à la réparation de l'ADN.

Cette thèse établit que l'exposition des NHDF à une dose létale d'UVB induit l'activation de l'apoptose, sans activation des voies non-apoptotiques (nécroptose, ferroptose, parthanatos), et ce même suite à un régime d'irradiation CLUV. De plus, cette étude révèle deux nouveaux acteurs de la mort UV-induite des NHDF : RIPK3 et MLKL.

Cette thèse présente des éléments nouveaux qui s'ajoutent à l'ensemble des connaissances et permettent une compréhension plus complète de la réponse cellulaire au stress génotoxique UVB.

Abstract

Ultraviolet radiation (UVR) is part of the solar spectra. UVR are composed of UVA (315 nm-400 nm), UVB (280 nm-315 nm) and UVC (100 nm-280 nm). UVA and part of UVB reach the earth and affect our skin and eyes. Skin comprises epidermis, dermis and hypodermis layers. UVA and UVB lead to both cellular damage and direct DNA damage, mainly dipyrimidine dimers (CPD and 6-4PP). UV-induced DNA damage can be converted into skin cancer-driver mutations. DNA damage repair mechanisms and regulated cell death (RCD) are two mechanisms protecting cells from tumoral transformation. RCD, such as apoptosis, necroptosis, ferroptosis and parthanatos, remove damaged cells. UVR can induce apoptosis in skin cells, while little is known about non-apoptotic cell death following UVR. This thesis focuses on RCD pathways induced by UVB in normal human dermal fibroblasts (NHDF).

First, possible activation of necroptosis, ferroptosis and parthanatos by UVB was investigated, as well as apoptosis, by use of pharmacologic inhibitors. Our results show that only apoptosis can be measured after UVB irradiation in NHDF, while no necroptosis, ferroptosis or parthanatos could be measured, with or without apoptosis inhibition. Apoptosis is thus a key response in NHDF exposed to a lethal UVB dose. Simultaneously with cell death, a drastic decrease in NAD⁺ was observed in irradiated NHDF, partly due to the activation of PARP1 polymerase.

Secondly, the involvement of RIPK3 and MLKL proteins in UV-induced death was investigated. A previous study demonstrated an increase in RIPK3 transcription following chronic UVB irradiations, showing a potential involvement of RIPK3 in UV-induced cell response. Phosphorylated RIPK3 is known to be involved in necroptosis alongside phosphorylated MLKL. Using RIPK3 and MLKL knockdown, our results demonstrate RIPK3 and MLKL involvement in UVB-induced cell death. Use of necroptosis inhibitors plus the study of RIPK3 and MLKL phosphorylation confirmed that their roles are independent of their necroptotic activities. In fact, RIPK3 protects NHDF from UVB-induced cell death by a non-apoptotic mechanism, while MLKL sensitizes cells to UVB-induced apoptosis.

Finally, irradiation regime, i.e. chronic irradiations versus unique irradiation, can influence the cellular response. Indeed, DNA damage repair has been studied in the laboratory and is

modified by the irradiation regime in NHDF. Thus, we investigated the effect of chronic irradiations on UVB-induced cell death in NHDF. Cells were pre-treated or not with low chronic UVB doses (CLUV) and then exposed to a lethal UVB dose. The results show that with or without CLUV pre-treatment, UVB induced apoptosis with the same proportion of dying cells. Thus, NHDF cell death response is not altered by chronic expositions to UVB, unlike DNA repair.

This thesis establishes that NHDF exposure to a lethal UVB dose induces the activation of apoptosis, without activation of non-apoptotic cell death pathways (necroptosis, ferroptosis, parthanatos), even after chronic irradiations (CLUV). In addition, two new actors of UVB-induced cell death, namely RIPK3 and MLKL, are presented here.

This thesis presents new elements that help better understand the global cellular response to UVB genotoxic stress.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract	iv
Table des matières	vi
Liste des figures, tableaux, illustrations	xi
Liste des abréviations	xiii
Remerciements	xvi
Avant-propos	xx
Introduction	1
1. Lumière, photons et ultraviolets	1
1.1. La lumière : photons et énergie	1
1.2. Le spectre solaire et les ultraviolets	3
1.3. Facteurs jouant sur l'exposition solaire quotidienne	4
2. Les organes exposés aux UVR	5
2.1. L'œil.....	5
2.1.1. La cornée et la sclère	6
2.1.2. L'iris	7
2.1.3. Le cristallin.....	8
2.1.4. La rétine.....	8
2.1.5. Le chemin de la lumière et sa transmission.....	9
2.2. La peau	9
2.2.1. L'épiderme	10
2.2.2. Le derme et l'hypoderme	12
2.2.3. Pénétration des UVR dans la peau	15
3. Effet cellulaire de l'absorption directe des UVR	16
3.1. Les dommages à l'ADN	16
3.1.1. Les dimères de pyrimidines.....	16
3.1.2. Les dommages oxydatifs à l'ADN induits par les UVR	18
3.1.3. Les cassures simple brin et double brin à l'ADN liées aux UVR	20
3.1.4. Mutations signatures des UVR.....	21
3.2. Dommages cellulaires et dommages oxydatifs	23
3.2.1. Les protéines	23
3.2.2. Les composants de la matrice extracellulaire.....	24
3.2.3. Les ARN.....	24
3.2.4. Les lipides et membranes	25
3.2.5. Les mitochondries	26

3.3.	Activation des récepteurs de mort cellulaire	26
4.	Activation de voies signalétiques par les UVR	28
4.1.	L'arrêt du cycle cellulaire.....	29
4.2.	La réparation des dommages.....	31
4.2.1.	La réparation par excision de nucléotides (NER).....	31
4.2.2.	La voie de contournement (bypass) par les ADN polymérases TLS	33
4.2.3.	Réparation des dommages oxydatifs, des cassures simple et double brin.....	35
4.3.	Activation de facteurs de transcription par les UVR.....	35
4.3.1.	Activation des kinases par les voies MAPK et PI3K	35
4.3.2.	Activation des facteurs de transcriptions par les UVR: AP-1, Nrf2, NFκB	36
4.4.	Changements mitochondriaux induits par les UVR	38
4.4.1.	La mitochondrie, le siège du métabolisme cellulaire	38
4.4.2.	La mitochondrie, survie et mort cellulaire	39
4.4.3.	Changements mitochondriaux induits par les UVR	40
5.	La mort cellulaire	41
5.1.	Les différentes voies de mort	42
5.1.1.	L'apoptose.....	42
5.1.1.1.	<i>Voie intrinsèque</i>	43
5.1.1.2.	<i>Voie extrinsèque</i>	45
5.1.2.	Les voies non-apoptotiques	48
5.1.2.1.	<i>La nécroptose</i>	49
5.1.2.2.	<i>La parthanatos</i>	50
5.1.2.3.	<i>La ferroptose</i>	52
5.1.2.4.	<i>La pyroptose</i>	53
5.1.2.5.	<i>La nécrose exécutée par le pore de transition mitochondrial (MPT)</i>	54
5.1.2.6.	<i>La mort cellulaire dépendante du lysosome</i>	54
5.1.2.7.	<i>La mort cellulaire dépendante de l'autophagie</i>	55
5.1.2.8.	<i>La mort cellulaire immunogénique (ICD)</i>	56
5.1.2.9.	<i>La mort cellulaire NETotique</i>	56
5.1.2.10.	<i>La mort cellulaire entotique</i>	56
5.1.3.	Rôle de la mort cellulaire dans l'homéostasie, le développement et le maintien génomique.....	57
5.2.	Les voies de mort activées par les UVR.....	58
5.2.1.	L'apoptose induite par les UVR dans les kératinocytes de peau.....	58
5.2.2.	L'apoptose induite par les UVR dans les fibroblastes de peau	62
5.2.3.	Autres voies de mort cellulaire régulées induites par les UVR.....	66
5.2.4.	La mort un mécanisme de protection anti-tumorale ?.....	69

5.3.	Complexité des voies de signalisation.....	71
5.3.1.	Activation de la mort cellulaire dépendante du type de cellules et d'UVR.....	72
5.3.2.	Interaction entre les différentes voies activées par les UVR: réparation, arrêt du cycle, mort, survie et métabolisme.....	73
6.	Rôle de l'exposition chronique et effet à long terme des UVR.....	75
6.1.	La senescence induite par les UVR.....	75
6.2.	Immunosuppression	76
6.3.	Les cancers de peau.....	76
6.3.1.	Carcinomes et mélanomes.....	76
6.3.2.	Mécanismes de protection antitumorale.....	78
6.4.	Le photo-vieillessement.....	79
6.4.1.	Changements accompagnant le photo-vieillessement.....	80
6.4.2.	Au sein des mitochondries : mutations et ROS.....	81
6.5.	Production de la vitamine D.....	83
6.6.	La mélanisation	84
6.7.	Comparaison du régime d'irradiation aigu et chronique sur la réparation de l'ADN.....	87
7.	Contexte et objectifs des travaux de recherches.....	88
7.1.	Premier objectif : Caractériser les voies de mort activées par les UVB dans les fibroblastes de peau humaine	89
7.2.	Second objectif : Évaluer le rôle de RIPK3 et MLKL dans la mort induite par les UVB dans les fibroblastes de peau	89
7.3.	Troisième objectif : Examiner l'effet du régime d'irradiation	90
Chapitre 1 : Apoptosis, the only cell death pathway that can be measured in human diploid dermal fibroblasts following lethal UVB irradiation		91
1.1	Résumé.....	92
1.2	Abstract	93
1.3	Introduction.....	94
1.4	Matériel et méthodes	96
1.5	Résultats	100
1.6	Discussion	104
1.7	Informations additionnelles.....	107
1.8	Bibliographie.....	108
1.9	Figures.....	111
1.10	Figures supplémentaires.....	117
Chapitre 2 : MLKL et RIPK3, de nouveaux acteurs dans la mort cellulaire induite par les rayons UVB dans les fibroblastes humains dermiques.....		122
2.1	Introduction.....	122
2.2	Matériel et méthodes	123

2.3 Résultats	128
2.4 Conclusions	140
2.5 Figure supplémentaire	143
Chapitre 3 : Influence du régime d'irradiation sur la mort cellulaire induite par les UVB dans les NHDF	144
3.1 Introduction	144
3.2 Matériel et méthodes	145
3.3 Résultats	148
3.4 Conclusions	155
Discussion.....	157
1. Résultats obtenus : un résumé.....	157
2. Caractérisation des voies de mort.....	158
a. Mesure de la viabilité cellulaire	158
b. Mesure de la mortalité.....	159
c. Différencier les voies de mort programmée	161
d. Une définition de la mort cellulaire régulée.....	163
3. Mort des NHDF par apoptose UV-induite et temporalité	164
a. Mort précoce et mort tardive	164
b. Hypothèses	164
4. MLKL et RIPK3, nouveaux acteurs, nouvelles avenues.....	167
5. Choix des doses UVB employées sur les NHDF	169
a. Considérations techniques.....	169
b. Doses physiologiques ?	170
c. UVA, un autre sujet d'étude possible.....	173
6. Réponse cellulaire et environnement	174
a. La signalisation cellules-matrice et cellule-cellule	174
b. Le modèle de peau reconstruite.....	174
c. La signalisation par les vésicules extracellulaires	176
7. Lien entre dommages à l'ADN, métabolisme, réparation et mort cellulaire	177
a. PARP : une protéine multitâche	177
b. La mitochondrie	177
8. L'œil, l'autre organe exposé aux rayons UVB	178
9. La mort cellulaire et les cancers de peau	179
Conclusion.....	181
Bibliographie	182
Annexe 1 : The T414G mitochondrial DNA mutation: a biomarker of aging in human eye. 203	
A1- 1 Résumé en français	204

A1- 2 Résumé en anglais.....	205
A1- 3 Introduction.....	206
A1- 4 Matériel et méthodes.....	208
A1- 5 Résultats.....	210
A1- 6 Discussion.....	212
A1- 7 Informations additionnelles.....	216
A1- 8 Bibliographie.....	217
A1- 9 Tableau et Figures.....	220
A1- 10 Données supplémentaires.....	226

Liste des figures, tableaux, illustrations

Liste des figures

Introduction

Figure 1 Diagramme représentant les niveaux d'énergie d'un atome.....	2
Figure 2 Spectre électromagnétique solaire.....	3
Figure 3 Structures de l'œil et chemin de la lumière.....	5
Figure 4 Structure de la cornée.....	7
Figure 5 Structure de la rétine humaine et chemin de la lumière.....	8
Figure 6 Structure de la peau et pénétration des UVA et UVB dans la peau.....	10
Figure 7 Structure de l'épiderme et cellules le composant.....	11
Figure 8 Composition du derme.....	13
Figure 9 Formation des dimères de pyrimidines par les UVR.....	17
Figure 10 Formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les UVR par photoactivation d'un chromophore.....	19
Figure 11 Différents dommages à l'ADN formés après exposition aux UVR.....	20
Figure 12 Mécanismes menant aux mutations signatures des UVR.....	22
Figure 13 Dommages cellulaires induits par l'exposition aux UVR.....	25
Figure 14 Activation des récepteurs de mort cellulaire.....	27
Figure 15 Mécanismes menant à l'arrêt du cycle cellulaire par les dommages à l'ADN induits par les UVR.....	30
Figure 16 Réparation des dommages de type dimères de pyrimidines par la voie d'excision de nucléotides NER.....	33
Figure 17 Activation des facteurs de transcriptions et des protéines kinases par les UVR.....	38
Figure 18 Schéma résumé de la voie intrinsèque de l'apoptose.....	44
Figure 19 Activation de la voie extrinsèque apoptotique par les récepteurs à dépendance.....	46
Figure 20 Activation de la voie extrinsèque apoptotique par les récepteurs de mort cellulaire.....	47
Figure 21 Mécanismes d'activation de la nécroptose et formation du nécrosome.....	49
Figure 22 Signalisation cellulaire menant à la parthanatos.....	51
Figure 23 Mécanismes menant à la mort par ferroptose.....	52
Figure 24 Schéma des voies de mort non-apoptotiques : dépendante du lysosomes, dépendante du pore de transition mitochondrial, mort immunogénique et pyroptose.....	55
Figure 25 Schéma bilan des voies d'activation de l'apoptose dans les kératinocytes de peau après une dose létale d'UVR.....	61
Figure 26 Schéma bilan des voies d'activation de l'apoptose dans les fibroblastes de peau après une dose létale d'UVR.....	64
Figure 27 Mécanismes induits par les UVR menant à l'apoptose dans les cellules de peau.....	66
Figure 28 Complexité et crosstalk des voies de signalisations activées par les UVB.....	74
Figure 29 Mécanismes menant à l'initiation, la progression et l'invasion tumorale dans la peau.....	79
Figure 30 Mécanismes menant au photo-vieillessement de la peau.....	81
Figure 31 Cercle vicieux favorisant le vieillissement des cellules et tissus.....	82
Figure 32 Processus de production de la vitamine D3 et rôle des UVB.....	84

Chapitre 1

Figure 1 UVB-induced early cell death in primary human fibroblasts.....	111
Figure 2 Cellular metabolic activity of UVB-irradiated primary human fibroblasts treated with different cell death inhibitors.....	112
Figure 3 UVB induces two independent reduction of cellular metabolic activity in primary human fibroblasts.....	113
Figure 4 UVB-induced cell death is independent of oxidation in primary human fibroblasts.....	114

Figure 5 The UVB-induced total NAD and NAD+ pool decrease can partially be restored using PARP inhibitor.....	115
Figure 6 Parthanatos is not induced by UVB in primary human fibroblasts.....	116

Chapitre 2

Figure 1 La diminution de l'expression de RIPK3 par siARN induit une augmentation de la mort cellulaire mesurée en FACS.....	129
Figure 2 L'utilisation de siRIPK3 induit une augmentation de la mort cellulaire mesurée par essai CellTOX.....	131
Figure 3 La diminution de l'expression de MLKL par siARN induit une diminution de la mort cellulaire mesurée en FACS.....	133
Figure 4 L'utilisation de siMLKL induit une diminution de la mort cellulaire mesurée par essai CellTOX.....	134
Figure 5 Les UVB n'induisent pas de nécroptose dans les NHDF.	136
Figure 6 Analyse des phosphorylations de RIPK3 et de MLKL spécifiques à la nécroptose post-UVB.	137
Figure 7 Impact de la déplétion partielle de RIPK3 et de MLKL sur l'activation des caspases post-UVB par mesure du clivage de leur cible, PARP1.....	139

Chapitre 3

Figure 1 Schéma du protocole d'irradiation.....	147
Figure 2 Mort cellulaire mesurée en FACS suivant un prétraitement CLUV.....	149
Figure 3 Mort cellulaire mesurée en FACS suivant de nouvelles conditions d'irradiation.	150
Figure 4 Analyse des phosphorylations de MLKL et RIPK3 suite à un prétraitement CLUV.	152
Figure 5 Activation des caspases par une irradiation létale d'UVB.....	154

Annexe 1

Figure 1. Schematic representation of the Q-PCR technique used to evaluate the mtDNA ^{T414G} / mtDNA ratio.....	220
Figure 2. MtDNA ^{T414G} / total mtDNA ratio analysis in different ocular structure.....	221
Figure 3. Age-related accumulation of mtDNA ^{T414G} mutation in the iris.	222
Figure 4. MtDNA ^{T414G} / total mtDNA ratio analysis in the different corneal cellular layers.....	223
Figure 5. Age-related accumulation of mtDNA ^{T414G} in the corneal stroma.	224
Figure 6. MtDNA ^{T414G} / total mtDNA ratio analysis in the macular and peripheral regions of the neural retina and the RPE.....	225

Liste des Tableaux

Introduction

Tableau 1 Type de peau et leur sensibilité à prendre des coups de soleil et bronzer selon le système de Fitzpatrick.....	85
--	----

Discussion

Tableau 2 Équivalence entre l'irradiance solaire et les doses utilisées en laboratoire.	171
--	-----

Annexe 1

Table 1. Primers used to quantify the mtDNA ^{T414G} /total mtDNA ratio	220
---	-----

Liste des abréviations

$^1\text{O}_2$	Oxygène singulet
6-4PP	Pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct
8-oxodG	8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine
8-OHdG	Hydroxylation des guanines
A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	ADN mitochondrial
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
Akt	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
AP-1	Activator protein-1
APAF-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
ARN	Acide ribonucléique
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
Bcl	B-cell lymphoma
BER	Base excision repair
C	Cytosine
CBC	Carcinome basocellulaire
CDK	Cyclin-dependent kinase
Chk	Checkpoint kinase
CLUV	Chronic low doses of UVB
CPD	Cyclobutane pyrimidine dimers
CS	Cockayne syndrome
CSC	Carcinome spinocellulaire
DD	Death domain
DDB	DNA damage-binding protein
DDR	DNA damage response
DED	Death effector domain
DISC	Death-inducing signaling complex
DR	Death receptor
DSB	Double strand break
E2F1	Transcription factor E2F1
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FADD	FAS associating protein with death domain
FapyGua	2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidoguanine
FASR	FAS receptor
G	Guanine
GG-NER	Global genome NER
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
HaCaT	Human, adult, low calcium, high temperature
HR	Homologous recombination
IAP	Inhibitor of apoptosis
IL	Interleukin
MAPK	Mitogen-activated protein kinases (MAP kinase)
MCR1	Melanocortin 1 receptor
MEF	Mouse embryonic fibroblasts
MLKL	Mixed lineage kinase domain like pseudokinase
MMP	Matrix metalloproteinase
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
MPT	Mitochondrial permeability transition
NAD(H)	Nicotinamide adénine dinucléotide (hydrogène)
NADP(H)	NAD phosphate (hydrogène)

NER	Nucleotide excision repair
NFκB	Nuclear factor kappa-B
NHDF	Normal human dermal fibroblasts
NHEJ	Non-homologous end joining
NO(S)	Oxyde nitrique (synthase)
NOX	NADPH oxydase
Nrf	Nuclear factor erythroid 2-related factor
O ₂ •-	Anion superoxyde
OH•	Radical hydroxyle
PAR	Poly-ADP ribose
PARP	Poly-(ADP ribose)- polymerase 1
Pb	Paire de bases
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PI	Propidium iodide
PI3K	Phosphoinositide 3-kinases
Pol	Polymerase
PTPC	Permeability transition pore complex
RHIM	RIP homotypic interaction motif
RIPK	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
RPA	Replication protein A
SMAC	Second mitochondria-derived activator of caspases
SSB(R)	Single strand break (repair)
T	Thymine
TC-NER	Transcription-coupled NER
TFIIH	Transcription initiation factor II H
TGF- β	Transforming growth factor beta
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TLS	Translesion DNA synthesis
TNF(R)	Tumor necrosis factor (receptor)
TRADD	TNFR1-associated death domain
TRAIL-(R)	TNF-related apoptosis-inducing ligand (receptor)
U	Uracile
UCA	Acide urocanique
UV	Ultraviolets
UVR	UV radiation
XP	Xeroderma Pigmentosum
ε	Epsilon
ι	Iota
κ	Kappa
η	Êta
ζ	Zêta

“Life is pleasant. Death is peaceful. It’s the transition that’s troublesome” Isaac Asimov

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à dire merci à celles et ceux qui ont pris le temps de lire ma thèse, une longue tâche ! Merci tout particulièrement au Dr. Guérin, Dre. Lavoie et Dre. Sage d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Patrick, vous êtes un excellent directeur de thèse et je vous remercie pour votre supervision. Vous savez laisser aux étudiants leur autonomie, vous encouragez la créativité scientifique et l'expression de nos idées (même farfelues) et vous nous encouragez dans notre cheminement scientifique. Merci aussi de nous permettre de participer à des congrès internationaux, à Tampa et Barcelone pour ma part. C'était très sympa de faire le congrès à Barcelone avec vous ! Merci pour votre accueil et votre disponibilité en tout temps !

Merci évidemment à la meilleure équipe et tous les étudiants (et stagiaires) qui y sont passés ! Merci à Seb, Corinne et Marie-Christine pour le temps partagé, les discussions sous la hotte et les parties de D&D, avec des pizzas bien-sûr ! Corinne, je n'oublierai pas ton efficacité aux lancés de haches ! Merci à Marie-Catherine de m'avoir aidé au démarrage de mon doc. Je ne t'oublie pas Alexe, merci d'avoir embaumé le labo avec tes cigarettes. Seb, je te remercie pour toutes les discussions sur tout et n'importe quoi pendant nos temps d'attente, d'avoir partagé tous les échecs en Western blot, mais aussi que tu sois venu jouer au foot, enfin soccer, avec nous !

Merci à tout le lab du CUO-recherche pour les différents événements-activités partagés, que ce soit les 5@7, les jeux de Noël ou juste les discussions au labo ! Merci aux « vieux » du labo, Gaëtan, Kim, Pascale, Xiaolin pour les 4 ans et demi passés ensemble. Bien sûr, je remercie les chercheurs du CUO et de l'axe pour leurs conseils et questions ! J'en profite pour remercier les chercheurs qui ont évalué et participé à mon pré-doc et pré-pré-doc !

Alicia, je ne peux bien évidemment pas passer plus de temps sans te remercier ! Tu t'investis et passe du temps avec chaque étudiant qui passe, merci ! Merci de nous avoir accueilli chez toi pour un bon BBQ (j'ai découvert les mouches à chevreuils et le groupe Les Colocs grâce à toi ;)). Merci aussi à Line, pour ton investissement au labo et tes sourires ! Merci à toute

l'équipe de Solange, qui m'ont aussi souvent accueilli dans leurs activités. D'ailleurs, merci Philippe pour tes blagues, tes discussions (parfois très longues ^^) et le poulet partagé !

Et comme il faut bien se défouler et faire du sport... merci Mathieu de toujours proposer des activités, du sport, des randos... Merci de m'avoir amené et fait découvrir le bloc, et d'être venu à ton tour au foot. À tous les footballeurs qui se reconnaîtront, j'ai adoré perdre avec vous (en vrai, j'aurais préféré gagner), m'entraîner avec vous et j'aurais aimé pouvoir partager plus de bières avant de partir !

Manel, je suis triste de te quitter, mais si contente de t'avoir rencontré et d'avoir passé du temps avec toi et les enfants ! J'ai vu Lyna et Kenzi grandir et je vous souhaite des milliers de moments de bonheur ! Je t'attends en France pour visiter la ferme ;).

Merci aussi aux nouvelles-nouveaux du labo d'avoir ramené un peu plus de France encore au Québec ! Christelle et Ange, merci pour les discussions et les moments ensemble. Alexis, tu es toujours partant pour un foot, des jeux, une bière, des débats... Merci ! J'ai aussi beaucoup apprécié te gagner à Call of ! Merci Kelly pour ton sourire et ta bonne humeur, pour tes boulettes et ta dyslexie qui nous ont bien amusé, on peut vraiment rire de tout. Tu vas faire un super doctorat, accroche-toi ! Thanks Andrew for the shared moments, you have a great sense of humour and a sweet family. Come to France when you can !

À tous mes amis français, merci de m'avoir soutenu et de m'écouter râler sur le froid au Québec ;) Hélène, Jess, Sabine, Élixa et Stacy, peu importe la distance vous êtes toujours présentes pour moi, toujours prêtes à organiser un repas ou une aprèm et à se retrouver dès que l'occasion se présente ! Merci Sabine pour tes cartes et les photos, j'ai adoré les recevoir ! Merci Hélène pour ta folie, ta joie de vivre, et ton accueil toujours chaleureux ! Merci Jess, Boule et Juju, vous êtes les meilleurs pour organiser le repas annuel des vieux de la vieille, il me tarde de partager encore plus de moments avec vous. Et Stace, depuis le collège, l'internat au lycée, la vie à Bordeaux... que ce soit partager les copies de français ou un bon repas, tu es toujours partante, merci ! Les dames de prépa, Barion, Ju', Floflo, Mélouche et Nono, même si on se voit une fois tous les 2 ans (et si vous êtes les pires pour répondre aux messages ou retenir les dates d'anniversaires), je sais que je peux compter sur vous en toute

occasion. Il me tarde nos prochaines retrouvailles ! Barion, merci d'être venu me voir à Québec et d'être notre pilier !

Héléna et Thomas, ça va faire 7 ans que l'on se connaît et plus de 4 que l'on se supporte à Québec ! Entre les BBQ, les raclettes, les chalets, le ski, l'apprentissage du Snow, le patin et toutes les bouffes, vous nous avez régales (et sûrement fait prendre quelques kilos). On n'aurait pu rêver mieux que de vous avoir comme voisins, vous êtes les meilleurs ! Laudine, tu nous as accueilli chez toi et j'ai adoré nos week-end ensemble ! Avec Jordy, vous êtes toujours partants pour tout et c'est le top du top de vous avoir en amis ! Justine, on a vécu des moments forts en Angleterre (tu vois de qui je parle... ahah), on s'éclate avec toi et on est gavé heureux de vous avoir reçu à Québec avec Morgan ! Merci à tous les TTBiens qui sont passés ou ont vécu à Québec, pour le temps partagé ! Merci aussi Maud, pour les messages et les appels, ta joie de vivre est contagieuse ! Joaquim et Camille, les retrouvailles au chalet étaient trop cool, il faut se voir plus souvent et remettre ça ! Nestor, merci de m'avoir reçu chez toi à Bordeaux ou en Espagne, et surtout de faire la meilleure tortilla du monde, et j'ai envie de dire... Il va faire tout noir...

Marie, merci pour les longues conversations au bench et hors labo, tu as fait passer le temps bien plus rapidement et je n'ai que des bons souvenirs avec toi et titi ! Le week-end à Sherbrooke pour vos 30 ans, les soirées pizzas, sushis, restau... c'était le top ! Merci titi pour les parties de Call of, Halo et Rocket League, vive la moselle et Kaamelott !

Numa, merci de supporter ton frère et de le remettre un peu à sa place ;), on forme une bonne équipe à Rocket League et je pense que tu me bats en terme de mauvaise foi aux jeux, merci ! Léa, j'ai adoré nos vacances à NY tous les quatre ! Merci de garder toujours du temps pour nous voir à Noël et de partager une bonne raclette pour le nouvel an ! Merci aussi Pia et Christophe de m'avoir si bien accueilli dans la famille et de toujours nous soutenir dans nos projets ! Merci pour les journées ensembles, les cafés partagés et tous les bons moments.

Maman, Papa, merci de m'accompagner et de me soutenir dans toutes les épreuves et les étapes de ma vie (après vous m'avez mis au monde, donc pas le choix ^^). Merci d'être toujours prêts à skyper, de vous être mis à WhatsApp et de me faire des lasagnes et du canard quand je rentre ! Merci de m'avoir transmis vos valeurs et de toujours m'écouter râler. Émilie,

Nico et Roro, merci d'être des frères et sœur géniaux (en général, des fois vous êtes chiants ^^), et de toujours être dispos pour des repas et des jeux ! Robinou et Lulu, merci d'avoir accepté Nico dans vos vies (et nous avec), merci de toujours me recevoir et de me laisser squatter. Merci à tous d'être venus à Québec nous voir, on retiendra tous les moments de rire et de joie ensemble ! Vous le savez, mais parfois c'est bien de le dire, je vous aime. Évidemment, merci au reste des Gary, à la famille Édot et Gras (Nath, Benji, Thim, Cléa, Seb, Cindy, Anaël, Clément et tonton... on est moins nombreux de ce côté alors je peux donner des noms !), à mes papis et mamies, pour tous les repas, les fêtes, les week-end ensemble, les Noël, pour les débats et les décibels ! Une dédicace à Élise et Baptiste qui ont osé venir à Québec.

Last but not least, je garde le meilleur pour la fin... Léo ! La vie n'est pas un long fleuve tranquille, "Mais, vous savez, moi je ne crois pas qu'il y ait de bonne ou de mauvaise situation. Moi, si je devais résumer ma vie aujourd'hui avec vous, je dirais que c'est d'abord des rencontres, des gens qui m'ont tendu la main, peut-être à un moment où je ne pouvais pas, où j'étais seul chez moi. Et c'est assez curieux de se dire que les hasards, les rencontres forment une destinée [...] et je dis merci à la vie, je lui dis merci, je chante la vie, je danse la vie... Je ne suis qu'amour ! ". Mon amour, tu es mon rock, mon partenaire de vie, mon humoriste. Tu es ma plus belle rencontre et je t'aime ! Je t'admire pour ta générosité, ton altruisme, ton intelligence, ta patience. Merci de me soutenir et de me supporter dans mes moments de stress, de croire en moi et de me pousser à entreprendre tout ce qui me passe par la tête. On ne cesse d'apprendre et de grandir ensemble, merci pour tous ces moments de bonheur. Je t'aime à la folie.

Avant-propos

Cette thèse se présente sous forme d'insertion d'articles scientifiques. Le chapitre 1 et l'annexe 1 sont des articles revus par des pairs et publiés.

Chapitre 1

Le chapitre 1 présente les travaux de l'article « Apoptosis, the only cell death pathway that can be measured in human diploid dermal fibroblasts following lethal UVB irradiation », publié dans le journal *Scientific Reports* (DOI : 10.1038/s41598-020-75873-1). Cette publication a été reçue par le journal le 31 juillet 2020, a été acceptée le 6 octobre 2020 et publiée le 3 Novembre 2020. Les auteurs sont dans l'ordre : Anne-Sophie Gary (moi-même) et Patrick J. Rochette (le superviseur de cette thèse).

En tant que 1^{er} auteur, ma contribution pour cet article est la conception et le design des expériences, la collecte des données, leur analyse et leur interprétation, l'écriture du manuscrit et la mise en forme des figures, ainsi que la révision du manuscrit.

Patrick Rochette, en tant que superviseur, a contribué à la conception et l'interprétation des données, à l'écriture et la révision du manuscrit, ainsi qu'à l'acquisition du financement du projet.

Le chapitre 1 présente l'article tel que publié à l'exception de l'ajout d'un résumé en français au début du chapitre et de la mise en page qui a été adaptée au format de cette thèse.

Annexe 1

L'annexe 1 présente les travaux du manuscrit « The T414G mitochondrial DNA mutation: a biomarker of aging in human eye » publié dans le journal *Mutagenesis*. Le manuscrit a été envoyé le 4 Novembre 2020, revu par des pairs et a été accepté et publié le 16 janvier 2021. Les auteurs sont les suivants : Anne-Sophie Gary, Marie M Dorr et Patrick J. Rochette. Marie M Dorr et moi-même sommes co-premières auteures sur cet article.

Ma contribution pour ce manuscrit est le design et la conception des expériences, la collecte, l'analyse et l'interprétation des données, l'écriture du manuscrit et la mise en forme des figures, ainsi que la révision du manuscrit.

Marie M Dorr a contribué au design et à la conception des expériences, à la collecte, l'analyse et l'interprétation des données et à la relecture de l'article pour la publication.

Patrick J. Rochette, en tant que superviseur, a contribué à la conception et au design des expériences, à l'interprétation des résultats, aux révisions de l'article, et à l'acquisition du financement des recherches.

L'Annexe 1 présente l'article tel que publié à l'exception de l'ajout d'un résumé en français au début du chapitre et de la mise en page qui a été adaptée au format de cette thèse.

Introduction

Les figures ont été faites à partir de la banque d'image libre de droit de Servier.

Introduction

1. Lumière, photons et ultraviolets

1.1. La lumière : photons et énergie

La lumière est un élément vital à la vie terrestre, en plus de donner toutes les couleurs que nous voyons, elle réchauffe le globe terrestre et rythme nos journées et nos saisons. Mais objectivement qu'est-ce-que la lumière ?

La lumière à laquelle nous pensons et celle que nous voyons n'est qu'une petite partie du spectre solaire que l'on appelle la lumière visible. La lumière est en fait composée de particules qui agissent comme des ondes, et se déplacent à la vitesse de la lumière soit environ 300 000 km par seconde (s) dans le vide. La lumière est donc à la fois une particule et une onde. La particule constituant la lumière est le photon, c'est un corpuscule sans masse et non chargé, mais qui possède une quantité d'énergie ΔE [1].

Les photons sont comme des sacs d'énergie qui vont être absorbés ou émis par la matière et plus précisément par les électrons qui sont autour des atomes. Les électrons peuvent changer d'orbite autour de l'atome et passer d'un niveau énergétique à un autre en recevant ou en donnant une quantité d'énergie définie. Lorsqu'un électron passe à un niveau énergétique inférieur, il peut rejeter un sac d'énergie sous forme de photon, cette énergie est appelée ΔE car c'est la différence entre les deux paliers énergétiques de l'électron. Pour qu'un électron passe à un niveau supérieur, par exemple pour qu'il passe du niveau fondamental stable à un niveau excité (changement d'orbite autour de l'atome), il doit absorber un sac d'énergie, soit un photon ayant la bonne quantité d'énergie ΔE (Figure 1). La quantité d'énergie émise ou absorbée par l'électron est toujours proportionnelle à une constante qui s'appelle la constante de Planck h ($h = 6,62 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}^{-1}$) et à la fréquence du photon ν , qui représente le nombre d'oscillation de l'onde par seconde. Ainsi, l'énergie absorbée ou émise sous forme de photons est égale à $\Delta E = h \cdot \nu$. La fréquence se mesure en Hertz ($1 \text{ Hz} = 1 \text{ s}^{-1}$) et l'énergie ΔE en Joule (J) [1,2].

La fréquence ν de l'onde lumineuse est proportionnellement inversée à sa longueur d'onde λ . La longueur d'onde représente la périodicité spatiale des oscillations, c'est-à-dire la distance entre deux maxima de l'oscillation, elle se mesure en mètre (Figure 1). En fait, la fréquence de l'onde est égale à la vitesse de la lumière dans le vide c divisé par la longueur d'onde, soit $\nu = c/\lambda$.

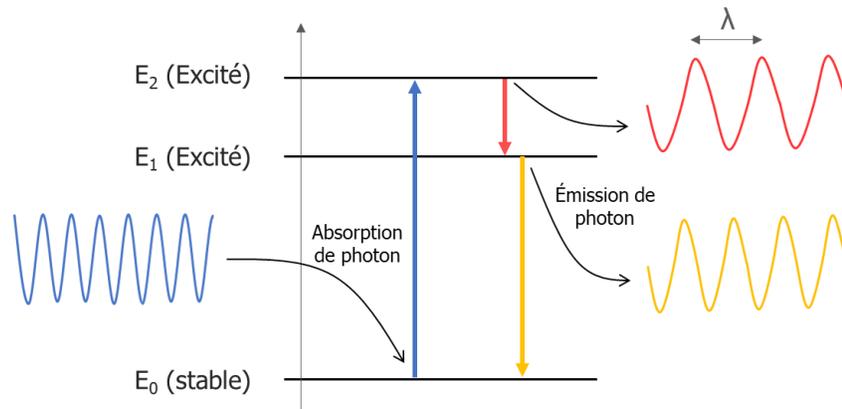


Figure 1 Diagramme représentant les niveaux d'énergie d'un atome.

L'atome passe d'un niveau d'énergie E_0 à E_2 lorsqu'un électron absorbe l'énergie d'un photon (ici bleu). Pour revenir à un niveau d'énergie plus faible, l'électron émet de l'énergie sous forme de photon (ici rouge), l'atome passe du niveau E_2 à E_1 . Pour revenir à l'état stable E_0 , l'électron perd de l'énergie sous forme de photon (ici jaune) et l'atome passe du niveau E_1 à E_0 . La longueur d'onde λ d'un photon est la distance entre deux maxima d'oscillation de l'onde.

Pour résumer, un photon est une particule qui se déplace comme une onde électromagnétique, avec une longueur d'onde précise (et donc une fréquence) et qui est caractérisé par une quantité d'énergie (quantum d'énergie ΔE). Plus la longueur d'onde du photon est faible, plus l'énergie du photon est haute. À l'inverse, plus la longueur d'onde du photon est grande, plus l'énergie de celui-ci est basse (Figure 2).

Ainsi le spectre électromagnétique émis par le soleil contient des photons de toutes les longueurs d'onde et peut être absorbé par la matière (des objets par exemple) ou être réfléchi ou réfracté. Les photons qui nous sont renvoyés vont donner la couleur de la matière.

1.2. Le spectre solaire et les ultraviolets

Le soleil émet des photons allant des longueurs d'onde de l'ordre du femtomètre (rayon gamma) au kilomètre (onde radio) (Figure 2). Seul une faible partie de ces rayons sont visibles pour l'homme, soit entre 400 nm et 800 nm, du bleu au rouge, c'est la lumière visible [1].

Au-delà de la lumière visible se trouvent les infra-rouges (800 nm à 1 mm), les micro-ondes (1 mm à 30 cm), et les ondes radio (30 cm à plusieurs km).

En dessous du spectre visible, se trouvent les ultraviolets (10 nm – 400 nm), les rayons X (0.01 nm à 10 nm) et enfin les rayons γ (en dessous de 0.01 nm).

Les rayons γ et rayons X sont dit ionisants, ils sont tellement énergétiques qu'ils sont capables de transformer un atome en ion. Heureusement pour nous, ces rayons sont bloqués par l'ozone de l'atmosphère terrestre. Les rayons X, à faible dose, sont utilisés en radiographie ou encore en radiothérapie [2].

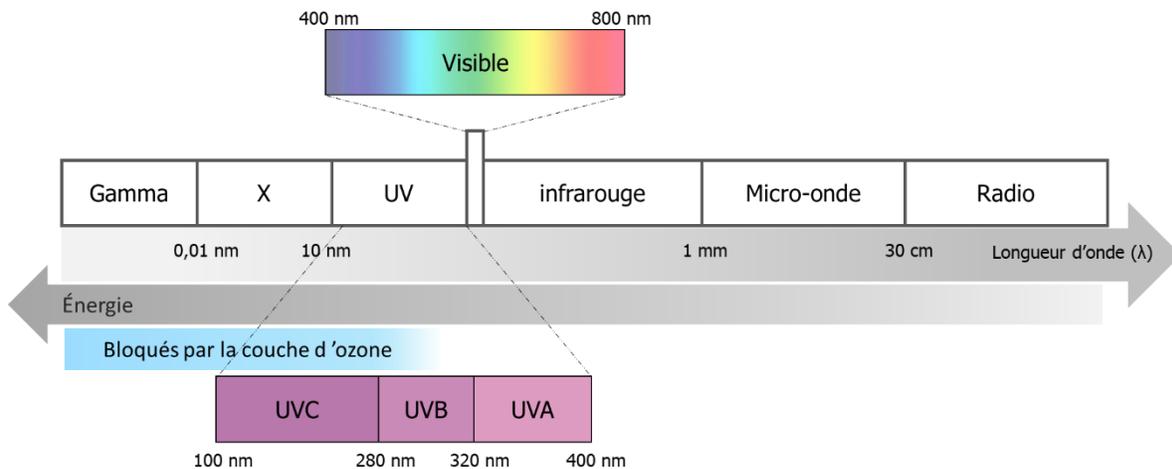


Figure 2 Spectre électromagnétique solaire.

Les rayons Gamma, X, UVC et une partie des UVB sont bloqués par la couche d'ozone. La longueur d'onde et l'énergie du photon sont inversement proportionnels.

Les ultraviolets (UV) peuvent être divisés en trois groupes selon leur longueur d'onde, soit les UVA entre 315 et 400 nm, les UVB entre 280 et 315 nm et les UVC de 100 nm à 280 nm. La totalité des UVC et une partie des UVB sont aussi absorbés par la couche d'ozone. Cela est un avantage car les molécules d'ADN absorbent efficacement l'énergie des UVC et UVB,

avec un pic d'absorption à environ 260 nm [3]. Nous verrons par la suite que l'absorption de l'énergie par l'ADN peut induire des dommages. Les rayons ultraviolets (UVR) correspondent environ à 5% des radiations solaires arrivant à la surface terrestre. Parmi ces 5%, environ 95% des UVR sont des UVA, et 5% des UVB [4,5].

La lumière visible allant de 400 nm à environ 800 nm, va donc du bleu au rouge en passant par toutes les couleurs de l'arc-en-ciel. Elle représente entre 45 et 50% des radiations solaires arrivant sur la terre. Enfin, les infrarouges représentent environ 40-45 % des radiations atteignant la surface terrestres [4].

Les rayons UVA et UVB qui atteignent la surface terrestre sont capables de causer des dommages cellulaires. La faible portion d'UVB arrivant à la surface terrestre est suffisante pour causer des dommages à l'ADN. Ainsi, nous utiliserons les UVB dans cette étude afin d'étudier leur effet génotoxique. La quantité d'UVB utilisée est exprimée en dose d'UV, soit en Joule par mètre carré (J/m^2), ce qui correspond à l'énergie des photons par unité de surface.

1.3.Facteurs jouant sur l'exposition solaire quotidienne

De nombreux facteurs peuvent influencer la quantité d'UVR atteignant la surface terrestre, dont la présence et la concentration de certains gaz dans l'atmosphère, autant l'ozone que certains polluants. Par exemple, la période de l'année, l'axe de rotation de la Terre, la latitude, changent la quantité d'UVR reçue. Notamment, le soleil est plus près de la Terre en été, il y a donc plus de rayons qui atteignent la surface terrestre à cette période. De même, les zones se trouvant à des altitudes plus hautes reçoivent plus d'UVR. De plus, la lumière est réfléchiée en partie par la Terre. Ainsi, selon l'heure de la journée, la réflexion sera différente et la dose d'UVR reçue par une personne changera. Les conditions météorologiques influencent aussi la dose d'ultraviolet reçue, une journée nuageuse pourra en partie bloquer les UVR, un sol enneigé reflétera une grande quantité d'UVR. Beaucoup d'autres facteurs influencent la quantité de lumière et d'UVR atteignant la surface terrestre et nous atteignant [4], [5].

Les UVR directs ou réfléchis atteignent les yeux et la peau chez l'Homme et sont capables de pénétrer dans ces organes. Chaque personne s'expose différemment au soleil selon ses conditions de vie, son travail, son lieu de vie, etc. Les lampes artificielles et les expositions

artificielles aux lampes UVA s'ajoute aussi à l'exposition totale aux UVR. Il est donc difficile d'avoir une évaluation précise de la dose d'UVR terrestre nous atteignant.

2. Les organes exposés aux UVR

L'œil et la peau sont les deux organes exposés à la lumière et aux UVR. Dans cette section nous décrivons brièvement la structure de l'œil et la transmission de la lumière à la rétine. Différentes structures de l'œil seront utilisées dans l'annexe 1 comme modèle d'étude. La structure de la peau et la transmission des UVR dans celle-ci seront ensuite abordées plus en détails, les cellules du derme (fibroblastes) étant le modèle cellulaire principal de cette thèse.

2.1.L'œil

L'œil est un organe de perception de notre environnement. C'est un organe complexe par sa structure et ses fonctions. Agissant comme des lentilles, les structures de l'œil concentrent la lumière et transfèrent l'information par le biais du nerf optique. L'œil, grâce à la lumière, transmet des informations spatiales et temporelles provenant de notre environnement, soit la perception directe par la vision, mais aussi l'alternance jour-nuit par son rôle dans le cycle circadien [6].

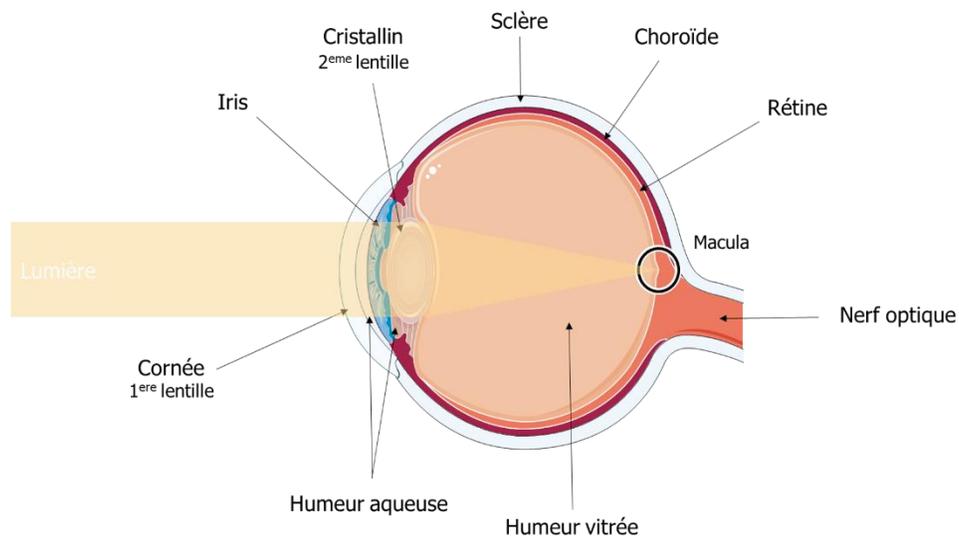


Figure 3 Structures de l'œil et chemin de la lumière.

L'œil peut être décomposé en trois couches principales, elles-mêmes subdivisées en sous-couches (Figure 3). La première couche, la plus externe à l'organe, supporte la structure de l'œil et est composée de la cornée, de la sclère et de leur zone d'interjection appelée le limbe. La seconde couche, la couche intermédiaire, qui constitue la tunique vasculaire du globe, comprend l'iris, le corps ciliaire et la choroïde. Enfin, la couche interne de l'œil, la couche sensorielle, est désignée comme la rétine. Derrière l'iris se trouve le cristallin, un corps transparent suspendu par des ligaments attachés au corps ciliaire. Entre les couches on retrouve trois chambres remplies de fluide. Les deux premières sont emplies d'humeur aqueuse : la chambre antérieure se trouve entre la cornée et l'iris et la chambre postérieure entre l'iris et le cristallin. La troisième chambre, entre le cristallin et la rétine, est composée d'humeur vitré [7,8].

L'œil est relié à six muscles externes qui permettent au globe oculaire ses mouvements. Il possède aussi des muscles internes permettant d'ajuster la vision, un système lacrymal produisant des larmes et leur drainage, ainsi que des paupières qui jouent sur la production et la distribution des larmes et qui régule la quantité de lumière arrivant à l'œil [8]. Enfin, l'œil est relié au cortex visuel par un système visuel complet et complexe qui ne sera pas discuté ici.

2.1.1. La cornée et la sclère

La cornée forme la couche la plus externe de l'œil, elle recouvre l'iris. Elle a un rôle de protection et forme une barrière avec l'environnement extérieur. Elle a à la fois un rôle dans la filtration de la lumière (selon les longueurs d'ondes) et dans sa transmission et convergence. Sa transparence est primordiale à une bonne vision. Elle correspond à la première lentille focale de l'œil [9,10].

La cornée peut être subdivisée en trois sous-couches cellulaires : l'épithélium cornéen, le stroma, et l'endothélium cornéen, de la couche la plus en surface à la plus interne. Ces couches sont séparées par deux membranes, soit la membrane de Bowman et la membrane de Descemet (Figure 4). L'épithélium cornéen est composé de 5 à 7 couches de cellules squameuses stratifiées. La membrane de Bowman est une membrane acellulaire de collagènes et protéoglycanes. Le stroma représente environ 85 % de l'épaisseur de la cornée,

il est constitué de fibres de collagène et fibres élastiques, de protéoglycanes, de glycoprotéines, d'ions et de cellules appelées les kératocytes. La membrane de Descemet est faite de collagène et de laminine et est produite en continue par les cellules de l'endothélium. Les cellules de l'endothélium cornéen forment une monocouche de cellules métaboliquement très actives car elles jouent un rôle dans la turgescence du stroma cornéen [10].

En continuité de la cornée, la sclère forme le blanc de l'œil. C'est un tissu de support du globe oculaire [7].

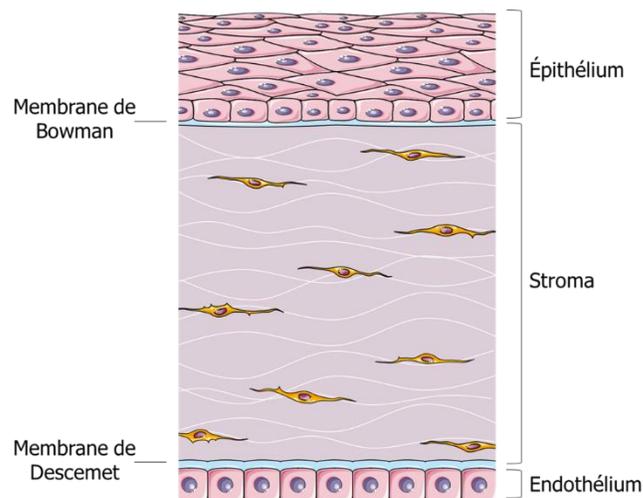


Figure 4 Structure de la cornée.

La cornée se compose de trois couches cellulaires soit l'épithélium, le stroma et l'endothélium, qui sont séparées par la membrane de Bowman et la membrane de Descemet.

2.1.2. L'iris

L'iris est pigmenté et donne la couleur à nos yeux. La couleur de l'iris dépend du type de mélanine produite par les mélanocytes et du ratio entre la mélanine plus foncée et celle plus claire (eumélanine et phéomélanine, respectivement), donnant une infinité de variations dans la couleur. Les muscles de l'iris permettent de contrôler la taille de l'ouverture de notre pupille, afin de laisser plus ou moins de lumière passer en fonction des conditions extérieures [7].

2.1.3. Le cristallin

Avec la cornée, le cristallin forme la seconde lentille focale de l'œil [7]. Ces deux structures font converger la lumière sur la rétine. La transparence du cristallin est primordiale à la transmission de la lumière à la rétine. Le cristallin tient son nom de la protéine cristalline qui s'y retrouve en grand quantité [11]. La courbure du cristallin change, grâce aux muscles ciliaires, afin de produire une image nette au niveau de la rétine, ce processus s'appelle l'accommodation [8].

2.1.4. La rétine

La rétine est une couche composée d'un ensemble complexe de cellules, soit des cellules ganglionnaires, des cellules bipolaires associées aux photorécepteurs et d'autres interneurons, les photorécepteurs (cônes et bâtonnets) et l'épithélium pigmentaire, d'antérieur à postérieur. La lumière doit donc traverser l'ensemble de la rétine avant d'atteindre les photorécepteurs (Figure 5). Au centre de la rétine on retrouve le nerf optique, duquel irradie de nombreux vaisseaux sanguins. Le nerf optique contient les axones des cellules ganglionnaires qui transmettent le signal visuel au cerveau. Adjacent au nerf optique se trouve la fovéa qui est au centre de la macula. Cette zone contient un condensé de photorécepteurs, leurs cellules bipolaires associées et les cellules ganglionnaires [12].

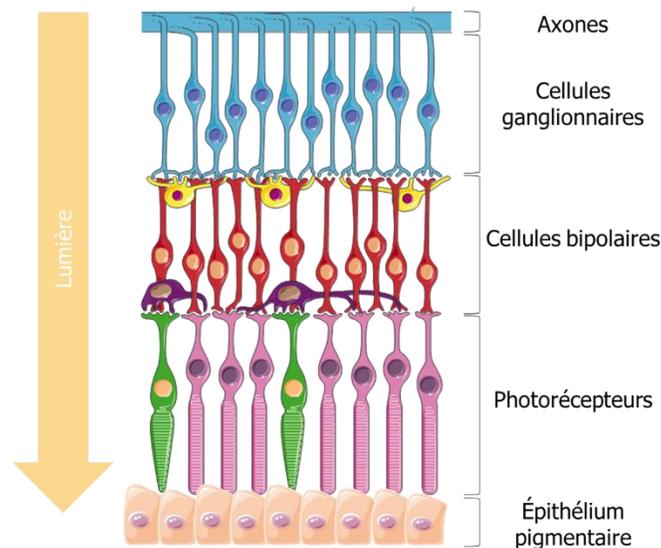


Figure 5 Structure de la rétine humaine et chemin de la lumière.

2.1.5. Le chemin de la lumière et sa transmission

La lumière va donc pénétrer la cornée transparente et être focalisée une première fois (première lentille focale). Elle va ensuite passer la chambre antérieure et atteindre la pupille, qui sera plus ou moins ouverte selon la contraction de l'iris, puis traverser le cristallin, soit la seconde lentille focale de l'œil. Finalement, elle va traverser l'humeur vitrée et atteindre la rétine, d'où le photon va être transformé en signal biochimique puis électrique, stimulant les neurones de la rétine (Figure 3) [8,12].

La transmission de la lumière va dépendre de sa longueur d'onde. En effet, la cornée filtre une grande majorité des UVB [9]. Le cristallin absorbe principalement les UVA [13], tandis qu'un pigment jaune au niveau de la macula filtre les derniers UVR qui pourraient avoir pénétré dans l'œil [12].

Les UVR, très énergétiques, sont capables de générer des dommages au niveau des structures de l'œil les plus touchées par ces rayons, soit la cornée et le cristallin. Il a été montré, par des études épidémiologiques, que les UVR sont un facteur qui contribue à différentes pathologies de la cornée (ptérygion, photokératite,...) [14,15]. Les UVR sont aussi connus pour induire des dommages au cristallin et accélérer la cataracte [16].

Il est néanmoins difficile de mesurer directement le rôle de l'exposition chronique que subit l'œil au cours d'une vie par manque de marqueurs de l'exposition solaire.

2.2. La peau

La peau est l'organe le plus grand du corps humain avec en moyenne 2m² de surface chez un adulte pour un poids d'environ 5 à 6 kg soit 6% du poids total d'un être humain. La peau est un lieu de contact entre l'environnement extérieur et notre corps. De ce fait, elle détient des fonctions fondamentales qui sont, entre autres, une fonction barrière et de protection contre les agents externes, tant les bactéries, virus, que les UVR et les produits chimiques. Elle représente aussi un système de capteurs de notre environnement (température par exemple) et par sa structure peut résister à des pressions et tensions physiques. La peau est de plus un lieu d'échange de neurotransmetteurs, d'hormones et de peptides. Tous ces aspects donnent à notre peau une fonction de garde de l'homéostasie du corps humain. La peau est composée

de différentes couches de cellules et peut être décomposée selon trois structures, soit l'épiderme, le derme et l'hypoderme, du plus externe au plus profond, respectivement (Figure 6) [17,18].

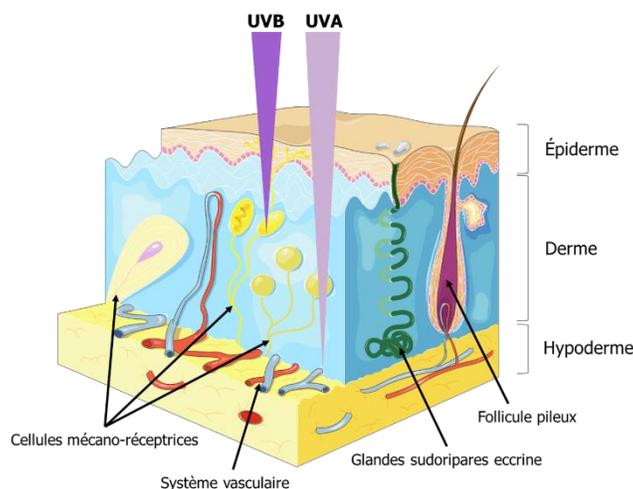


Figure 6 Structure de la peau et pénétration des UVA et UVB dans la peau.

La peau est composée de l'épiderme, du derme et de l'hypoderme, ainsi que des appendices (glandes et follicules pileux).

2.2.1. L'épiderme

L'épiderme est un épithélium stratifié, non-vascularisé mais innervé, et d'une épaisseur moyenne de 75 à 150 μm , et allant jusqu'à 600 μm d'épaisseur sur les paumes de la main et la plante des pieds. L'épiderme, qui donne sa fonction barrière à la peau, peut se décomposer en quatre sous-couches qui sont : la couche cornée, la couche granuleuse, la couche épineuse (ou spinieuse) et la couche basale, du plus externe au plus profond, respectivement (Figure 7).

La couche basale se compose principalement de kératinocytes ayant des propriétés de régénération semblables aux cellules souches, ainsi que leurs cellules filles, les cellules amplificatrices transitoires. Cette couche contient aussi des cellules de Merkel qui ont une fonction de mécanorécepteurs et font la liaison entre le système sensoriel nerveux et la peau. On y retrouve aussi des cellules de Langherans, des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T. Enfin, la couche basale contient les mélanocytes. Ceux-ci sont distribués dans la couche basale à raison d'un mélanocyte pour dix kératinocytes environ. Ils produisent la mélanine, qui est redistribuée sous forme de mélanosome aux

kératinocytes de la couche basale et supra-basale, leur donnant une protection contre les UVR [17,18]. Les cellules de la couche basale sont attachées à une membrane basale appelée jonction dermo-épidermique. Les kératinocytes se lient à cette membrane à l'aide d'hémidesmosomes composés de différents couples d'intégrines qui sont liés, à l'extérieur des cellules, aux laminines de la membrane basale, et à l'intérieur de la cellule, aux filaments intermédiaires de kératine [19]. Le maintien des cellules sous forme d'épithélium se fait par des liaisons inter-cellulaires, les desmosomes, qui lient aussi les filaments intermédiaires de kératine.

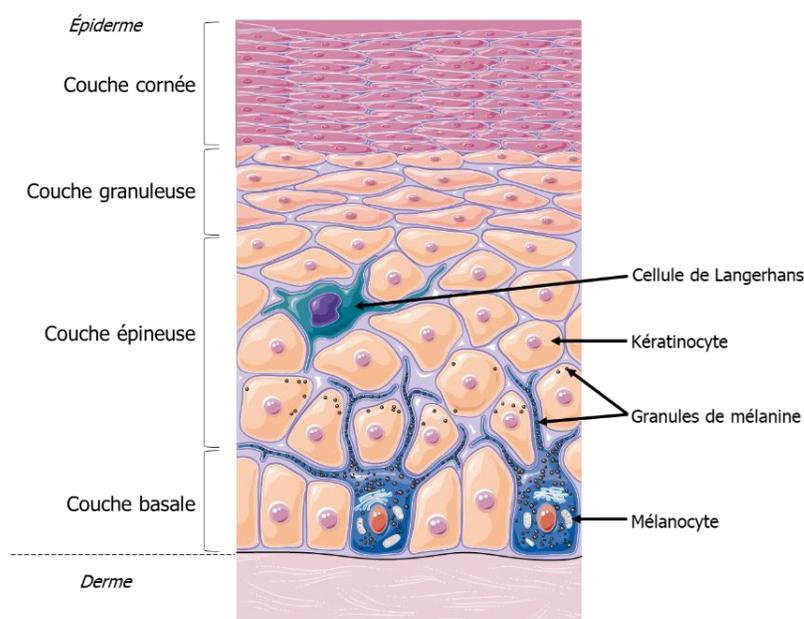


Figure 7 Structure de l'épiderme et cellules le composant.

Les kératinocytes, poussés par division polarisée vers l'extérieur, et par différenciation des cellules basales, vont ensuite former la couche épineuse de l'épiderme. Elle comprend huit à dix couches de kératinocytes qui ont des capacités limitées de division, ainsi que des cellules de Langerhans et les dendrites des mélanocytes de la couche basale. La différenciation des kératinocytes vers des cellules matures est marquée par un changement des couples de kératines formant les filaments intermédiaires de kératine, passant de K5-K14 dans la couche basale à K1/K10 et K2/K11 dans les couches suivantes. Les kératinocytes différenciés, incapables de se diviser, vont ensuite former la couche granuleuse. Elle est composée de trois à cinq couches de kératinocytes qui s'aplatissent lorsque poussés vers la surface. Le noyau et les organelles de ces cellules se cassent et leur membrane devient imperméable. Ces

cellules forment ensuite la couche cornée, elles sont non-viables mais sont actives biochimiquement, et sont appelées cornéocytes. La couche cornée est composée de quinze à trente couches de cornéocytes. Les cellules les plus en surface sont imbriquées dans une matrice lipidique composée principalement de sphingolipides, céramides, cholestérols, des acides gras saturés et des lipides non polaires. Sur cette couche est aussi déposée une couche de sébum, elle aussi riche en acide gras et lipides non-polaires, produite par les glandes sébacées. La couche cornée et le sébum, forment une barrière contre les facteurs externes et les pathogènes, et maintiennent l'hydratation de l'épiderme [20]. Les kératinocytes les plus en surface se détachent par un processus de desquamation, principalement dû à la dégradation contrôlée des cornéodesmosomes, qui forment des liaisons spécifiques entre les cornéocytes de la couche cornée. Le cycle de différenciation/maturation puis desquamation des kératinocytes dure en moyenne 30 jours [21,22].

2.2.2. Le derme et l'hypoderme

Sous l'épiderme, se trouve le derme. Ces deux couches cellulaires sont reliées par la jonction dermo-épidermique. Cette jonction se compose de collagène de type IV, VII, et XVII qui forme un assemblage avec les laminines, le nidogène et des protéoglycanes comme le perlécane. Les laminines sont d'origine épidermique, tandis que le nidogène est produit par les fibroblastes dermiques. Les kératinocytes sont reliés aux laminines par liaison des intégrines de leurs hémidesmosomes au collagène de type XVII. Le nidogène et le perlécane lient ensuite les laminines au collagène IV. Le derme s'ancre dans la jonction dermo-épidermique par des structures de collagène VII qui lient le collagène IV et le collagène dermique I et III (Figure 8). Cette jonction a un rôle important dans la rétention et la filtration de molécules entre le derme et l'épiderme, et donc dans leur communication, en plus d'une fonction structurale [19,23].

Des replis de l'épiderme dans le derme et du derme dans l'épiderme forment ce que l'on appelle le derme papillaire. En dessous se tient le derme dit réticulaire, qui contient des composants similaires au derme papillaire mais présents en proportions différentes. Le derme est composé principalement de fibroblastes de peau et d'une matrice extracellulaire dense et élastique, dans laquelle se trouve des macromolécules bioactives (Figure 8) [17,18]. On retrouve également au sein du derme des cellules d'origine hématopoïétique, soit des

mastocytes et des macrophages, ainsi que d'autres cellules immunitaires [24]. Le derme est vascularisé, innervé, possède un système lymphatique et contient de nombreux appendices (glandes, structures kératinisées, récepteurs sensoriels, follicule pileux...). Le derme réticulaire est plus dense que le derme papillaire mais contient moins de fibroblastes que celui-ci [17,18].

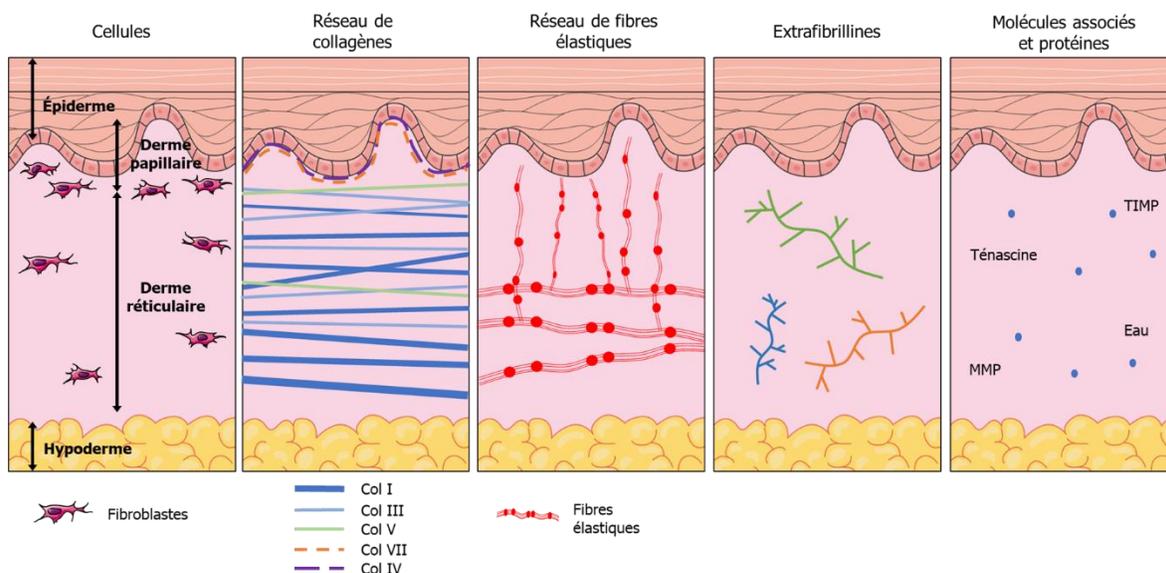


Figure 8 Composition du derme.

Le derme contient différentes cellules dont des fibroblastes qui produisent la matrice extracellulaire, composée de collagène, fibres élastiques, macromolécules et protéines.

Le collagène correspond environ à 90% des protéines totales du derme. Arrangés en fibrilles, non-fibrillaires ou transmembranaires, les différents types de collagène forment un réseau qui résiste aux forces de tension et de pression. Le derme est composé principalement des collagènes fibrillaires de type I (80-90%), III (8-11%) et V (2-4%). Toutefois, une multitude d'autres collagènes forment des ponts entre le collagène et les macromolécules créant le réseau qu'est le derme [25]. Le collagène est principalement produit par les fibroblastes mais est assemblé en intra et/ou extracellulaire par des étapes complexes. De manière simplifiée pour le collagène fibrillaire, le polypeptide précurseur est formé de chaînes α qui subiront un ensemble de modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Ces modifications vont permettre le repli ensemble de trois chaînes α formant la triple hélice du collagène. Cette hélice est sécrétée dans l'espace extracellulaire sous forme de procollagène. Suite à des clivages par des amino/carboxyl-terminal

protéinases, les triples hélices s'alignent et forment des fibres. Les fibres sont stabilisées entre elles et avec d'autres molécules par des liaisons covalentes. Le réseau est assemblé par ajout de liaisons entre les fibres de collagènes et des macromolécules comme des protéines associées (ténascine-X dans le derme réticulaire et ténascine-C dans le derme papillaire par exemple [26]) et des molécules de signalisation comme des cytokines ou des facteurs de croissance [23].

L'élasticité du derme est conférée par les fibres élastiques composées d'élastine et de protéines microfibrillaires associées comme les protéines fibrillines et fibulines. L'élastine est produite par les fibroblastes avoisinants. L'ensemble des fibres forme un réseau qui est orienté en parallèle de la surface de la peau dans le derme réticulaire. Les fibres s'affinent vers le haut du derme réticulaire et un autre ensemble de fibres part à la perpendiculaire de la surface de la peau et rejoint la jonction dermo-épidermique (Figure 8). Ces fibres représentent 2 à 4% de la masse sèche du derme [27].

D'autres macromolécules très actives forment le derme, souvent regroupées sous l'appellation extrafibrilline, soit des protéoglycanes, des glycoprotéines (comme les laminines et ténascines), de l'eau et des glycosaminoglycanes (GAG) comme l'acide hyaluronique (Figure 8). Ces macromolécules peuvent être impliquées dans l'adhésion et la migration cellulaire, l'élasticité du derme ou la communication inter-cellules. L'acide hyaluronique joue un rôle dans la rétention de l'eau dans le derme et donc dans son hydratation [20,28].

La matrice extracellulaire est très dynamique. Les protéines de remodelage de la matrice sont présentes dans la matrice extracellulaire comme les métalloprotéinases (MMP), et leurs inhibiteurs appelés les TIMP (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) qui sont produits notamment par les fibroblastes et les kératinocytes (Figure 8) [29]. Ces enzymes jouent un rôle important dans le remodelage et la réparation des tissus, dans le développement, l'inflammation ou encore la migration et l'invasion tumorale. Il est aussi important de souligner que le clivage de la matrice extracellulaire peut augmenter la disponibilité de facteurs pris au piège dans la matrice (comme des facteurs de croissance) [28].

L'ensemble du réseau est non-seulement complexe mais intervient dans divers processus, comme le développement, la migration des cellules, la réparation des tissus, mais aussi la signalisation cellulaire en fonction des changements dans la matrice extracellulaire (par mécano-transduction). Les composants de la matrice sont reliés aux cellules par des récepteurs cellulaires qui sont principalement les intégrines, les récepteurs à domaines discoïdines, les récepteurs syndécans et glypicans. Ces récepteurs font le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette, permettant la transmission de la signalisation [23].

Les appendices sont nombreux à prendre racines dans le derme, parmi lesquels les glandes sudoripares eccrines, qui jouent un rôle dans la thermorégulation par la transpiration (composée d'eau et d'électrolytes), mais aussi la sécrétion de molécules. Les glandes apocrines sécrètent des hormones dès la puberté, tandis que les glandes sébacées produisent le sébum, des hormones et des lipides aux propriétés anti-microbiennes. Liés aux glandes sébacées, se trouvent toujours les follicules pileux [17,18].

Les fibroblastes dermiques peuvent être définis comme des cellules stromales qui sont à la fois les architectes et les cellules résidentes de la matrice extracellulaire. De ce fait, elles sont productrices des composants de la matrice et sont affectées par ces composants, notamment par la rigidité de la matrice. Les fibroblastes sont des cellules très malléables, tant dans leur forme que leurs fonctions, comme peut en attester leur rôle dans la fermeture de plaies [30]. Les fibroblastes de peau ne forment pas une population homogène mais hétérogène, avec les fibroblastes du derme papillaires exprimant des marqueurs différents que ceux du derme réticulaire [31]. Selon leur position dans le derme, ils produiront notamment différentes proportions et différents types de collagènes et molécules associées [26,32].

Sous le derme, mais sans franche séparation, se trouve l'hypoderme. Il est composé de tissu conjonctif, riche en adipocyte et très vascularisé. Il fait le lien entre la peau et les muscles et os sous-jacents [33].

2.2.3. Pénétration des UVR dans la peau

La pénétration des UVR dans la peau est dépendante de la longueur d'onde. En effet, les longueurs d'onde les plus grande, et donc les ondes les moins énergétiques pénétreront plus

profondément dans la peau (Figure 7). De ce fait, la pénétration des UVR est aussi dépendante de l'épaisseur du derme et de l'épiderme, mais aussi de la couleur de peau, qui varient d'une personne à l'autre. Les UVA pourraient ainsi pénétrer dans le derme au complet, tandis que les UVB s'arrêteraient au derme papillaire [34].

3. Effet cellulaire de l'absorption directe des UVR

Les UVR peuvent être absorbés par différentes molécules (chromophores) et entraîner des dommages aux cellules. L'ADN, dont le pic d'absorption est à 260 nm, est modifié directement par les UVC (200 -280 nm), les UVB (280 nm – 315 nm) et à un degré moindre par les UVA (315 nm – 400 nm) par transfert direct d'énergie. De plus, les UVR induisent la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui peuvent ensuite causer des dommages à l'ADN et à d'autres composants cellulaires (protéines, lipides...). Enfin, les UVR modifient la structure de la membrane plasmique et peuvent ainsi activer les récepteurs de mort cellulaires sans présence de leurs ligands. Dans cette section, nous nous intéresserons aux différents dommages cellulaires causés par les UVA et UVB.

3.1. Les dommages à l'ADN

3.1.1. Les dimères de pyrimidines

Les UVC et les UVB sont capables d'endommager directement l'ADN, le pic d'absorption de l'ADN se trouvant dans le domaine des UVC [4,5]. De ce fait, les UVB sont les principaux rayons, parmi les UVR se rendant à la surface terrestre, causant des dommages directs à l'ADN. Il existe trois types de dommages directement formés par l'absorption de l'énergie des UVB à l'ADN : les dimères cyclobutaniques de pyrimidines (CPD), les pyrimidines 6-4 pyrimidone (6-4PP) et leurs isomères appelés les photoproduits Dewars (Figure 9). Les UVR peuvent donc former des liaisons entre deux pyrimidines adjacentes, soit les thymines (T) et cytosines (C), formant ainsi des dimères TT, CT, TC ou CC. Les UVA ont aussi la capacité de former des CPD [35]. Il semblerait qu'une absorption directe des UVA par l'ADN soit possible et/ou que l'énergie soit donnée par un mécanisme de photosensibilisation, c'est à dire qu'un chromophore excité (en état triplet) par les UVR redistribuerait son énergie à l'ADN, formant les CPD [36–38].

Les CPD sont formés par deux liaisons covalentes au niveau du carbone 5 et du carbone 6 (C5-C6) de deux pyrimidines adjacentes, formant une structure à quatre côtés entre deux pyrimidines voisines. Les 6-4PP sont formés par ajout d'une seule liaison covalente entre deux pyrimidines voisines, soit entre le C6 côté 5' et le C4 côté 3' [39]. Les Dewars sont la forme isomère des 6-4PP. Les 6-4PP ont un pic d'absorption à 320 nm, ainsi sous l'influence d'une seconde irradiation soit d'UVB ou d'UVA, la lésion va changer de structure et s'isomériser [39,40].

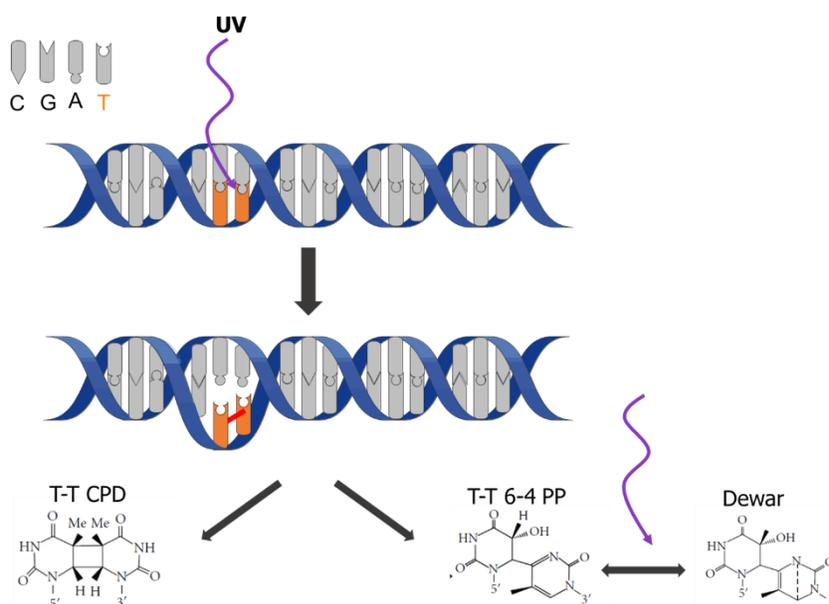


Figure 9 Formation des dimères de pyrimidines par les UVR.

Les UVR peuvent induire des CPD ou des 6-4 PP et leur isoforme Dewar. Ici, un exemple est présenté avec des dimères de thymine (T). Adapté de Rastogi, 2010.

Une des différences importantes entre ces dommages est la distorsion formée au niveau de l'ADN. La distorsion engendrée par les 6-4PP est plus grande que celle de leurs isomères Dewars, elle-même plus grande que celle formée par les CPD [40]. Les études s'accordent sur un degré de distorsion de l'ADN plus faible (entre 7° et 30° selon les méthodes de mesure [41,42]) pour les CPD contre une distorsion fluctuante mais très grande des 6-4PP allant jusqu'à 44° par rapport à sa conformation en structure de type B [41]. Cette différence a été récemment modélisée et serait due à une structure rigide pour les CPD (avec une double liaison covalente entre les pyrimidines) et une structure souple pour les 6-4PP qui pourraient

ainsi déformer la structure de l'ADN et créer une distorsion allant théoriquement de 26 à 54° [43].

Les 6-4PP et leur isomère les Dewars seront réparés plus rapidement que les CPD [39]. La dose et le type d'UVR jouent sur le type des photo-produits formés et sur leur vitesse de réparation. Ainsi les UVA forment principalement des CPD au niveau de thymines adjacentes (TT), tandis que les UVB forment principalement des CPD et des 6-4PP au niveau de TT ou de TC [35,44]. Le degré de distorsion aurait un effet important sur la reconnaissance des dommages et donc sur leur rapidité de réparation, ainsi une distorsion plus grande sera plus rapidement détectée et la lésion plus facilement réparée [45,46].

Il est connu que les UVR sont capables de créer des CPD par photosensibilisation d'un ou plusieurs chromophores [47–49]. De manière simplifiée, une molécule en état triplet (état excité mais instable) peut transférer son énergie à l'ADN et former des CPD. L'excitation d'une molécule peut se faire après une irradiation par photosensibilisation, ou sans irradiation par chemi-excitation [50]. Ainsi, des CPD peuvent être formés à l'obscurité (dark en anglais), on les appelle des « dark CPD ». L'équipe du Dr. Brash a montré en 2015, dans les mélanocytes de peau, que les UVR augmentent la formation de peroxynitrite (ONOO-) et la dégradation de la mélanine. Le peroxynitrite et la mélanine dégradée entraînent la formation d'une molécule à l'état triplet. L'énergie peut par la suite être déchargée au niveau de l'ADN et former un CPD. Les kératinocytes recevant de la mélanine produite par les mélanocytes, forment aussi des dark CPD [47,51].

Nous verrons plus loin que les CPD ont un potentiel mutagène.

3.1.2. Les dommages oxydatifs à l'ADN induits par les UVR

Les UVA et plus faiblement les UVB, induisent la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [52,53], soit principalement l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$) et l'anion superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$). Des espèces réactives de l'azote (RNS) sont aussi formées après irradiation par les UVR comme l'oxyde nitrique ($\text{NO}\cdot$).

Les ROS et RNS sont formés par photoactivation de chromophores lors de la réponse cellulaire aux UVR ou lors de l'inflammation. Par exemple, les UVB stimulent l'expression de l'oxyde nitrique synthase (NOS) ce qui augmente le $\text{NO}\cdot$ [54]. Les UVB sont aussi responsables d'une suractivation de la NADPH oxydase (NOX), entraînant une augmentation de la production de ROS [55]. Les UVA peuvent exciter des chromophores qui vont transférer leur charge à d'autres molécules, ce qui va induire la formation de H_2O_2 , $\text{OH}\cdot$ et $\text{O}_2^{\bullet-}$; ou ils peuvent photosensibiliser une molécule qui va directement donner son énergie à l'oxygène et ainsi produire de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) (Figure 10) [5,56].

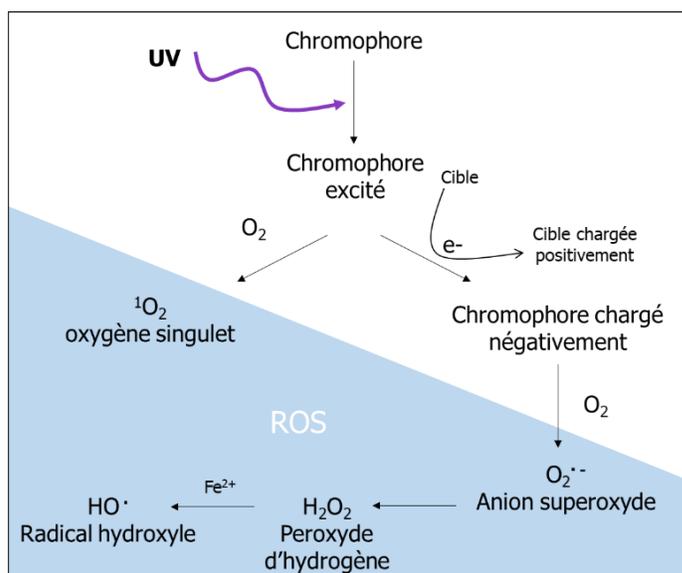


Figure 10 Formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les UVR par photoactivation d'un chromophore.

Schéma adapté de Cadet, 2015.

Les UVR, par le biais de l'oxygène singulet, entraînent l'oxydation des bases purines guanines en 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG). Les UVA peuvent aussi former des 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidoguanine (FapyGua) par le biais du radical hydroxyle. D'autres lésions (adduits, bases oxydées, réticulations de l'ADN) pourraient aussi avoir lieu mais en faible proportion. Les dommages oxydatifs à l'ADN ne correspondraient qu'à 1% des dommages totaux à l'ADN induits par les UVB [39,56]. Les 8-oxodG sont les principaux marqueurs de l'oxydation par les UVR au niveau de l'ADN, ils sont à l'origine de mutations de transversion guanine vers thymine ($\text{G} \rightarrow \text{T}$) [5].

Même si les UVA forment plus de 8-oxodG que les UVB, les CPD demeurent tout de même les dommages les plus formés par les UVA [37].

3.1.3. Les cassures simple brin et double brin à l'ADN liées aux UVR

Les UVR, par la formation de dimères de pyrimidines et par la génération de ROS, peuvent entraîner des cassures simple brin (SSB) ou double brin (DSB) dans l'ADN (Figure 11). En effet, bien que les UVR n'induisent pas de cassures directement à l'ADN, des dommages non-réparés lors de la réplication peuvent induire ce type de cassures. Le radical hydroxyle pourrait aussi induire des cassures simple brin, qui peuvent elles-mêmes mener à des cassures double brin [5,56].

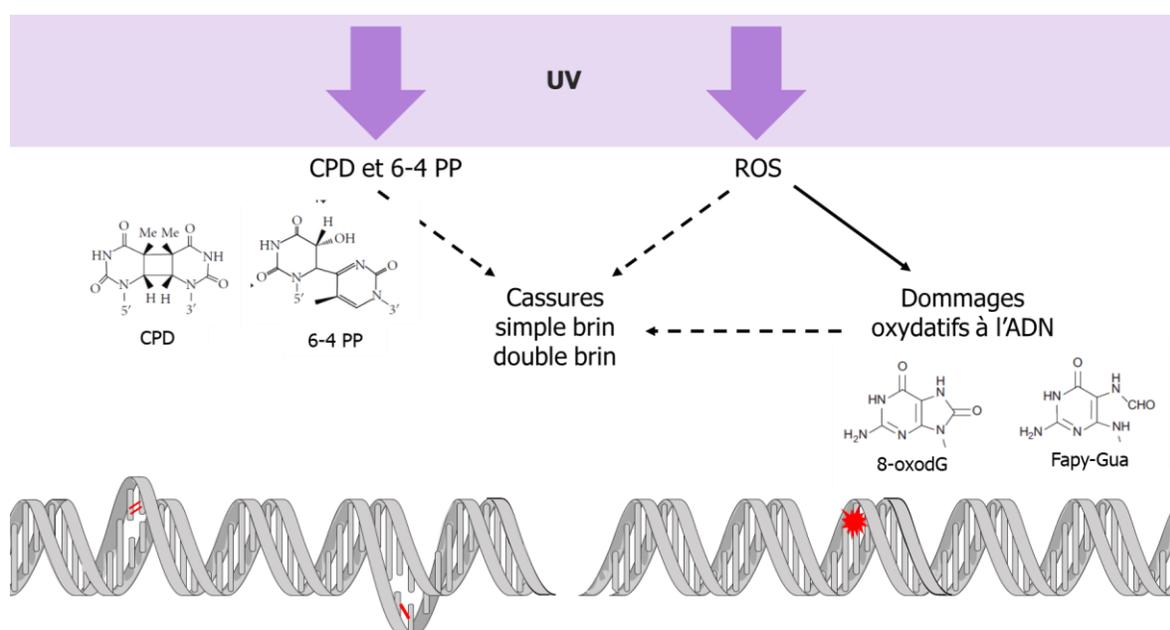


Figure 11 Différents dommages à l'ADN formés après exposition aux UVR.

Les UVR induisent la formation de CPD (Rastogi, 2010), la formation de ROS qui entraîne des dommages oxydatifs (Cadet, 2015), et des cassures simple et double brin.

Les voies de signalisation déclenchées par la formation des dommages directs et indirects à l'ADN seront discutées plus en détails dans la section 4.

3.1.4. Mutations signatures des UVR

Un agent mutagène, comme les UVR, va générer un ensemble de mutations parmi lesquelles certaines seront spécifiques à ce mutagène et d'autres seront non-informatives, c'est-à-dire qu'elles peuvent être produites par différents agents mutagènes. La formation de lésions à l'ADN peut entraîner une mutation, mais toutes lésions n'entraînent pas forcément de mutations. Ainsi, une mutation signature doit permettre de retrouver le mutagène à l'origine de ces mutations et doit lui être spécifique. De plus, pour reconnaître des mutations signatures, il est nécessaire qu'elles soient suffisamment fréquentes dans l'ADN pour qu'elles ne soient pas dues au hasard.

Ainsi, la signature mutationnelle des UVR est la transition d'une cytosine vers une thymine (C→T) à un site di-pyrimidique et/ou la double transition CC→TT. Ces mutations signatures ont été notamment retrouvées dans le gène p53 des carcinomes basocellulaires et spinocellulaires, ainsi que dans l'oncogène RAC1 de mélanomes [57,58]. De plus, afin de confirmer que les UVR sont le principal mutagène, D. E. Brash recommande de vérifier la prévalence des substitutions C→T à des sites di-pyrimidiques (et CC→TT), mais aussi de vérifier l'absence d'autres types de mutations non-liées aux UVR [59].

Nous verrons maintenant comment les dommages à l'ADN induits par les UVR peuvent entraîner la mutation C → T. Les UVR forment principalement des CPD, qui par leur distorsion relativement faible sont réparés plus lentement, tandis que les 6-4PP et Dewars formés sont rapidement pris en charge par le système de réparation de l'ADN (section 3-1-1). Nous nous intéresserons donc aux CPD, qui ont de ce fait un potentiel mutagène plus important. Les UVB induisent des CPD aux niveaux des TT, puis des TC, et en moindre quantité au niveau des CT et CC [37,60]. Pourtant les UVR induisent principalement des transitions C→T. Deux mécanismes connus peuvent entraîner ces transitions (Figure 12). Tout d'abord, les bases cytosines sont prônes à des déaminations, celles-ci sont peu fréquentes hors dommages mais la formation d'un dimère de pyrimidines augmente grandement la déamination des cytosines, créant une base uracile (U) [61]. Une ADN polymérase spécifique, la polymérase η (pol η), dite translésionnelle, est capable de passer par-dessus (« bypass ») un CPD. Celle-ci est considérée comme fidèle et induit peu d'erreur [62], elle insère une base sur le brin opposé du dommage. La pol η va ainsi traiter l'uracile

(soit la cytosine déaminée) comme une thymine et insérera une adénine (A) face à l'uracile. À la réplication suivante un T sera mis en face du A, créant ainsi la transition C→T et donc la mutation. De plus, les UVB induisent préférentiellement des CPD au niveau d'une cytosine méthylée (5-méthylcytosine) [63,64]. La déamination d'une cytosine méthylée donne une thymine, entraînant directement la transition C →T. La pol η insérera un A en face du T [65].

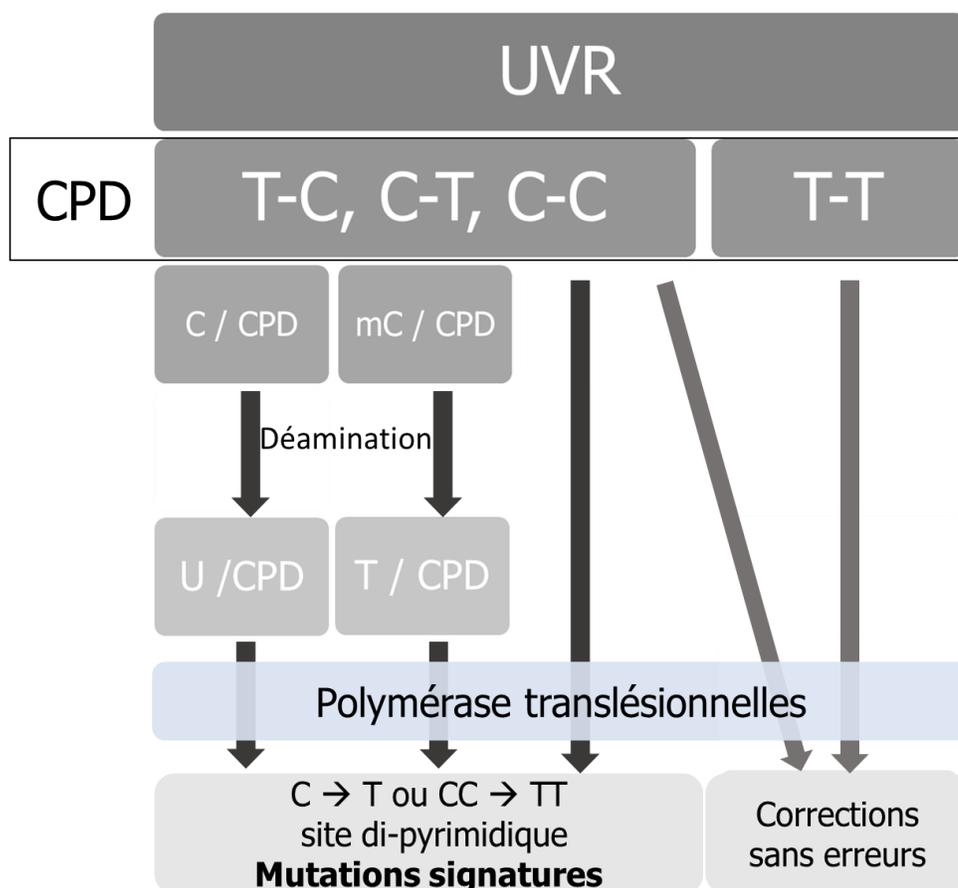


Figure 12 Mécanismes menant aux mutations signatures des UVR.

Les mutations signatures des UVR sont des substitutions C→T (ou CC→TT) au niveau de sites di-pyrimidiques. Ici l'exemple est pris pour des dommages de types CPD causés par les UVR, menant soit à des mutations signatures ou menant à une correction sans erreur du dommage.

Le deuxième mécanisme est lié à un ensemble de polymérases translésionnelles, dites prônes aux erreurs (dont pol kappa et pol zêta [62]) (voir section 4-2-2 pour les détails sur les polymérases translésionnelles). Celles-ci agissent selon un mécanisme d'insertion et extension des nucléotides face à la lésion. Elles suivent la règle du A et ajoutent une (ou plusieurs) adénine(s) face à la lésion. Cela donne deux cas, soit un A face à un T, ou un A

face à un C dans un CPD. Dans le cas d'un A face à un T, la séquence d'ADN ne sera pas changée à la prochaine réplication. Lorsqu'un A est placé face à un C, la réplication suivante entraînera la mutation signature des UVR, soit un T sera mis face au A, engendrant une substitution C → T au niveau d'un site di-pyrimidique [66].

3.2. Dommages cellulaires et dommages oxydatifs

Les UVR sont absorbés par des chromophores dans la cellule et sont ainsi capables de créer des dommages cellulaires, tels que des dommages à l'ADN comme vu précédemment. L'absorption de l'énergie par ces chromophores peut directement les endommager, ou la formation d'espèce réactive de l'oxygène (ROS) par les UVR peut induire des dommages oxydatifs, non seulement à l'ADN, mais aussi à différentes molécules dont les protéines, les lipides, ou encore l'ARN. Nous aborderons ici les dommages induits par les UVR, majoritairement liés à la formation de ROS, de différents composants dont les protéines, la matrice extracellulaire, les lipides, les ARN et les mitochondries (Figure 13).

3.2.1. Les protéines

Les protéines peuvent être endommagées par absorption directe de l'énergie des UVR, soit au niveau de leur chaîne aminée ou au niveau de groupements associés qui agissent comme chromophores. Les flavines associées aux protéines peuvent passer en état excité (état triplet) suivant l'action des UVR. Les acides aminés aromatiques (tryptophane (Trp), tyrosine (Tyr) et phénylalanine (Phe)) et les ponts disulfures absorbent les UVR.

Les protéines peuvent aussi être endommagées indirectement, c'est-à-dire par l'oxygène singulet généré par transfert d'énergie après une irradiation aux UVR, principalement aux UVA. Les acides aminés absorbants le plus rapidement l'énergie de l'oxygène singulet sont le tryptophane (Trp), la tyrosine (Tyr), l'histidine (His), la méthionine (Met), et la cystéine (Cys). Ces acides aminés, et les protéines les contenant, vont subir des changements structuraux sous l'influence de l'oxygène singulet, dont la formation de différents résidus et radicaux, de clivages aux niveaux des chaînes peptidiques, de réticulations (crosslink) ou d'agrégats [67,68].

L'oxydation des protéines peut entraîner des changements de leurs propriétés physiques et chimiques, comme une altération de leurs propriétés mécaniques, un dysfonctionnement de l'activité enzymatique, un changement de conformation, des modifications des propriétés optiques, et des changements dans la liaison avec des co-facteurs [67].

3.2.2. Les composants de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire du derme est composée en partie de différentes protéines formant un assemblage dans lequel sont incluses les cellules du derme, comme vu précédemment (section 2-2). Ces protéines, comme les protéines intracellulaires, peuvent être sensibles à des radiations UV si elles possèdent un nombre suffisant d'acides aminés absorbant les UVR. Ainsi, la fibronectine et les microfibrilles de fibrilline pourraient être endommagées par les UVB directement, soit par formation d'agrégats ou par dégradation [69]. La matrice extracellulaire est connue pour subir des dommages induits par les UVR, surtout par l'effet chronique des UVR menant au photo-vieillessement de la peau. Le derme est principalement touché par des changements structuraux. Ceux-ci sont reliés à l'activation de facteurs de transcription par les UVR qui conduisent à une augmentation de l'expression de certaines MMP [70,71]. La signalisation cellulaire menant aux dommages à la matrice extracellulaire par les UVR sera brièvement examinée dans la section 6-4.

3.2.3. Les ARN

Au même titre que l'ADN, l'ARN peut être endommagé par les UVR. Les dommages de types dimères de pyrimidines ne semblent pas être formés par absorption directe de l'énergie des UVR au niveau de l'ARN *in vitro* [72]. En revanche, des dommages oxydatifs à l'ARN ont été observés dans des fibroblastes de peau sous l'action des UVA, soit l'hydroxylation des guanine (8-OHdG) [73]. Les UVB ont aussi la capacité d'induire des dommages à l'ARN dans les kératinocytes, notamment à des ARN non-codants qui, une fois endommagés par les UVB, participeraient à la signalisation cellulaire menant à l'inflammation [74]. En plus de dommages oxydatifs à l'ARN, les UVR peuvent induire des dommages aux ribosomes et des réticulations (crosslink) entre les molécules d'ARN. L'ensemble de ces dommages peut entraîner des erreurs lors de la traduction et une diminution de la fonction ribosomale (revue

dans [75]). Les dommages à l'ARN induits par les UVR dans les cellules humaines restent majoritairement à identifier.

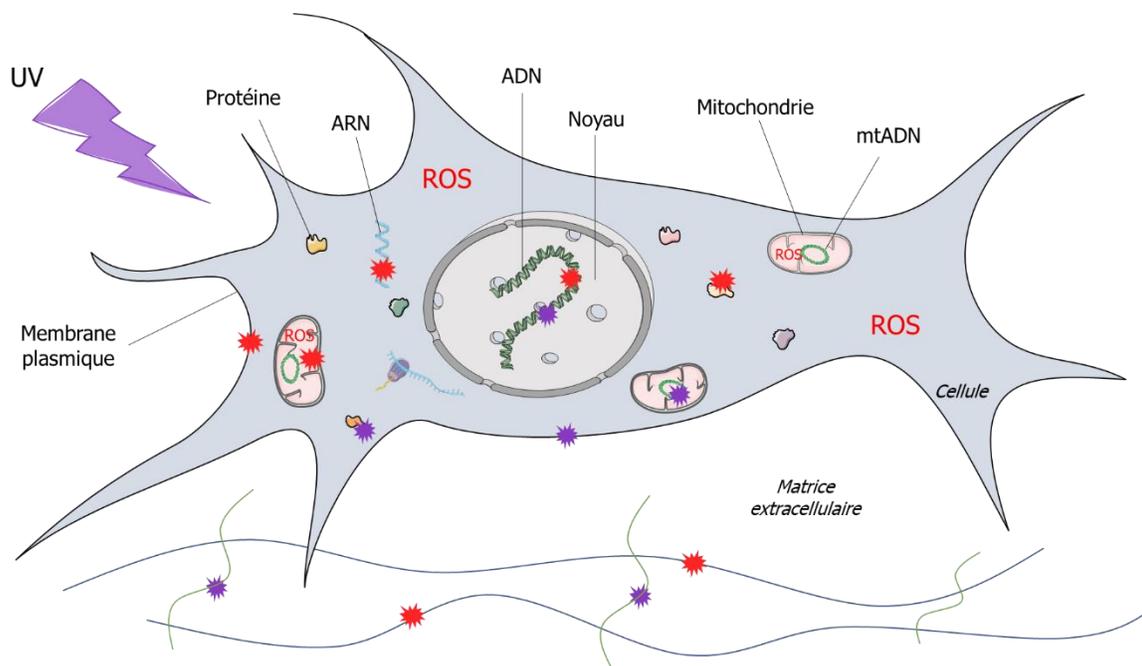


Figure 13 Dommages cellulaires induits par l'exposition aux UVR.

Ces dommages regroupent des dommages directs induits par l'énergie des UVR (marquage violet), et des dommages indirects passant par la formation des ROS (marquage rouge). On retrouve des dommages aux acides nucléiques (ADN nucléaire et mitochondrial, ARN), aux protéines (cellulaires, membranaires et extracellulaires) et aux lipides.

3.2.4. Les lipides et membranes

Les membranes cellulaires sont constituées principalement d'un ensemble de lipides et de protéines insérées ou en contact avec la membrane. Les protéines membranaires peuvent être endommagées par les UVR comme vu précédemment. Les lipides sont sensibles à l'oxydation. La formation de ROS par les UVR, principalement par les UVA, peut donc induire la peroxydation des lipides [76]. Les lipides peroxydés peuvent se décomposer en produits toxiques pour la cellule, comme les aldéhydes (revue dans [77]). La photoactivation des lipides mène à l'activation de voies de signalisation cellulaire au niveau de la peau, notamment à l'inflammation [78,79].

3.2.5. Les mitochondries

Les mitochondries sont composées d'une membrane externe et une membrane interne, séparées par l'espace intramembranaire. Au sein de la mitochondrie se trouve la matrice interne, qui contient de l'ADN mitochondrial (ADNmt), des protéines et des enzymes, impliquées dans la phosphorylation oxydative et la production d'ATP [80]. Les UVR sont capables de former des dommages de types dimères de pyrimidines dans l'ADN mitochondrial alors que le système de réparation de ces dommages n'est pas présent dans les mitochondries [81,82]. De plus, l'ADN mitochondrial se trouve dans un milieu propice à la formation de ROS car la production d'ATP nécessite la mise en place d'un gradient de protons, atteint par transfert d'électrons. Sous condition normale, la chaîne respiratoire subit une faible fuite d'électrons formant des ROS. Les UVR induisent une augmentation de la production mitochondriale de ROS [83]. Ainsi, il a été montré que les UVR augmentent le nombre de mutations dans l'ADNmt. Certaines mutations (ponctuelles ou délétions) sont liées à l'exposition chronique aux UVR. Dans la peau, la prévalence de la délétion commune de 4977 pb, de la délétion de 3895 pb et de la transversion T414G, augmente dans les zones les plus irradiées (revue dans [84]). Il est à noter que de nombreuses mitochondries et donc quantités de copies d'ADNmt se trouvent dans chaque cellule. La cellule détient donc un mélange de mitochondries contenant des génomes avec différents statuts mutationnels (hétéroplasmie). Les mutations peuvent s'accumuler avec l'âge et sous l'effet de la lumière. Elles se trouvent ainsi en différentes proportions dans différents tissus, formant un ensemble de marqueurs du vieillissement et/ou du photo-vieillessement [85–88]. Dans l'annexe 1, nous nous intéressons à l'accumulation de la transversion T414G dans différentes structures de l'œil en lien avec l'exposition à la lumière solaire.

3.3. Activation des récepteurs de mort cellulaire

Les UVR sont donc capables de modifier directement différents composants cellulaires (ADN, ARN, protéines et lipides). Nous verrons dans cette partie que les UVR activent les récepteurs de mort cellulaire en absence de leurs ligands en induisant leur agrégation.

Les récepteurs de mort cellulaire (Death Receptor, DR) sont une sous-famille de récepteurs faisant partie de la superfamille des TNFR (tumor necrosis factor receptor), des récepteurs

liant des facteurs de nécrose tumorale (TNF). Les récepteurs de mort cellulaire comprennent le récepteur de FAS (FASR/CD95/APO-1), TNFR 1, TRAIL-R1 (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 / DR4), TRAIL-R2 (DR5/APO-2/KILLER), ainsi que DR3 et DR6.

La liaison de ces récepteurs à leurs ligands (protéines de la famille TNF, solubles ou membranaires) et/ou l'oligomérisation des récepteurs en absence de ligands, induit des changements conformationnels au sein des DR. Ces changements initient la liaison à des protéines adaptatrices possédant un domaine de mort (Death Domaine, DD) comme les protéines d'échafaudages FADD (FAS Associating protein with Death Domain) et TRADD (TNFR1-Associated Death Domain). Celles-ci se lient aux récepteurs par leur domaine DD, et agissent comme des plateformes de recrutement pour d'autres protéines. Le signal de mort apoptotique passe principalement par FADD qui recrute ensuite les pro-caspases 8 et 10 par leur domaine effecteur de mort (Death Effector Domain, DED) [89]. Ce complexe est appelé complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex) et mènent à l'activation des caspases

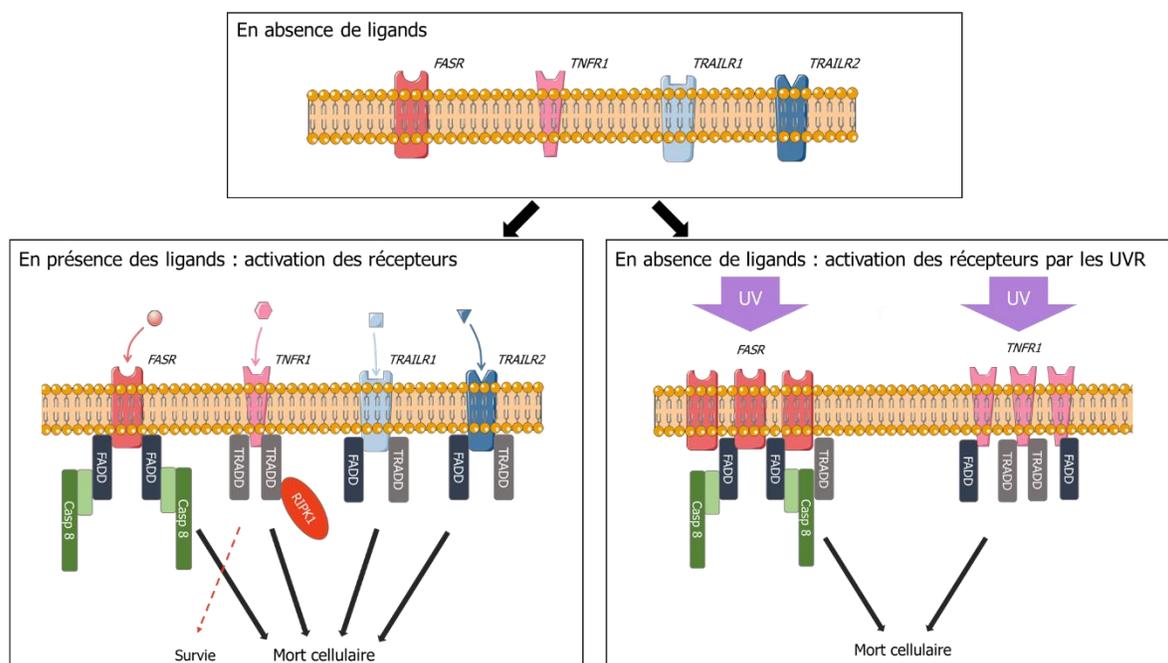


Figure 14 Activation des récepteurs de mort cellulaire.

Les récepteurs de mort sont activés en présence de leurs ligands ou par les UVR qui induisent leur oligomérisation en absence des ligands.

effectrices 3, 6 et 7 conduisant à la mort cellulaire apoptotique par amplification du signal (Figure 14) [90].

Les récepteurs de mort cellulaire peuvent former d'autres complexes avec des protéines comme RIPK1 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1) et activer d'autres voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire, la production de cytokine, l'inflammation ou encore la prolifération. RIPK1 est un exemple de protéine clé, qui selon ses modifications post-traductionnelles, induit l'apoptose, la nécroptose ou la survie cellulaire [90,91]. Ces voies seront développées dans la section 5.

Il a été mis en évidence que les UVR sont capables d'activer certains récepteurs de mort tel que FASR et TNFR1 en absence de leurs ligands (Figure 14) [92]. Cette activation serait le résultat de la formation de radeaux lipidiques par les UVR ou du moins d'une agrégation des récepteurs. Cette forte concentration de récepteurs s'oligomériserait et propagerait le signal apoptotique [93–95]. Les UVR, par le biais de changements physiques de la membrane plasmique, notamment la concentration en cholestérol en ce qui concerne l'activation de FASR [96], activent les voies de signalisation cellulaires.

En conclusion, les UVR induisent principalement des dommages à l'ADN par transfert direct d'énergie sous forme de dimères de pyrimidines. Les UVR, particulièrement les UVA et plus faiblement les UVB, induisent aussi des ROS et des dommages oxydatifs à différents composants cellulaires (protéines, lipides, ARN, ADN), ainsi que l'activation des récepteurs de mort cellulaire par des changements structuraux dans la membrane plasmique.

4. Activation de voies signalétiques par les UVR

Les UVR induisent différents dommages et changements cellulaires et extracellulaires. Ces changements peuvent être perçus par la cellule et déclencher différentes voies de signalisations aboutissant à diverses réponses cellulaires. Les cellules vont ainsi intégrer de multiples signaux. La réponse cellulaire aux UVR variera en fonction de la dose appliquée, de la durée du stimulus, du type d'UV (A, B ou C) ou encore de l'environnement. Dans cette section nous aborderons certaines voies de signalisations connues pour être activées par les

UVR, notamment les voies activées lors de la réponse aux dommages à l'ADN (DNA damage response, DDR), qui sont les principaux dommages causés par les UVB.

Nous discuterons ainsi de l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN, l'activation de facteurs de transcriptions, la sénescence et les modifications du métabolisme induits par les UVR. Dans la section 5, nous nous focaliserons sur les voies de mort cellulaires puisqu'elles constituent le cœur de cette thèse.

4.1.L'arrêt du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire eucaryote est composé de la mitose (phase M), soit la séparation des chromatides sœurs aboutissant à la formation de deux cellules génétiquement identiques, et l'interphase, soit la préparation de la cellule à la division. L'interphase se compose de trois phases dont la phase de réplication de l'ADN, phase S, ainsi que deux phases de croissance cellulaire, la phase G1 précédant la réplication de l'ADN, et la phase G2 précédant la mitose. Ainsi le cycle se compose des phases $G1 \rightarrow S \rightarrow G2 \rightarrow M$. Le processus de division cellulaire est finement régulé afin d'éviter toutes instabilités génomiques que causeraient des manquements lors de la réplication de l'ADN ou de la séparation des chromatides sœurs. Ainsi différents points de contrôles existent afin de s'assurer à la fois d'une croissance cellulaire suffisante, d'un génome non-endommagé, d'une bonne réplication de l'ADN et d'une séparation adéquate. Une des formes de régulation du cycle cellulaire passe par des modifications post-traductionnelles au niveau des protéines cyclines, qui contrôlent l'avancement du cycle cellulaire, notamment par des kinases appelées CDK et leurs inhibiteurs parmi lesquels on retrouve p21 et p16. Les cellules peuvent aussi être dans un état quiescent, métaboliquement actives sans divisions cellulaires, appelé G0 [97]. Les fibroblastes de peau sont en phase G0 *in vivo*, et rentrent dans le cycle cellulaire lorsque nécessaire, par exemple lors d'une blessure [98,99].

Les différents points de contrôle des phases G1 et G2, permettent l'arrêt du cycle cellulaire ou son ralentissement lors de dommages à l'ADN afin de réparer ces dommages ou, si les dommages sont trop importants, déclenchent les voies de mort cellulaire. Ainsi, les dommages induits par les UVR (CPD et 6-4PP) peuvent entraîner un arrêt du cycle cellulaire. Leur réparation et l'avancement du cycle cellulaire sont donc intimement liés.

Lorsque les cellules progressent en phase S (réplication de l'ADN) après une exposition aux UVR, la fourche de réplication est bloquée par les dommages à l'ADN induits par les UVR, soit les CPD et 6-4PP principalement. Le blocage de la fourche va alors entraîner l'activation de la voie ATR-Chk2 stabilisant la fourche de réplication jusqu'à réparation du dommage ou son « bypass » [100].

Une irradiation aux UVR lorsque les cellules se trouvent dans une autre phase du cycle créera des dommages qui seront détectés par des protéines spécifiques, comme nous le verrons dans la section suivante. Lorsque le dommage est détecté, le système de réparation des dommages induits par les UVR, soit la réparation par excision de nucléotides (NER), sera activé (voir section 4.2.1 pour les détails sur la NER). L'étape d'excision du dommage par des endonucléases forme un ADN simple brin court (25-30nt), qui sera rapidement pris en charge par les ADN polymérases. Il semblerait qu'une réparation trop lente, non complète ou altérée, entraîne la formation d'un ADN simple brin long sur lequel viendrait se fixer les protéines RPA (Replication Protein A) qui activent les points de contrôle et l'arrêt du cycle cellulaire, notamment en activant la protéine kinase ATR [101].

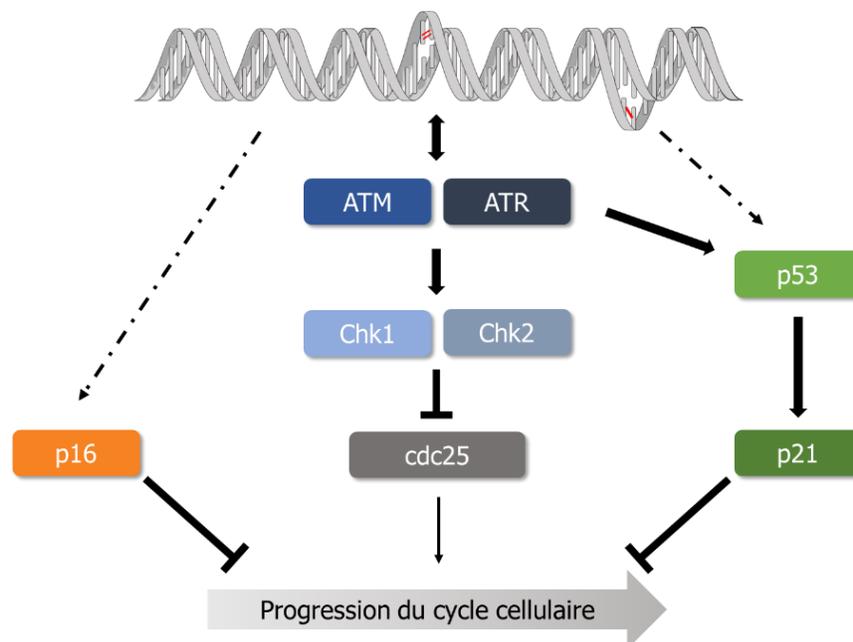


Figure 15 Mécanismes menant à l'arrêt du cycle cellulaire par les dommages à l'ADN induits par les UVR. Les dommages CPD et 6-4 PP activent les protéines ATR et ATM qui induisent l'arrêt du cycle cellulaire par voie dépendante ou indépendante de p53.

Il est connu que les kinases ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) et ATM (ataxia telangiectasia mutated) co-localisent avec les dommages UVR-induits et les protéines de réparation de la voie NER [102,103]. Deux voies de signalisations ont été proposées (Figure 15). Premièrement, ATR peut activer la protéine p53, un senseur de stress clé qui exerce une fonction suppresseur de tumeur, qui à son tour active p21. P21, un inhibiteur de CDK, va jouer sur les régulateurs du cycle cellulaire lors de la transition G1/S, soit les cyclines et kinase associées, et empêcher l'avancement du cycle cellulaire [104]. La seconde voie pouvant être activée par les UVR est la cascade de phosphorylation ATR/ATM-Chk1/Chk2, capable, indépendamment de p53 et p21, d'arrêter le cycle cellulaire en jouant sur une phosphatase appelée Cdc25 contrôlant l'avancement du cycle des phases G1 à S et G2 à M [102,105,106]. La protéine p16 pourrait contribuer à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 suivant une exposition non-létale d'UVR dans des cellules de peau [107].

Le lien entre la réparation des dommages à l'ADN induits par les UVR et l'arrêt du cycle cellulaire reste encore partiellement méconnu, d'autant que la réponse cellulaire semble varier selon le type cellulaire, la dose et le type d'UVR utilisés.

4.2. La réparation des dommages

Dans cette section nous discuterons principalement de la réparation des dommages à l'ADN de type dimères de pyrimidines induits par les UVR, soit les CPD et 6-4PP, car ils représentent la majorité des dommages induits par les UVB.

4.2.1. La réparation par excision de nucléotides (NER)

Les dimères de pyrimidines peuvent être détectés puis réparés par excision de nucléotides, soit la NER (Nucleotide Excision Repair). La NER est subdivisée en deux voies en fonction des protéines de détection des dommages activées (Figure 16). La voie TC-NER (Transcription-Coupled NER), soit la réparation NER couplée à la transcription, est initiée au niveau des gènes activement transcrits, lorsque l'ARN polymérase II se trouve bloquée par un dommage. Les protéines CSA et CSB (Cockayne syndrome) sont alors recrutées et s'en suit le processus de réparation commun aux deux voies. La voie GG-NER (Global Genome NER), soit la réparation NER du génome global est initiée lorsque les protéines

DDB1 et DDB2 (DNA damage-binding protein), et/ou XPC (Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group C) reconnaissent le dommage. La protéine XPC reconnaît les dommages à l'ADN grâce à la distorsion formée par ceux-ci. Cependant, comme les CPD déforment relativement peu l'ADN, le complexe DDB sert alors d'auxiliaire à XPC pour la reconnaissance des dommages induits par les UVR.

Une fois le dommage détecté, le complexe TFIIH (Transcription Initiation Factor II H) se lie au dommage. Le complexe est composé de dix sous-unités, dont deux hélicases, XPB et XPD, qui ont un rôle dans la vérification du dommage. Ayant une polarité opposée, les deux hélicases vont dérouler l'ADN autour du dommage. La protéine XPA détecte les nucléotides altérés sur l'ADN simple brin tandis que des protéines RPA (replication protein A) se lient à l'ADN simple brin non-endommagé pour le protéger. Après vérification, le dommage est enlevé par excision. Les endonucléases ERCC1/XPF et XPG vont inciser l'ADN proche du dommage (en 3' et 5' respectivement). La bonne coordination de l'excision nécessite la présence de XPA, XPG, et RPA. La protéine XPA joue un rôle prédominant dans la prise en charge du dommage, notamment car elle interagit avec de nombreuses protéines de la NER. Suite à l'excision du dommage, la brèche est comblée par des ADN polymérase, soit ADN Pol δ , ADN Pol ϵ ou ADN Pol κ , et des ligases, soit l'ADN ligase 1 ou 3 selon la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule (revue dans [108,109]).

Une des protéines interagissant avec la voie NER est la protéine PARP1 (poly-ADP ribose-polymerase 1). Elle fait partie des enzymes de PARylation, soit les enzymes capables d'ajouter une ou plusieurs chaînes d'ADP-ribose (PAR) sur une protéine cible en utilisant le NAD⁺ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide), ainsi PARP1 « PARyle » des protéines cibles. PARP1 est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire, dont la réparation des dommages et la mort cellulaire [110]. PARP1 est capable d'interagir avec XPA, DDB2 et les CPD directement [111–113].

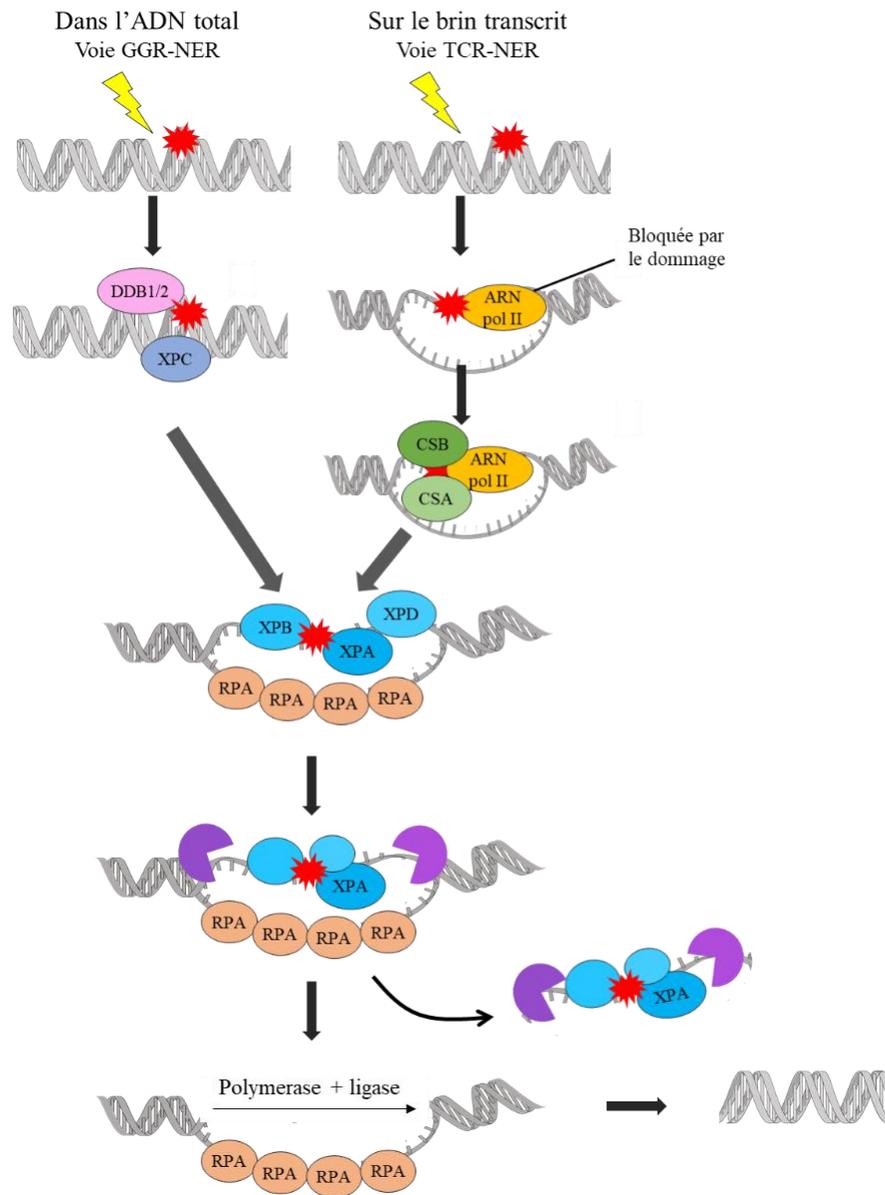


Figure 16 Réparation des dommages de type dimères de pyrimidines par la voie d'excision de nucléotides NER.

Adapté de Marteijn 2015.

4.2.2. La voie de contournement (bypass) par les ADN polymérase TLS

Les dommages de type dimères de pyrimidines ne sont pas forcément tous réparés par les voies de NER et le problème peut être « contourné » par des ADN polymérase spécifiques, les polymérase translésionnelles TLS (Translesion DNA synthesis).

Les TLS sont recrutées lorsque la fourche de réplication est bloquée au niveau d'un dommage ou qu'un ADN simple brin est présent. Elles sont capables de passer au-dessus du dommage et de répliquer l'ADN avec plus ou moins de fidélité. Ce système est considéré comme un mécanisme de tolérance des dommages [114]. Chez l'homme, les TLS présentes sont les polymérases η ($pol\eta$), ι ($pol\iota$), κ ($pol\kappa$), Rev1 et ζ ($pol\zeta$). La polymérase η est capable de contourner les dommages de type CPD lorsque la fourche de réplication est bloquée, elle insère des nucléotides face au dommage et étend la polymérisation en étant majoritairement fidèle [62]. Son importance est mise en évidence par la condition des patients XPV (xeroderma pigmentosum variant) qui sont atteints d'une mutation dans le gène encodant la polymérase η et dont le risque d'être atteint d'un cancer de peau est élevé [115–117]. $Pol\eta$ insère correctement des adénines face aux dimères de pyrimidines T-T, ce qui les rend peu mutagènes mais n'est en revanche pas capable de passer au-dessus des 6-4PP T-T [118]. Rev1 joue aussi un rôle lors du blocage de la fourche de réplication. L'hypothèse est qu'elle permet le recrutement de $pol\eta$ vers la protéine PCNA (proliferating cell nuclear antigen) au niveau du dommage. En effet, PCNA forme un anneau autour de l'ADN et augmente la processivité des ADN polymérases, elle permet aussi le recrutement des TLS au besoin [119]. En présence d'ADN simple brin, $pol\zeta$ est impliquée dans l'extension du brin d'ADN. Des travaux dans des cellules déficientes en voie de réparation NER (cellules XPC notamment) ont permis de mieux comprendre le rôle de $pol\eta$, Rev1 et $pol\zeta$ [120].

De même, des travaux dans des cellules XPV (déplétées en $pol\eta$) ont mis en évidence que les polymérases κ et ι sont capables d'insérer des nucléotides face aux CPD. La $pol\zeta$ vient par la suite étendre la polymérisation de l'ADN. C'est un système à deux polymérases, soit l'une qui se charge de l'insertion et l'autre de l'extension. Les polymérases κ , ζ et ι sont considérées prônes aux erreurs comparées à la polymérase η dans le cadre des dommages induits par les UV [62,121].

Les TLS permettent de tolérer les dommages en débloquent la fourche de réplication et/ou en comblant les ADN simple brin formés. Néanmoins, leur propension à induire des erreurs peut entraîner la formation de mutations dans l'ADN (discuté dans la section 3) qui auront plus ou moins d'importance selon le gène touché.

4.2.3. Réparation des dommages oxydatifs, des cassures simple et double brin

Brièvement, les UVA et UVB peuvent induire des dommages oxydatifs à l'ADN, mais aussi indirectement des cassures simple et double brin, par exemple, lors du blocage de la fourche de réplication. Ces dommages vont être pris en charge par les systèmes de réparation de l'ADN de la cellule. La BER (Base Excision Repair), soit la réparation par excision de bases peut notamment prendre en charge les bases endommagées par les ROS et les sites abasiques (perte d'une base). Les cassures simple brin sont réparés par la voie BER/SSBR (Single Strand Break Repair). Les cassures double brin sont réparées soit par la voie HR (Homologous Recombination) qui est la réparation par recombinaison homologue, soit par la voie NHEJ (Non-Homologous End Joining), c'est-à-dire la voie de recombinaison non-homologue. La voie HR utilise la chromatide sœur comme matrice afin de restaurer l'ADN, tandis que la voie NHEJ permet de joindre les deux extrémités de l'ADN cassé, ce qui peut entraîner une perte de bases comparativement à la séquence initiale [39].

4.3. Activation de facteurs de transcription par les UVR

Comme nous l'avons vu précédemment, les UVR induisent des dommages cellulaires, des ROS, et l'oligomérisation de certains récepteurs. Ces changements sont les premiers signaux du stress génotoxique induit par les UVR et seront traduits par l'activation des voies de signalisation cellulaire. Les dommages à l'ADN induisent les voies de réparation de l'ADN et l'arrêt du cycle cellulaire (sections 4-1 et 4-2) et ont un rôle dans la mort cellulaire comme nous le verrons par la suite. Les ROS et l'activation des récepteurs vont induire des voies de signalisation conduisant à l'activation de facteurs de transcriptions, c'est ce que nous aborderons ici brièvement.

4.3.1. Activation des kinases par les voies MAPK et PI3K

L'activation des voies MAPK et PI3K peut être induite par différent stimulus, soit suite à un stress cellulaire (formation de ROS, dommages cellulaires), soit dans un contexte basale, suite à l'activation des récepteurs de croissance.

Les MAPK (Mitogen-activated protein kinases) font partie de la famille des kinases spécifiques aux sérines/thréonines. La famille est subdivisée en trois sous-familles, soit les

protéines ERK, les protéines p38 et les protéines JNK. Les UVR sont capables d'induire les cascades de phosphorylations spécifiques à ces trois sous-familles, avec des particularités selon le type d'UV et le type cellulaire irradié. Les protéines MAPK sont impliquées dans une grande variété de réponses cellulaires dont la prolifération, la différenciation, la division, et les voies de survie et mort cellulaire (revue dans [122,123]). L'induction de JNK et de p38 par les UVR peut avoir un effet anti ou pro-apoptotique, dépendamment du contexte (type et dose d'UV), tandis que la voie ERK semble plutôt avoir un rôle anti-apoptotique [123].

Les UVR induisent aussi l'activation de la voie PI3K (phosphoinositide 3-kinases). Les kinases de cette famille convertissent le PIP2 (phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate). Le PIP3 active à son tour la protéine kinase Akt qui active notamment des protéines et facteurs de transcription impliqués dans la survie cellulaire. Cela a par exemple été observé dans un cas particulier : à faible dose, les UVB induisent la voie PI3K-Akt et empêchent la mort de fibroblastes détachés de la matrice extracellulaire [124].

4.3.2. Activation des facteurs de transcriptions par les UVR: AP-1, Nrf2, NFκB

L'exposition aux UVR active, par la voie de signalisation des MAPK et de PI3K, les facteurs de transcription AP-1, Nrf2 et NFκB.

NFκB est une famille de facteurs de transcription impliquée dans la régulation de l'inflammation dont la production de cytokines, la réponse immunitaire, la survie et la prolifération cellulaire, ainsi que la réponse au stress. Chez l'Homme, les membres de cette famille comprennent RelA (p65), c-Rel, RelB et NF-κB1 et B2. Dans un contexte de stress, les protéines NFκB sont libérées de leurs inhibiteurs et transloquent au noyau afin de lier et activer la transcription de leurs gènes cibles. Il existe différentes voies d'activations des protéines NFκB. L'induction de NFκB par les UVR peut conduire à des événements pro et/ou anti-apoptotique et à la production de TNFα [123]. Une exposition de kératinocytes humains de peau aux UVB (400 J/m²) entraîne, par exemple, une activation tardive de NFκB, qui induit la production de TNF-α [125]. Dans les fibroblastes de peau humaine, une augmentation de RelA et NFκB1 est visible, soit une activation de la voie canonique post-UVB (250 J/m²) [126].

Les protéines AP-1 (activator protein-1) comprennent les protéines de la famille JUN, FOS, les partenaires de dimérisation de Jun (JDP), les facteurs de transcriptions ATF et la sous-famille MAF (musculoaponeurotic fibrosarcoma). Ils régulent la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire, l'apoptose et la transformation tumorale. Leurs gènes cibles sont notamment les gènes du collagène-1, c-Jun, la cycline D1, et les protéines p21 et p16 [127–129]. L'activation des voies MAPK par les UVR induit l'activation des protéines de la famille de AP-1, qui joue un rôle dans le photo-vieillessement (section 6-4). AP-1 module la transcription de différents gènes, dont les métalloprotéinases, capables de dégrader le collagène [130]. Dans des fibroblastes humains de dermes provenant de prépuces néonataux circoncis, les UVB induisent une augmentation de l'activation des MAPK p38, ERK et JNK, une activation des protéines AP-1 et une augmentation de la transcription des gènes MMP1 et MMP3, ainsi que de leurs niveaux protéiques [131].

Enfin, le stress oxydatif induit par les UVR, active la protéine Nrf2 (NF-E2-Related Factor 2). Celle-ci est capable de lier les séquences d'ADN que l'on appelle « élément de réponse antioxydant » soit ARE (antioxidant responsive element) et régule ainsi les gènes codants pour des protéines antioxydantes. En condition basale, Nrf2 est séquestrée dans le cytoplasme par la protéine Keap1 (Kelch-like ECH associating protein 1) et ciblée à la dégradation. En condition de stress oxydatif, Keap1 est modifiée et/ou phosphorylée, libérant Nrf2. La protéine Nrf2 se relocalise au noyau et active ses gènes cibles. L'activation de Nrf2 a été mise en évidence après exposition de cellules aux rayons UVA. En revanche, seules de faibles doses d'UVB sont capables d'activer Nrf2. À forte dose, les dommages UV-induits activent la protéine p53 qui contre l'effet de la protéine Nrf2, favorisant ainsi l'apoptose à la survie cellulaire (revue dans [122]). Ainsi, dans les fibroblastes de peau, une dégradation de la protéine Nrf2 a été observée, concomitante à la mort cellulaire [132].

Ainsi, selon le stimulus, soit le type d'UVR et la dose, mais aussi selon le type de cellules exposées, différents facteurs de transcriptions seront activés en passant, notamment, par la voie des MAPK et/ou PI3K. La régulation des facteurs de transcriptions NFκB, AP-1 et Nrf2 par les UVR entrainera l'activation et/ou la répression de gènes impliqués dans la survie cellulaire, l'apoptose, la production ou dégradation de la matrice extracellulaire, la production de cytokines et la production d'antioxydants (Figure 17). Des cross-talk et des boucles de rétroactions existent entre ces différentes voies mais aussi avec les récepteurs de mort cellulaire, l'arrêt du cycle cellulaire et les dommages à l'ADN, créant un enchevêtrement de multiples voies de signalisations finement réglées.

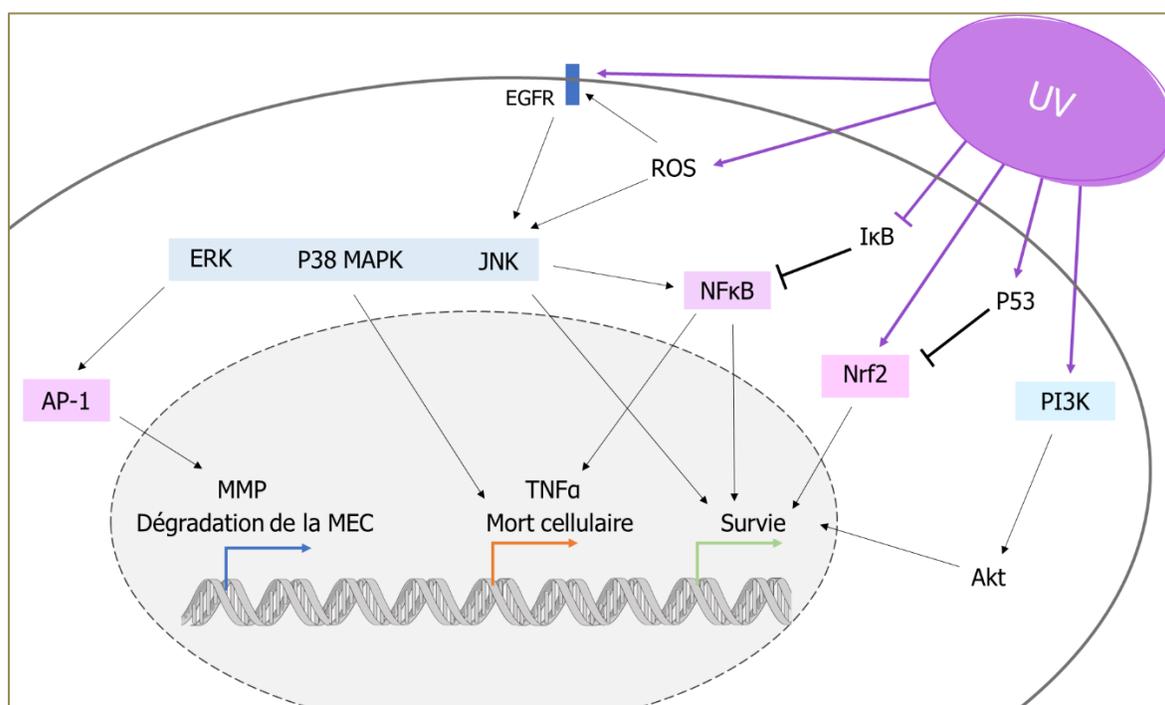


Figure 17 Activation des facteurs de transcriptions et des protéines kinases par les UVR.

4.4. Changements mitochondriaux induits par les UVR

4.4.1. La mitochondrie, le siège du métabolisme cellulaire

Les mitochondries sont des organelles phares du maintien du métabolisme et un centre important de la signalisation cellulaire. Leur importance dans la réponse cellulaire aux UVR s'explique par la sensibilité de l'ADN mitochondrial aux dommages induits par les UVR, par

leur statut central dans la formation de ROS, et enfin par leur implication dans la mort cellulaire, notamment l'apoptose.

La mitochondrie est reconnue comme l'épicentre de la production énergétique cellulaire grâce notamment à la phosphorylation oxydative. Les nutriments (sucres, acides aminés et acides gras) sont métabolisés et transportés au sein de la mitochondrie afin d'entrer le cycle de Krebs et de générer les molécules NADH (nicotineamide adenine dinucleotide) et FADH₂ (Flavin adenine dinucleotide), qui agissent comme des porteurs d'électrons. Ces électrons sont utilisés par la chaîne de transport des électrons, qui pompe des protons (H⁺) grâce à cette énergie. Le gradient de proton permet de produire de l'ATP par l'ATP synthase. En plus de cette production d'énergie qui sera redistribuée dans la cellule, la mitochondrie joue un rôle dans la biosynthèse de nucléotides, d'acides gras, de cholestérol, d'acides aminés, de glucose et la production d'hèmes. Son rôle dans le métabolisme cellulaire passe aussi par le maintien de la balance rédox, notamment par le maintien de l'équilibre des molécules NAD(P)⁺/NAD(P)H. La mitochondrie prend aussi en charge certains déchets comme l'ammonium et le sulfide d'hydrogène, qui peuvent être toxiques à forte concentration. Pour finir, la mitochondrie est centrale dans la production et la reconversion des ROS. Pour rappel, les ROS sont générés à partir de la réduction de l'oxygène en superoxyde (O₂•), en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et en radical hydroxyle (OH•). Les ROS sont produits par la mitochondrie lors de la réaction par la NADPH oxydase (NOX), la réaction de Fenton (Fe²⁺ + H₂O₂ → Fe³⁺ + OH⁻ + OH•) et à travers les pertes d'électrons dans la chaîne de transport des électrons. Dans la mitochondrie, l'enzyme superoxyde dismutase convertie le superoxyde en peroxyde d'hydrogène qui est moins réactif, l'H₂O₂ peut être converti en H₂O par l'activité de la peroxyrédoxine, la thiorédoxine et la thiorédoxine réductase. Les ROS sont à la fois des générateurs de dommages, comme nous en avons discuté dans la section 3, mais ils sont aussi importants dans la signalisation cellulaire. Par exemple les ROS sont capables de réprimer la voie PI3K-Akt, jouant ainsi sur la survie cellulaire (revue dans [133] et [134]).

4.4.2. La mitochondrie, survie et mort cellulaire

En plus d'être centrale au métabolisme cellulaire, la mitochondrie exerce un rôle clé dans la mort cellulaire (section 5). Brièvement, les mitochondries jouent un rôle dans l'apoptose. Il existe deux voies apoptotiques, soit la voie extrinsèque passant par les récepteurs de mort

cellulaire, et la voie intrinsèque qui est déclenchée par des signaux internes ou externes comme les dommages à l'ADN, un excès de ROS ou de calcium intracellulaire. Les mitochondries amplifient le signal apoptotique lors de l'activation de la voie extrinsèque et jouent un rôle central dans la voie intrinsèque. Notamment, elles libèrent des facteurs pro-apoptotiques, soit le cytochrome C, les protéines SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases) et AIF (Apoptosis-Inducing Factor) conduisant à l'activation des caspases, la dégradation de l'ADN et la dégradation des protéines cellulaires. Les changements métaboliques, comme une diminution drastique de la production d'ATP ou des changements dans les réseaux mitochondriaux par fusion et fission, peuvent induire la mort cellulaire ou l'accompagner. En quantité excessive, le calcium et les ROS favorisent la mort cellulaire. D'autres voies de mort cellulaire (non-apoptotiques) sont accompagnées par des changements métaboliques [134].

4.4.3. Changements mitochondriaux induits par les UVR

La mitochondrie étant centrale au maintien de l'homéostasie cellulaire, à la signalisation notamment dans la mort cellulaire, à la production de ROS et étant elle-même sensible aux dommages induits par les UVR, des publications s'intéressent à l'effet des UVR sur le métabolisme émergent. Dans une étude récente sur les kératinocytes immortalisés (spontanément) HaCaT, une irradiation sub-létale d'UVB induit des changements morphologiques et fonctionnels des mitochondries, notamment une augmentation de la biogénèse mitochondriale soit une augmentation du nombre et de la masse mitochondriale. L'étude montre aussi une augmentation de la fusion des mitochondries, une hyperpolarisation de celles-ci (potentiel membranaire) et une augmentation de la production d'ATP après l'exposition aux UVB. Ces changements sont plus importants avec une inhibition de PARP1, soit l'enzyme capable de PARyler des protéines cibles en utilisant le NAD⁺. De plus, l'inhibition de PARP1 réduit la NER [135]. Ainsi, le lien entre le métabolisme (dont le NAD⁺) et la réparation de l'ADN après une exposition aux UVR est de plus en plus étudié. Dans les kératinocytes HaCaT, la nicotinamide, soit un précurseur du NAD⁺, améliore la réparation des dommages de type CPD et 8-oxodG induits par un simulateur d'UVR solaires (UVA + UVB) [136]. Dans une autre étude utilisant les cellules HaCaT, suivant une dose non-létale de simulateur UVR solaire, le pool d'ATP diminue. Cette diminution est en partie

liée à l'activité de PARP1 et pourrait refléter l'activité de la NER [137]. Sous simulateur solaire, les fibroblastes de peau subissent aussi une diminution du pool d'ATP, une dépolarisation du potentiel membranaire mitochondrial et une diminution de la respiration mitochondriale [138]. Les changements métaboliques induits par les UVR semblent dépendants de la dose appliquée, du type d'irradiation, du type cellulaire et probablement aussi du moment auquel sont fait les mesures.

Dans la section 4-2 sur la réparation des dommages par la NER, nous avons abordé le fait que PARP1 interagit avec des protéines de la NER et les dimères de pyrimidines. Il semble donc exister un lien entre les changements métaboliques induits par les UVR et la réparation de l'ADN passant par la protéine PARP1. Les mitochondries semblent jouer un rôle majeur dans la réponse cellulaire aux UVR, mais leur participation dans la réparation de l'ADN et la mort induites par les UVR demeurent à définir. Au sein du laboratoire, une des thématiques de recherche porte sur la compréhension des mécanismes liant les dommages induits par les UVB à l'ADN mitochondrial et la mort cellulaire.

5. La mort cellulaire

Sujet central de cette thèse, la mort cellulaire « programmée » ou « régulée » (regulated cell death, RCD) contient de nombreuses voies de mort qui peuvent être définies par l'activation de protéines spécifiques [139]. L'apoptose reste la voie la plus connue à ce jour, elle a souvent été placée aux antipodes de la nécrose, un processus non-programmé. Néanmoins, cette vision de l'apoptose versus la nécrose est peu à peu abandonnée suite à la découverte de nouvelles voies de mort cellulaire régulées, qui étaient jusqu'alors incorrectement placées dans les voies non-programmées. La mort non programmée est maintenant associée à un accident ou une catastrophe cellulaire, soit une mort instantanée et non-contrôlée liée à des conditions physiques, chimiques ou mécaniques extrêmes [139]. Il existe de nombreuses voies de mort régulées dépendantes du stimulus et du type cellulaire, telles que la nécroptose, la parthanatos, la ferroptose, et bien d'autres, dont certaines seront abordées dans le cadre de cette section. Les voies de l'apoptose, de la nécroptose, de la parthanatos et brièvement de la ferroptose seront examinées dans cette thèse en lien avec les radiations UVB dans les

fibroblastes du derme. La section suivante (section 5-2) présente un bilan des publications s'intéressant aux voies de mort cellulaires activées par les UVR dans les cellules de peau.

5.1. Les différentes voies de mort

5.1.1. L'apoptose

Évoquée précédemment, l'apoptose est certainement la voie de mort cellulaire la plus étudiée. Une recherche rapide sur pubmed donnera plus de 100 000 publications titrées avec le mot « apoptosis », 57 000 pour « necrosis » et 1 000 pour « necroptosis ». L'apoptose se sous-divise en deux voies, soit la voie extrinsèque et la voie intrinsèque, en fonction de la nature du stimulus, et aboutie dans les deux cas à l'activation des protéines caspases (cysteine-aspartic proteases).

Les caspases sont des protéases possédant dans leur site actif une cystéine et qui clivent des protéines cibles principalement après un acide aspartique. L'Homme possède 12 caspases dont les fonctions biologiques ne sont pas toutes connues. Les caspases 1, 4 et 5 sont généralement associées à l'inflammation, les caspases 3, 6 et 7 correspondent aux caspases dites effectrices, les caspases 8, 9 et 10 aux caspases dites initiatrices, enfin les caspases 2, 12 et 14 complètent la famille des caspases humaines. Comme leur nom l'indique, les caspases initiatrices initient la cascade d'activation des caspases impliquées dans l'apoptose et activent les caspases effectrices, qui clivent les protéines cibles menant à la mort cellulaire (Figure 18). Les caspases initiatrices et effectrices sont sous forme inactive dans la cellule, appelée procaspases. Les caspases possèdent une petite (10-12 kD) et une grande sous-unité (17-20 kD), un repliement adéquat des deux sous-unités forme le site catalytique. Les procaspases initiatrices sont monomériques et activées par dimérisation à l'aide d'une « plateforme d'activation ». Les procaspases effectrices, sont dimériques, et activées après clivage du pro-domaine et clivage entre les deux sous-unités par les caspases initiatrices [140,141].

Les caspases représentent les protéines effectrices de l'apoptose, et entraînent la mort cellulaire par clivage de leurs protéines cibles, tel que PARP1. L'apoptose sera l'objet d'étude principal de cette thèse et sera caractérisée par l'activation des caspases et le clivage

de PARP1. Les deux voies apoptotiques menant à l'activation des caspases sont détaillées ci-dessous.

5.1.1.1. Voie intrinsèque

La voie intrinsèque peut être activée par de nombreux stimulus, dont les dommages à l'ADN, une augmentation importante de ROS, un retrait des facteurs de croissance dans le milieu extracellulaire, des instabilités génomiques lors de la mitose, etc. [139,142]. Ce stress va induire l'activation des protéines de la famille BCL2 qui compte des protéines pro et anti-apoptotiques. Les protéines de cette famille contiennent des domaines BH (pour Bcl2 Homology) soit BH 1, 2, 3, ou 4. Les protéines pro-apoptotiques sont subdivisées en deux groupes fonctionnels, soit les protéines effectrices Bak et Bax contenant les quatre domaines BH, et les protéines senseurs ayant seulement BH3 dont Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, Hrk, Noxa, Puma. Les protéines anti-apoptotiques contiennent les quatre domaines BH et sont Bcl2, Bcl-xL, Mcl1, Bcl-W, et Bfl-1. Les protéines Bak et Bax favorisent la formation de pores dans la membrane externe mitochondriale et induisent ainsi la perméabilisation membranaire mitochondriale externe (MOMP : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization). L'ouverture de pores membranaires mitochondriaux libère des protéines pro-apoptotiques dont le cytochrome c (un acteur de la chaîne de transport des électrons), et les protéines SMAC (aussi appelée DIABLO). Les différentes protéines de la famille BCL2 ont différentes affinités les unes pour les autres, différentes localisations et sont régulées par des modifications post-traductionnelles et/ou au niveau transcriptomique afin de déclencher l'apoptose selon le stimulus. Brièvement, les protéines pro-apoptotiques BH3 sous condition de stress, vont activer directement ou indirectement Bax et Bak et/ou séquestrer les protéines anti-apoptotiques. Parmi les protéines BH3, seules Bid tronqué (tBid), Puma et Bim sont capables d'interagir directement avec Bax ou Bak. De la même façon, les protéines anti-apoptotiques interagissent avec les protéines BH3 et/ou avec Bak et Bax pour empêcher la formation des pores mitochondriaux MOMP [143,144].

Il est à noter que les protéines BH3 Puma et Noxa sont directement régulées par le facteur de transcription p53. P53 est un acteur central de nombreux processus cellulaires (cycle cellulaire, réparation des dommages, mort cellulaire). En condition normale, p53 est maintenu en faible quantité dans la cellule par l'ubiquitine ligase E3 Mdm2. P53 est alors dégradée par le protéasome. En condition de stress, le niveau de p53 est augmenté et la protéine agit sur ses gènes cibles [145].

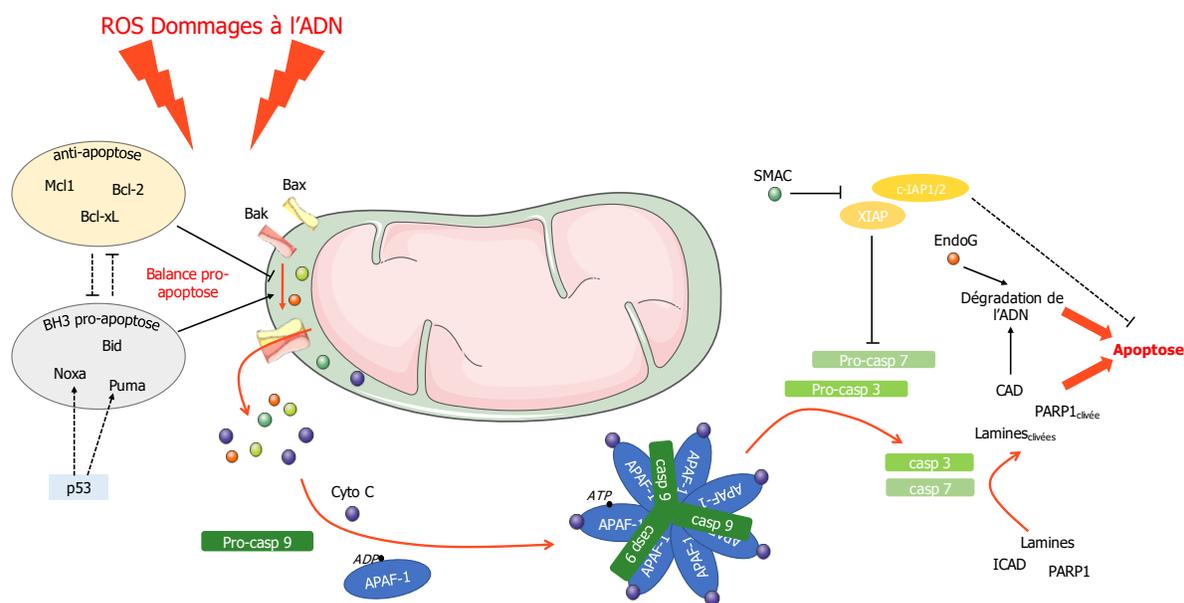


Figure 18 Schéma résumé de la voie intrinsèque de l'apoptose.

Des dommages cellulaires ou une perturbation extracellulaire peuvent induire une régulation des protéines de la famille de BCL2, dont la balance deviendra pro-apoptotique. La voie intrinsèque passe par la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP) puis l'activation de l'apoptosome et des caspases.

Une fois l'ouverture des pores mitochondriaux externes engagée, les protéines pro-apoptotiques, dont cytochrome c, SMAC, et endonucléase G, transloquent de l'espace intramembranaire mitochondrial au cytosol et/ou au noyau [142]. Dans le cytosol, la protéine SMAC inhibe les protéines IAP (Inhibitor of Apoptosis), soit des protéines anti-apoptotiques. Il existe 8 protéines IAP humaines, dont 3 jouant un rôle dans la mort cellulaire : XIAP, c-IAP1 et c-IAP2. XIAP lie et bloque directement les caspases (casp 3, 7 et 9), la liaison SMAC- XIAP libère ces caspases. En revanche les protéines c-IAP1 et c-IAP2 ont une action indirecte. En effet, elles régulent d'autres protéines liées à la survie et mort cellulaire. Grâce à leur activité ubiquitine E3 ligase, elles interviennent dans la voie NF- κ B et la signalisation

passant par TNFR1 ou FASR dont nous reparlerons plus tard. L'inhibition de c-IAP1 et c-IAP2 par SMAC pourrait jouer sur la voie pro-survie NF- κ B [146].

Le cytochrome c se lie aux protéines APAF-1 (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1), qui forment une plateforme d'activation pour la procaspase 9, ce complexe est appelé « apoptosome ». Lorsque le cytochrome c interagit avec la plateforme contenant sept protéines APAF-1, des changements structuraux du complexe permettent la liaison à de l'ATP (ou dATP), puis le recrutement de plusieurs procaspases-9, qui sont alors activées [147]. La caspase 9 activée démarre la cascade d'activation des caspases en activant les caspases effectrices 3 et 7. Les caspases 3 et 7 clivent différentes protéines cibles dont la protéine PARP1 [139,142]. Les caspases ciblent aussi des protéines structurelles dont les lamines qui maintiennent l'enveloppe nucléaire, la protéine Rock I (rho-associated kinase I) qui modifie le cytosquelette d'actine, l'actine et la tubuline. Elles induisent aussi l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS) au niveau de la membrane cytoplasmique. Enfin, elles sont majoritairement responsables de la dégradation de l'ADN en activant la DNase CAD (Caspase-Activated DNase). En parallèle, l'endonucléase G libérée par la mitochondrie transloque au noyau et dégrade aussi l'ADN [148]. La dégradation de l'ADN et des protéines, accompagnée d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire, conduit à la mort cellulaire. La figure 18 présente un schéma résumé de la voie intrinsèque apoptotique.

5.1.1.2. Voie extrinsèque

La voie extrinsèque est déclenchée par des perturbations du microenvironnement captées par les récepteurs de mort cellulaire ou les récepteurs à dépendance, et se traduit par l'activation subséquente de la caspase 8 (et/ou 9), puis des caspases effectrices 3 et 7 [139].

Les récepteurs à dépendance, lorsque associés à leur ligand, activent la signalisation cellulaire liée à la survie cellulaire, la prolifération, la migration, etc. En revanche, en absence de ligands, ils induisent l'apoptose (Figure 19). Il existe une quinzaine de membres comprenant des intégrines et autres récepteurs. L'activation de l'apoptose par ces récepteurs semble spécifique à chacun, mais leur localisation au sein de radeaux lipidiques et leur état monomérique/multimérique semble important. Pour certains de ces récepteurs, la perte du ligand induit un changement conformationnel et révèle un site pouvant être clivé par les caspases. Le récepteur amplifie ensuite le signal par recrutement de plateformes protéiques conduisant à l'apoptose. Certains de ces récepteurs à dépendance activent les caspases 9 puis 3, la caspase 2 ou encore les caspases 8 puis 3. Les voies conduisant à l'apoptose pour chacun des récepteurs à dépendance restent majoritairement à déchiffrer [149].

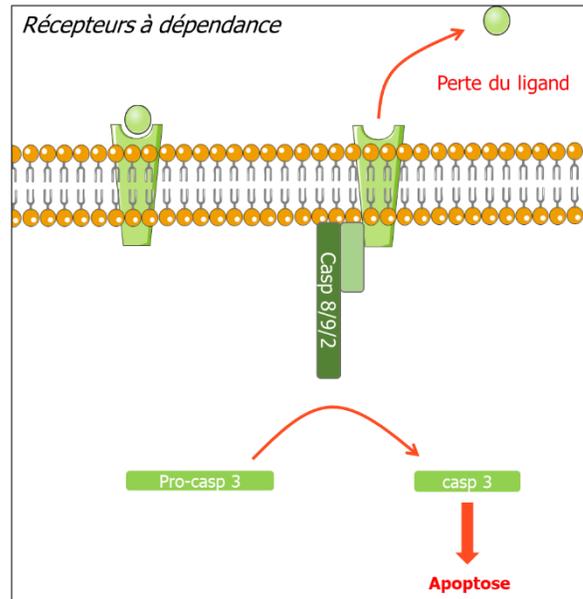


Figure 19 Activation de la voie extrinsèque apoptotique par les récepteurs à dépendance.

Les récepteurs de mort cellulaire comprennent FASR, TNFR1, TRAILR1 et TRAILR2 (abordés en section 3-3). La liaison à leur ligand (FASL, TNF α , TRAIL, respectivement) déclenche des voies de signalisation cellulaire, dont l'apoptose. Ces récepteurs sont caractérisés par un domaine intracellulaire appelé « DD » soit le domaine de mort (Death Domain). Leurs ligands sont des cytokines de la famille des TNF (Tumor necrosis factor) et sont sous formes solubles ou liées à la membrane. Après oligomérisation des récepteurs et liaison au ligand, les récepteurs changent de conformation et recrutent des protéines adaptatrices (dont FADD et TRADD) au niveau de leur domaine DD. Les protéines

adaptatrices servent de plateformes et lient les procaspases 8 et 10, ainsi que la protéine cFLIP (cellular FLICE/caspase 8-like inhibitory protein) par un domaine appelé DED (death effector domains), que possède FADD. Cette plateforme contenant FADD, TRADD, cFLIP, caspase 8 et/ou 10 est appelée le complexe d'induction de la mort « DISC » (death-inducing signaling complex). Au sein du domaine DISC, les caspases sont activées, puis libérées dans le cytoplasme. Deux mécanismes peuvent ensuite causer la mort cellulaire, soit une activation directe des caspases effectrices (3, 7 et 6) par les caspases 8 et 10, ou le clivage de la protéine Bid de la famille BCL2, formant Bid tronqué (tBid) par la caspase 8. La protéine tBid transloque à la mitochondrie et active la formation des pores externes mitochondriaux par Bax et Bak. L'ouverture des pores libère les protéines pro-apoptotiques et s'ensuit l'amplification du signal apoptotique décrite dans la voie intrinsèque (revue dans [90]).

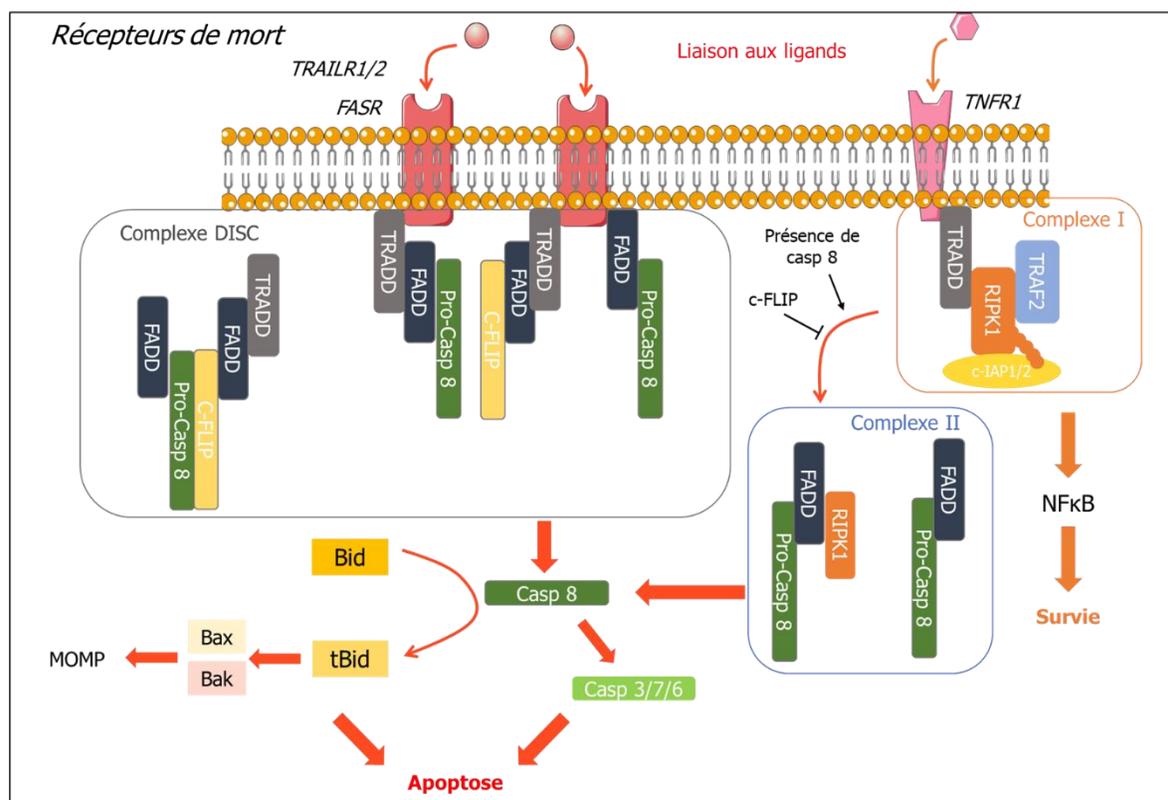


Figure 20 Activation de la voie extrinsèque apoptotique par les récepteurs de mort cellulaire.

L'activation de la caspase 8, caspase initiatrice de la voie extrinsèque, est régulée par la protéine cFLIP, qui ressemble à la caspase 8. cFLIP possède trois variants, dont un long et deux courts. Les variants courts inhibent l'apoptose tandis que le variant long peut être pro-ou anti-apoptotique.

La protéine RIPK1 (receptor-interacting protein kinase 1) possède aussi un domaine DD et peut, en conséquence, se lier aux récepteurs, à FADD et à TRADD. La protéine RIPK1 peut maintenir le complexe assemblé au récepteur en complexe pro-apoptotique, ou le changer en complexe pro-survie ou pro-nécroptose, selon son état de modification. La caspase 8 clive la protéine kinase RIPK1 lors du signal apoptotique.

Les récepteurs de mort ont leur spécificité et déclenchent différentes voies selon la plateforme protéique assemblée. Les récepteurs FAS et TRAILR conduisent à l'apoptose par formation du complexe DISC. Néanmoins, ils peuvent aussi induire d'autres voies de signalisation dont NF κ B et MAPK. Le récepteur TNFR1, après liaison de son ligand TNF- α , forme d'abord un complexe pro-survie (complexe I) contenant TRADD, RIPK1, TRAF2, c-IAP1/2, qui induit la voie NF κ B. En présence de caspase 8 et selon l'état de modification de RIPK1, la voie TNFR1 peut engendrer un second complexe (complexe II) qui dépend de l'endocytose du récepteur TNFR1. Ce complexe II conduit à l'apoptose [90,150]. Enfin, pour tous les récepteurs de mort (FASR, TRAILR et TNFR1), un autre complexe peut se former, le nécrosome, et mener à la nécroptose. Les voies d'activation de l'apoptose par les récepteurs de mort sont résumées en Figure 20. Ainsi, ces récepteurs peuvent induire plusieurs types de mort cellulaire, selon le contexte cellulaire.

5.1.2. Les voies non-apoptotiques

Outre l'apoptose, de nombreuses autres voies ont maintenant été découvertes, parmi lesquels on dénombre, la nécroptose, la ferroptose, la parthanatos, les voies liées à l'inflammation, à l'immunogénicité, les voies dépendantes du pore de transition mitochondrial, de l'autophagie ou des lysosomes, le cannibalisme cellulaire, etc. Les voies de signalisation impliquées bien souvent se recoupent, varient ou sont spécifiques selon le type cellulaire et sont plus ou moins bien caractérisées. De ce fait, leur définition est sujette à changer et évoluer rapidement.

Les voies de nécroptose et parthanatos seront, en plus de l'apoptose, les deux voies principalement étudiées dans cette thèse, en lien avec l'irradiation UVB. La ferroptose sera succinctement étudiée dans le chapitre 1. Ces voies sont détaillées dans cette section, ainsi que d'autres voies de mort cellulaire non-apoptotiques afin de représenter complexité des réponses cellulaires au stress.

5.1.2.1. La nécroptose

La nécroptose fait appel à la formation d'un complexe appelé nécrosome contenant les protéines kinases RIPK1 et RIPK3. La formation de ce complexe induit l'activation des protéines RIPK3 qui s'autophosphorylent et s'oligomérisent (potentiellement sous forme de structure Amyloïde [151]), puis l'activation de la pseudo-kinase effectrice MLKL (Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase) par phosphorylation. RIPK1 et RIPK3 sont des kinases de la même famille : elles sont composées d'un domaine RHIM (RIP homotypic interaction motif), en plus du domaine kinase et d'un domaine DD pour RIPK1. Les protéines RIPK interagissent grâce à leur domaine RHIM. RIPK1 peut interagir grâce au domaine DD avec les protéines contenant ce même domaine (FADD, TRADD, caspase 8) comme vu dans la section précédente (5-1-1).

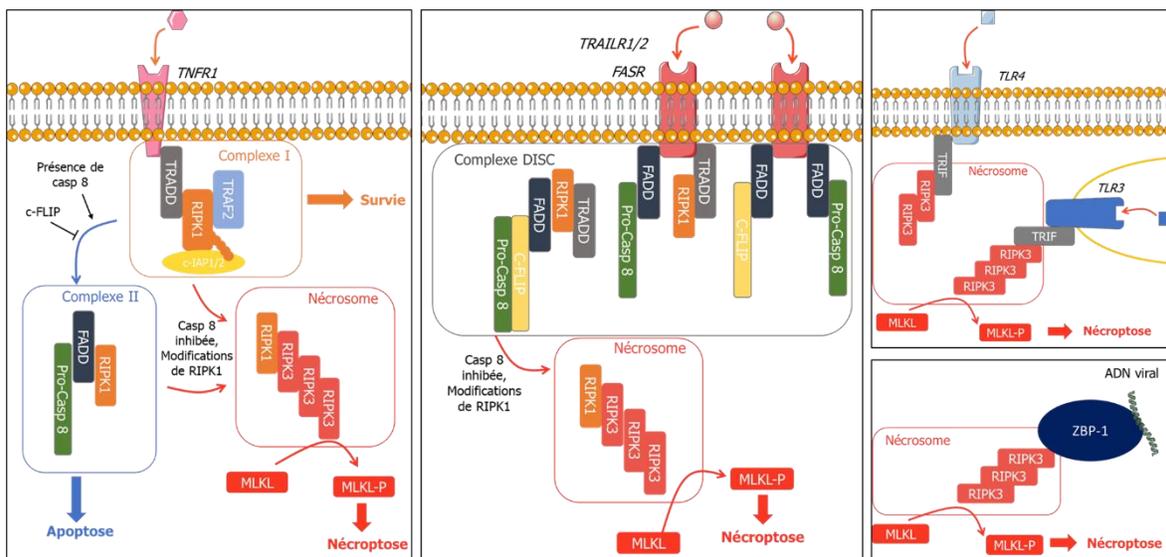


Figure 21 Mécanismes d'activation de la nécroptose et formation du nécrosome.

Le nécrosome se compose de RIPK1 et RIPK3 (ou RIPK3 seulement) par autophosphorylation des protéines RIPK3. MLKL est activée par phosphorylation et induit la mort par formation de pores dans la membrane plasmique.

La nécroptose est activée par des perturbations extra ou intra-cellulaires. Le nécrosome se forme après activation des récepteurs de mort cellulaire sous certaines conditions, ou après engagement d'un ligand aux récepteurs TLR 3 ou 4 (Toll-Like receptor), ou à la protéine ZBP-1 (Z-DNA-binding protein 1) (Figure 21).

En ce qui concerne FASR, TRAILR et TNFR1, la liaison de cytokines à ces récepteurs entraîne la formation de complexes (DISC, complexe I ou II). Lorsque la caspase 8 est absente ou inhibée et selon les modifications post-traductionnelles de RIPK1, le nécrosome se forme. Il se compose de RIPK1 et RIPK3, active MLKL et induit la mort par nécroptose.

Les TLR 3 ou 4 sont activées par des ARN viraux et ARN doubles brin ou par les lipopolysaccharides et protéines virales respectivement. Les TLR 3 et 4 lient la protéine TRIF qui contient un domaine RHIM, auquel peut se lier directement RIPK3.

Enfin, la protéine ZBP-1 lie l'ADN cytosolique (reflétant une infection virale) et contient directement un domaine RHIM pouvant lier RIPK3. Selon le type cellulaire et le stimulus RIPK1 n'est pas toujours nécessaire à la formation du nécrosome. MLKL est activé par RIPK3 et constitue la protéine effectrice de la nécroptose [91,152].

La phosphorylation de MLKL mène à une oligomérisation des protéines MLKL et à des changements conformationnels conduisant à la formation de pores dans la membrane plasmique entraînant la mort cellulaire [153,154].

5.1.2.2. *La parthanatos*

La parthanatos est une voie de mort dépendante de l'hyperactivation de la protéine PARP1 [139]. PARP1 est une Poly (ADP-Ribose) Polymérase faisant partie de la famille des PARP qui contient 17 membres. PARP1, en plus de son domaine catalytique, peut lier le NAD⁺, les acides nucléiques (DNA, RNA) et les protéines. PARP1 clive le NAD⁺ en nicotinamide (NAM) et ADP-ribose et couple plusieurs unités d'ADP-ribose sur des protéines cibles, soit des poly (ADP-ribose) ou PAR. Les molécules PAR peuvent servir d'échafaudage pour lier d'autres protéines ou peuvent modifier l'activité ou la structure des protéines cibles. PARP1 est impliquée dans de nombreux processus, dont la réparation de l'ADN (section 4-2), le métabolisme (section 4-4), l'inflammation, le développement, la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire. PARP1 est principalement nucléaire, bien que les molécules PAR peuvent transloquer au cytosol [110]. La déPARylation, soit le fait d'enlever les chaînes de PAR ou des unités de mono-ADP-Ribose d'une protéine se fait par des

protéines hydrolases, soit principalement PARG (poly (ADP-Ribose) glycohydrolase), ainsi que MACROD1/D2, TARG1 et ARH1/3 [155].

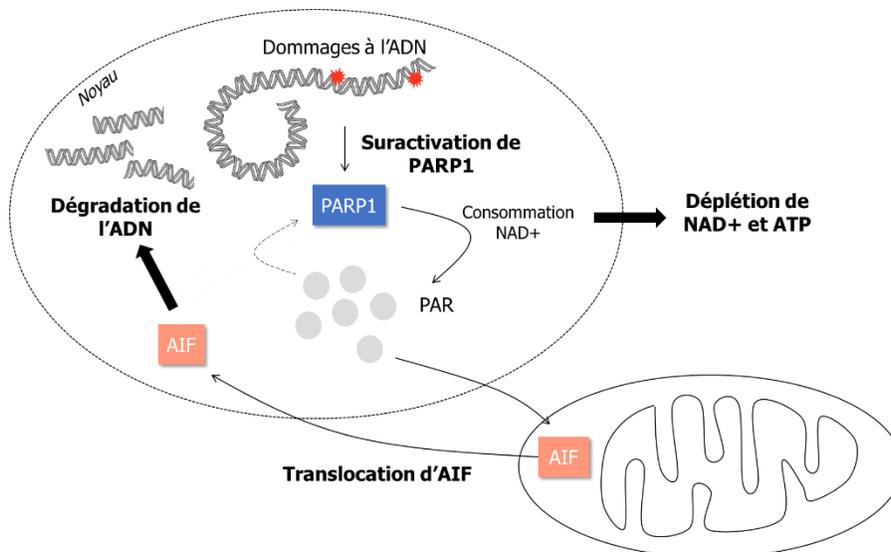


Figure 22 Signalisation cellulaire menant à la parthanatos.

La parthanatos se caractérise par une suractivation de PARP1 menant à la production de PAR et la consommation de NAD+, concomitante à l'utilisation d'ATP. La protéine AIF transloque au noyau après liaison à des molécules PAR, activant la dégradation de l'ADN.

Lors d'un stress génotoxique, comme des dommages à l'ADN, PARP1 est activée. La parthanatos se caractérise par une hyperactivation de PARP1, qui induit une surproduction de PAR et la consommation de NAD⁺. Cette production engendre une diminution drastique du pool cellulaire (réservoir) de NAD⁺, ce qui mène à une diminution d'ATP. Par ailleurs, la production excessive de PAR déclenche la translocation d'AIF (Apoptosis-Inducing Factor) de la mitochondrie au noyau (Figure 22) [156]. AIF est une protéine produite dans le cytosol sous forme de précurseur de 67kD et est clivée et maintenue dans la mitochondrie sous forme mature de 62kD. Une partie des protéines AIF se trouve dans l'espace intramembranaire mitochondrial et dans la membrane mitochondriale externe [157]. Elle contient un domaine capable de lier les molécules PAR. Lors de la liaison d'AIF au polymère PAR, AIF est libérée dans le cytosol sous forme soluble (57kD) et transloque au noyau, induisant le clivage de l'ADN en fragment et la mort cellulaire [158]. Le clivage de l'ADN est encore sujet à débat, une hypothèse suggère un mécanisme dans lequel AIF interagit avec des endonucléases et l'ADN [156,159]. Le clivage de l'ADN serait la principale cause de mort cellulaire dans la

parthanatos, bien que les diminutions de NAD⁺ et d'ATP jouent aussi un rôle. Néanmoins, dans certaines conditions, la parthanatos pourrait ne pas être liée à la translocation d'AIF [160].

Les mécaniques menant à la parthanatos restent encore à approfondir et des questions subsistent. Notamment, le processus menant à la forme soluble d'AIF après liaison à des molécules PAR, le ou les partenaires d'AIF menant à la dégradation de l'ADN, l'importance de la déplétion en NAD⁺ et ATP dans la parthanatos et le potentiel d'une voie indépendante d'AIF, sont encore à l'étude.

5.1.2.3. La ferroptose

La ferroptose se caractérise par une peroxydation des lipides excessive menant à des altérations de la membrane plasmique et à la mort cellulaire. La ferroptose est indépendante de la rupture de la membrane mitochondriale et des caspases. En revanche, la formation de ROS et le pool de fer jouent des rôles essentiels dans l'initiation et la propagation du signal ferroptotique. Deux mécanismes parallèles semblent nécessaires à la mort par ferroptose, soit la diminution de la réduction des lipides peroxydés et l'augmentation de la peroxydation des lipides (Figure 23).

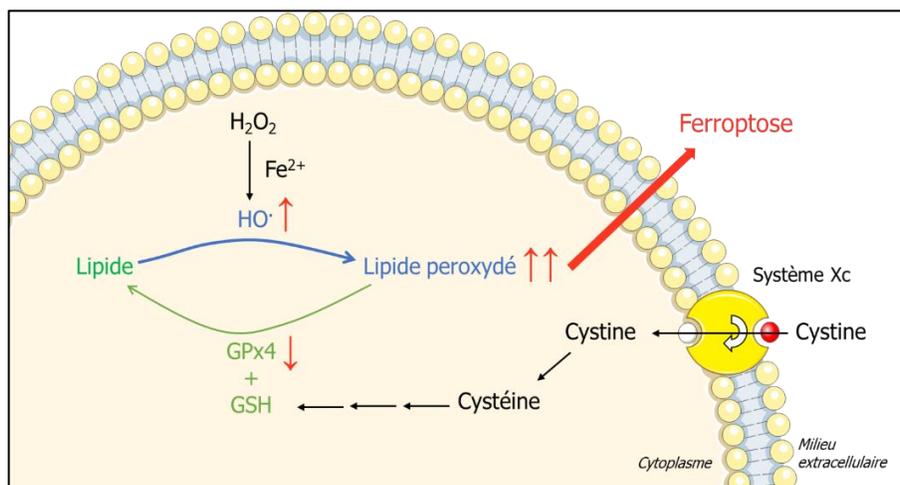


Figure 23 Mécanismes menant à la mort par ferroptose.

L'augmentation des lipides peroxydés caractérise la ferroptose.

Les lipides peroxydés sont pris en charge et rendus non-toxiques par l'enzyme GPx4 (glutathion peroxydase 4) en présence de glutathion (GSH). Les glutathions peroxydases, tel

que GPx4, assurent la transformation des peroxydes organiques en alcool et eau, beaucoup moins toxique. Ainsi, une inactivation, inhibition ou dégradation de la protéine GPx4 empêche la détoxification des lipides peroxydés. Une diminution de GSH aboutira au même résultat. La synthèse de GSH dépend de la cystéine produite à partir de cystine. L'antiporteur Xc- permet l'entrée de la cystine dans la cellule. Ainsi, une atteinte à ce système peut conduire à la ferroptose. Deuxièmement, la formation de lipides peroxydés est augmentée par différentes voies, toutes dépendantes du fer. Notamment, la réaction de Fenton génère des ROS très réactifs (radical hydroxyle HO•), capables de peroxyder les lipides. Les lipides peuvent aussi s'autoxyder après oxydation par des ROS, on parle d'autoxydation des lipides, soit la propagation de l'oxydation au sein du lipide par réaction enzymatique dépendante du fer [161,162]. Ainsi, la ferroptose est le résultat de perturbations majeures du métabolisme rédox, menant à la peroxydation des lipides, et est inhibée par les chélateurs de fer et les antioxydants lipophiles [139].

5.1.2.4. *La pyroptose*

La pyroptose est induite par une infection bactérienne ou virale et se traduit par l'activation des protéines Gasdermines qui forment des pores dans la membrane plasmique, induisant la lyse des cellules et la libération de molécules inflammatoires, dont IL-18 et IL-1 β . Deux voies sont connues à ce jour, la voie canonique passant par la caspase inflammatoire 1 et la voie non-canonique passant par l'activation des caspases inflammatoires 4 et 5 (Figure 24) [139].

La voie canonique est activée par un ensemble de molécules reconnues pour être associées aux pathogènes (PAMP, pathogen-associated molecular patterns) ou associées à un danger (DAMP, danger-associated molecular patterns) qui peuvent provenir de bactéries, virus ou toxines. Ces molécules sont reconnues par des récepteurs appelés PRR (pattern recognition receptors), qui forment un complexe avec des protéines adaptatrices. Ce complexe s'appelle l'inflammasome. Il existe de nombreux complexes en fonctions du stimulus. Par exemple, le complexe AIM2-ASC reconnaît l'ADN double brin, et l'inflammasome NLRP3-ASC est activé par différents agents endommageant les membranes [163]. L'inflammasome forme une plateforme d'activation de la pro-caspase 1 en caspase 1. Celle-ci est capable, d'une part, de cliver et activer les cytokines inflammatoires IL-18 et IL-1 β , et d'autre part, de cliver et

activer les protéines Gasdermines D (GSDM-D) qui sont les protéines effectrices de la pyroptose. La seconde voie est activée par les lipopolysaccharides, auxquels se lient directement les pro-caspases 4 et 5. Leur concentration induit le clivage des pro-caspases en caspases et l'activation subséquente de GSDMD. Les protéines Gasdermines sont sous formes inactives en condition physiologique et sont activées par clivage. La libération de la partie N-terminale de GSDM permet la formation de pores dans la membrane plasmique, libérant des cytokines inflammatoires et conduisant à la mort cellulaire (revue dans [163,164]).

5.1.2.5. *La nécrose exécutée par le pore de transition mitochondrial (MPT)*

La nécrose exécutée par le pore de transition mitochondrial ou MPT (mitochondrial permeability transition) est initiée par une perturbation du microenvironnement cellulaire comme un stress oxydatif sévère ou une augmentation drastique du calcium cytosolique. En condition de stress, un complexe formant un pore transitoire de perméabilité (PTPC, permeability transition pore complex) forme une ouverture entre la matrice interne mitochondriale et le cytosol, passant par les membranes internes et externes de la mitochondrie. Ce pore entraînerait une perte abrupte de l'imperméabilité de la membrane interne mitochondriale, une perte du potentiel mitochondrial nécessaire notamment à la production d'ATP, et la cassure des membranes mitochondriales (Figure 24). Les protéines nécessaires à la formation du pore PTPC n'ont pas encore été identifiées à l'exception de la cyclophiline D (CYCP). En revanche, les protéines de la famille BCL2 et la protéines p53 pourraient être impliquées, ainsi que les protéines du complexe F1F0 ATPase [165].

5.1.2.6. *La mort cellulaire dépendante du lysosome*

Les lysosomes sont des organelles capables de dégrader et recycler les macromolécules cellulaires grâce à des hydrolases. La mort cellulaire dépendante des lysosomes ou LCD (Lysosome-dependent Cell Death) est principalement liée à la rupture des membranes lysosomales, la libération du contenu lysosomal dans le cytosol et notamment l'activité des protéases cathepsines [139]. La rupture des membranes des lysosomes peut accompagner ou amplifier différents types de mort dont l'apoptose, la pyroptose et la ferroptose, mais peut également induire la mort LCD. Plusieurs stimulus peuvent induire la rupture des membranes

lysosomales, soit des infections virales ou bactériennes (protéines et toxines respectivement), les ROS et l'endommagement connexe des membranes, et les cathepsines elles-mêmes (Figure 24). De plus, p53 et les membres de la famille BCL-2 pourraient aussi être impliqués. La mort LCD peut être accompagnée d'une rupture des membranes mitochondriales. Les cathepsines, tout comme les caspases, clivent des protéines cibles dont PARP et Bid,

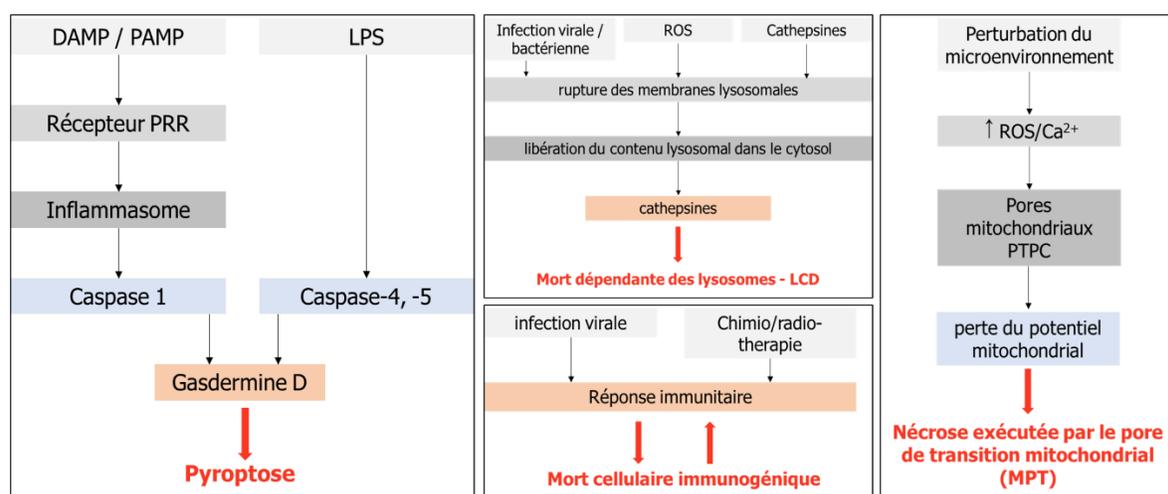


Figure 24 Schéma des voies de mort non-apoptotiques : dépendante du lysosomes, dépendante du pore de transition mitochondrial, mort immunogénique et pyroptose.

Ces voies peuvent être activées par des infections virales et/ou bactériennes et leurs molécules associées DAMP et PAMP, ou une augmentation des espèces réactives de l'oxygènes (ROS) ou des perturbations du microenvironnement.

précipitant la mort cellulaire (revue dans [166,167]).

5.1.2.7. La mort cellulaire dépendante de l'autophagie

L'autophagie permet de recycler des molécules ou organelles défectueuses dans la cellule en les amenant aux lysosomes. Ce processus permet en général un maintien de l'homéostasie et du bon fonctionnement cellulaire, faisant de l'autophagie un mécanisme pro-survie. Néanmoins, certaines protéines de la machinerie autophagique peuvent participer à la mort cellulaire, appelée la mort cellulaire dépendante de l'autophagie [139]. Il est à noter que l'autophagie peut être parallèle à d'autres voies de mort, dans ce cas on parle d'autophagie associée à la mort cellulaire. L'autophagie peut médier et activer d'autres voies de mort. Enfin, il existe la mort cellulaire dépendante de l'autophagie qui est activée dans des

contextes spécifiques et qui utilise plusieurs protéines de la macro-autophagie (protéines de la famille ATG) [168].

5.1.2.8. *La mort cellulaire immunogénique (ICD)*

La mort cellulaire immunogénique ou ICD (Immunogenic Cell Death) peut être activée par différents stimulus dont une infection virale, des agents chimio-thérapeutiques et certaines radio-thérapies (Figure 24). Ces agents induisent la libération de DAMP, qui peuvent prévenir l'organisme de dangers potentiels, activer une réponse immunitaire et contribuer à l'immunité à long-terme (mémoire immunitaire). La mort ICD est définie comme une mort régulée capable d'activer une réponse immunitaire chez un hôte immunocompétent [139].

5.1.2.9. *La mort cellulaire NETotique*

Les cellules dérivées hématopoïétiques neutrophiles sont capables de produire des pièges extracellulaires anti-microbiens appelés NET (Neutrophil Extracellular Traps). Sous certaines conditions, notamment la production en grande quantité de ROS, le processus de formation des NET mène à la mort des cellules les produisant. Ainsi, la mort cellulaire NETotique est définie comme une mort cellulaire dépendante des ROS et restreinte aux cellules dérivées hématopoïétiques associées à la formation de NET [139].

5.1.2.10. *La mort cellulaire entotique*

La mort entotique est une forme de cannibalisme entre des cellules du même type cellulaire ou non, qui se traduit par l'internalisation d'une cellule vivante (cellule perdante) au sein d'une autre cellule (cellule gagnante) par un mécanisme dépendant de l'actomyosine [139]. La mort entotique est stimulée par le détachement d'une cellule à la matrice [169]. La cellule internalisée meurt ensuite par un processus qui utilise une partie des protéines de l'autophagie, soit LC3, ATG5, ATG7, Beclin et VPS34, menant à la dégradation des composants cellulaires par les lysosomes. Les cellules « perdantes » (internalisées) ont un rôle proche de cellules invasives car ces cellules activent une zone de contraction de l'actomyosine à l'opposé de la zone de contact cellule-cellule entraînant leur engouffrement dans la cellule « gagnante » [170]. Il existe d'autres formes de cannibalisme cellulaire tel que le cannibalisme des cellules cancéreuses [169].

5.1.3. Rôle de la mort cellulaire dans l'homéostasie, le développement et le maintien génomique

Nous avons abordé ici de nombreuses voies de mort cellulaire en s'attardant d'avantage sur l'apoptose, la nécroptose, la ferroptose et la parthanatos. La liste des voies répertoriées ici est non-exhaustive. Dans tous les cas, la mort cellulaire est nécessaire à la survie et son rôle est fondamental.

La mort cellulaire programmée est un processus fondamental du développement, permettant la formation correcte des tissus et le maintien de la balance mort-division au cours du temps. La préservation de l'homéostasie des cellules et tissus passe par le remplacement des cellules devenues non-fonctionnelles. Elle permet de supprimer les cellules trop endommagées, notamment les cellules ayant des instabilités génomiques. L'activation de la mort cellulaire lors d'une réplication incorrecte ou lors de dommages à l'ADN importants permet le maintien de cellules fonctionnelles et la suppression de potentiels mutants. Elle peut aussi être utilisée comme un moyen de défense face aux infections. La suppression des cellules permet aussi la libération de signaux dans le milieu extracellulaire et l'activation d'autres voies signalétiques au niveau des cellules adjacentes ou du système immunitaire [171,172].

La mort cellulaire programmée est donc nécessaire à la formation et à la survie de l'organisme, au maintien de la fonctionnalité des cellules et donc des différents tissus et organes, à la suppression de cellules aux génomes endommagés et mutés et à la suppression des infections. La mort cellulaire étant essentielle, il arrive que plusieurs voies de mort cellulaires soient activées en parallèle permettant une compensation dans le cas d'une inhibition de l'une des voies. Un stimulus peut induire différentes voies de mort cellulaire et chaque voie peut potentiellement être induite par différents stimulus. Les voies de signalisation peuvent différer et être spécifiques au stimulus, au type cellulaire, et à son environnement. Les voies de mort régulées permettent un contrôle temporel et spatial de la suppression cellulaire mais aussi de la signalisation inter-cellules.

5.2. Les voies de mort activées par les UVR

Les UVR induisent des dommages à l'ADN, des ROS et dommages cellulaires, et activent les récepteurs de mort. Ces stimulus activent des voies de signalisations tels que la réparation des dommages, l'arrêt du cycle cellulaire, l'activation de facteurs de transcription jouant sur la réponse au stress oxydatif et la survie cellulaire, ainsi que des changements métaboliques. À forte dose, les UVR peuvent aussi induire de la mort cellulaire, mécanisme qui permet de supprimer les cellules trop endommagées. L'apoptose est la voie principalement activée par les UVR dans les cellules de peau. Cependant, considérant l'identification de nouvelles voies de mort cellulaire induite par les UVR mises en évidence dans d'autres modèles, il est possible que des voies de mort cellulaire complémentaires à l'apoptose puissent exister dans les cellules de peau. Dans cette section, nous nous concentrerons sur les voies de mort cellulaire induites par les UVR, principalement les UVB, dans les cellules de l'épiderme (kératinocytes) et du derme (fibroblastes).

5.2.1. L'apoptose induite par les UVR dans les kératinocytes de peau

Il est connu depuis une vingtaine d'année que les UVR (A, B et C) induisent de l'apoptose dans les kératinocytes de peau, par la voie extrinsèque (récepteurs de mort cellulaire) et par la voie intrinsèque (dommages à l'ADN et ROS).

Le récepteur de mort cellulaire FASR est activé par agrégation des récepteurs dans la membrane plasmique sous l'effet des UVR (chapitre 3-3), notamment les UVB, avec le recrutement de FADD, dans les kératinocytes transformés HaCaT *in vitro* [94] et dans les cellules épidermiques primaires de peau *in vivo* [93]. L'activation de FASR et le recrutement de FADD supporte l'hypothèse de la formation du complexe DISC entraînant l'apoptose. L'activation des récepteurs FASR par les UVB en absence du ligand est dépendante de la constitution des radeaux lipidiques dans les HaCaT [96]. L'activation des récepteurs TNFR1 par agrégation après exposition aux UVB a été montrée dans d'autres modèles [92,95], mais n'a pas encore été validée dans les kératinocytes. Enfin, des études ont montré que la présence des ligands de TRAILR1/2 et FASR sensibilise les kératinocytes humains de peau à

l'apoptose [173,174]. Ainsi, les récepteurs de mort cellulaire semblent jouer un rôle dans la mort induite par les UVR en présence ou en absence de leurs ligands.

La voie intrinsèque apoptotique est activée dans les kératinocytes épidermiques. Notamment, les UVB induisent l'activation de p53, des caspases 9 et 3 et une augmentation du niveau protéique de Apaf-1, dans un modèle *ex vivo* d'épiderme humain [175]. Dans ce modèle, la mort induite par les UVR est dépendante de p53 et semble activer l'apoptosome puis la cascade des caspases. L'activation des caspases 3 et 9 a aussi été confirmée dans les cellules immortalisées HaCaT [176]. L'importance de la caspase 9 et l'activation des caspases 9, 3 et 8 par les UVB ont été validées dans des kératinocytes primaires de peau [177].

L'initiation de la voie intrinsèque pourrait se faire via deux signaux, soit les dommages à l'ADN et les ROS. Les dommages à l'ADN induits par les UVR activent ATM, ATR et p53. Les protéines senseurs ATM et ATR pourraient être impliquées dans la mort cellulaire induite par les UVR par un mécanisme p53 dépendant ou non. Une déplétion d'ATR ou de la phosphorylation de Chk1 (une des cibles d'ATR), sensibilise les kératinocytes à la mort cellulaire induite par les UVB par un mécanisme indépendant de p53 [178]. En fait, une publication de Kemp et Sancar montre qu'ATR a un rôle opposé dans les cellules non-prolifératives comparées aux cellules prolifératives HaCaT en réponse aux UVC. Dans les cellules non-prolifératives, une inhibition d'ATR protège les cellules de la mort cellulaire, tandis qu'une inhibition d'ATR dans les cellules prolifératives augmente la mort cellulaire induite par les UVC. Dans cette étude, l'inhibition d'ATM n'a pas d'effet sur la survie des cellules irradiées, et il semble que l'effet d'ATR soit indépendant de p53 [179]. Ces publications mettent en évidence le rôle d'ATR dans la mort des kératinocytes exposées aux UVR.

Il est connu que la protéine p53 est activée par les UVR et qu'elle joue un rôle central dans la survie et la mort des kératinocytes après exposition aux UVR [180]. En effet, il semble que p53 puisse être pro [181] ou anti-apoptotique [182] dans les kératinocytes. Les protéines de la famille BCL2 sont impliquées dans cette régulation. Par exemple dans des kératinocytes primaires de peau, p53 régule Mcl-1 et Bcl-xL (ainsi que E2F1), conférant une protection pro-survie aux cellules irradiées par des UVB. L'inhibition de p53 réduit les niveaux protéiques de ces deux protéines anti-apoptotiques et augmente ainsi la mort cellulaire [182].

Une irradiation UVB de HaCaT induit une augmentation des protéines p53 et Bax et une diminution de Bcl-2 , puis une activation des caspases 3 et 9 [183]. Ainsi, la mort cellulaire initiée par les UVR nécessite la régulation de p53 et/ou des protéines de la famille BCL2. Les cellules HaCaT sont un modèle très utilisé afin de représenter les kératinocytes. Il est toutefois à noter que cette lignée est issue d'une transformation spontanée et possède des mutations sur les deux allèles du gène codant pour p53 [184]. De ce fait, la réponse au stress des cellules HaCaT pourrait être différente de kératinocytes sains.

L'oxydation semble jouer un rôle important dans l'apoptose des kératinocytes induite par les UVR. Notamment, des anti-oxydants sont capables de prévenir une partie de la mort cellulaire induite par les UVB dans les HaCaT [176,183]. La protéine Nrf2, qui active les systèmes antioxydants de la cellule est d'ailleurs impliquée. Chez la souris, une forte expression de Nrf2 dans les kératinocytes protège les cellules de l'apoptose induite par les UVB, en diminuant les ROS intracellulaires [185]. Enfin, dans des cellules HaCaT et des kératinocytes primaires de peau, les UVB stimulent la production de ROS puis l'activation des voies p38/JNK, une dépoliarisation des mitochondries et une activation des caspases 3, 9 et 8 avec le clivage de PARP1 et de Bid. La production de ROS est en partie liée à l'activité de Nox1 (NADPH oxydase 1). L'inhibition de Nox1 réduit la production de ROS, l'activation de la voie p38/JNK et l'apoptose induite par les UVB. De plus, l'utilisation d'antioxydants réduit la mort cellulaire des cellules HaCaT exposées aux UVB [55,186]. Ces études mettent en évidence le rôle des ROS dans l'activation de l'apoptose par les UVB.

D'autres protéines sont impliquées dans la mort des kératinocytes exposés aux UVR. Notamment, Nrf3 (un membre de la famille de Nrf2) est induit par les UVB dans les kératinocytes humains, et son activité pro-apoptotique passe par une diminution de l'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice. Son activation ne serait pas dépendante des ROS ou des dommages à l'ADN induits par les UVB [187]. La perméabilisation des membranes lysosomales par les rayons UVB pourrait aussi jouer un rôle important dans la mort apoptotique, notamment par la libération des enzymes cathepsines dans le cytosol. De plus, les kinases PKC δ et MAPK p38 pourraient avoir un rôle pro-apoptotique, notamment la kinase MAPK p38 participerait à la translocation de BAX à la mitochondrie et au relargage du cytochrome c dans les kératinocytes exposés aux UVR [180].

En résumé, les rayons UV causent des dommages à l'ADN, des ROS et l'agrégation de récepteurs de mort dans les kératinocytes de peau humaine. Ces stimulus initient différentes cascades de signalisation en parallèle dont l'activation de p53, de ATM et ATR, la régulation des kinases (MAPK) et des signaux pro-survie (NFκB et Akt), la réponse au stress oxydatif (Nrf2) et la modulation des protéines de la famille BCL-2 (Figure 25). La mort cellulaire dépendra de la balance de toutes ces voies et varie selon le type d'UVR, l'environnement des cellules et leur type (kératinocytes basaux ou supra-basaux). Après initiation des signaux par une dose létale d'UVR, la propagation et l'intégration des signaux mènent à l'activation des caspases et à la mort cellulaire.

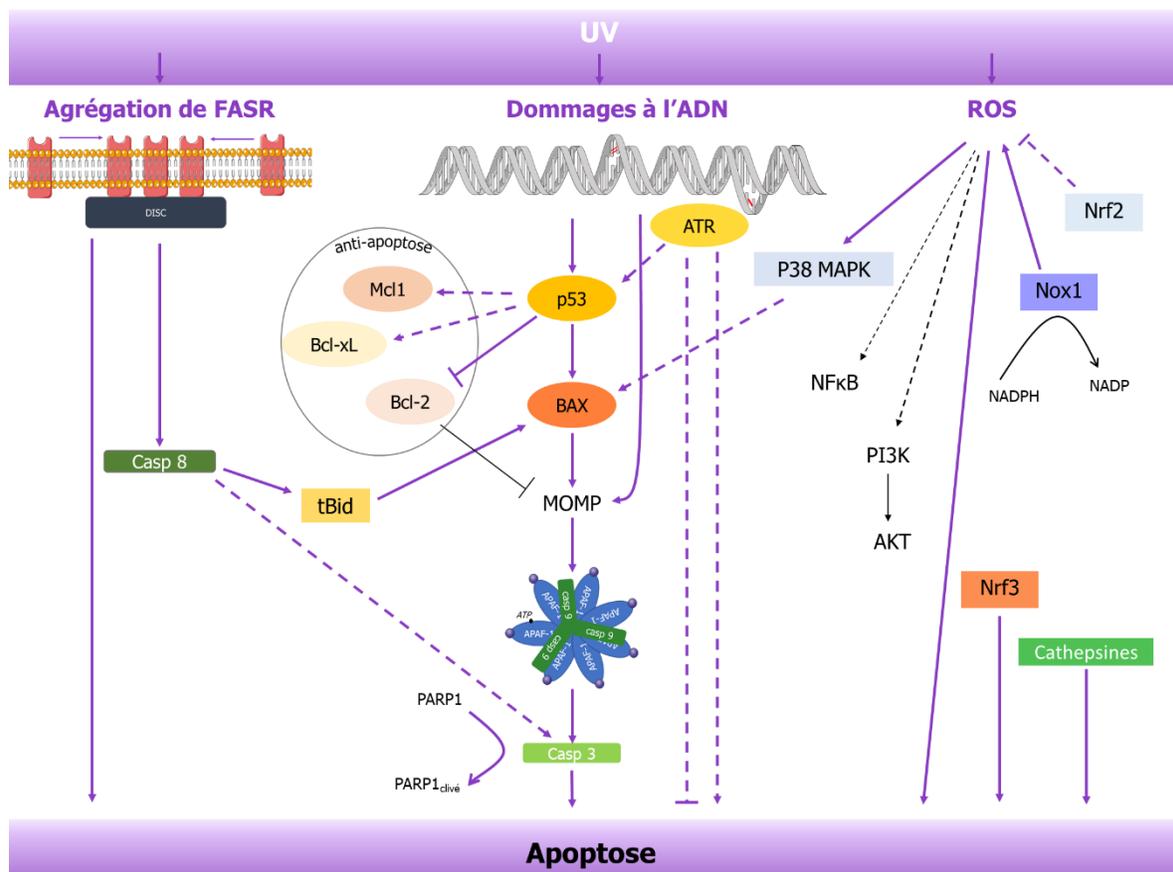


Figure 25 Schéma bilan des voies d'activation de l'apoptose dans les kératinocytes de peau après une dose létale d'UVR.

Schéma résumé des résultats obtenus sur des kératinocytes primaires de peau humaine et de souris, ainsi que des kératinocytes transformés HaCaT. Les voies apoptotiques, intrinsèques et extrinsèques, sont activées par les dommages à l'ADN (CPD et 6-4 PP) et les ROS, ainsi que l'agrégation des récepteurs de mort induits par les UVR. Les caspases-9, -3 et -8 sont retrouvées activées suite à la dépolarisation des membranes mitochondriales par l'ouverture du pore externe mitochondrial (MOMP).

5.2.2. L'apoptose induite par les UVR dans les fibroblastes de peau

Les fibroblastes de peau meurent aussi par apoptose après une exposition aux UVR bien que moins de publications s'y soient intéressées. Néanmoins, l'activation des récepteurs de mort par les UVB n'a pas été mise en évidence dans les fibroblastes dermiques. En fait, l'apoptose est indépendante du récepteur FASR dans les fibroblastes de souris (MEF, mouse embryonic fibroblasts) [188]. Une seconde étude sur des cellules MEF confirme que la mort de ces cellules induite par les UVC est indépendante de FADD, caspase 8 et Bid, suggérant que la voie extrinsèque n'est pas activée par les UVC [189]. En revanche, une autre étude sur des MEF montre que la mort induite par les UVC passe en faible partie par le récepteur FASR, excepté dans des cellules délétées en p53, où la mort cellulaire est largement dépendante de FASR [190]. Ainsi, l'apoptose induite par les UVR pourrait être initiée en faible partie par les récepteurs de mort cellulaire dans les fibroblastes, mais leur rôle en présence et en absence de ligands reste à caractériser dans le cadre d'une irradiation UVR de fibroblastes humains. La voie extrinsèque pourrait représenter un mécanisme de compensation lorsque p53 est absent ou inactif.

Selon les études existantes, le signal initial de mort cellulaire induit par les UVR dans les fibroblastes de peau proviendrait en grande partie des dommages à l'ADN. L'ajout de photolyase, qui répare les dimères de pyrimidines, diminue la mort induite par les UVB dans les fibroblastes de peau [191], mettant en évidence le rôle des dommages de types CPD et 6-4PP dans l'initiation de l'apoptose. L'ajout de photolyases dans des fibroblastes transformés provenant de patients XP, soit des fibroblastes possédants ou non les voies de réparations NER, confirme le rôle des CPD dans l'activation de la mort par les UVC [192]. Les fibroblastes provenant de patient XPA (soit ayant les deux voies de la NER non-fonctionnelles) sont plus sensibles aux UVB et à l'apoptose [193], suggérant que la présence des dommages active les voies de mort cellulaire. Le nombre de dommages ou leur localisation sur le brin transcrit pourrait avoir un rôle dans la cytotoxicité des UVR, le débat demeurant ouvert à ce sujet [194,195]. Les dommages induits par les UVR activent les protéines ATM et ATR, qui pourraient ainsi propager le signal de mort cellulaire.

Dans des fibroblastes prolifératifs transformés, l'inhibition de la protéine ATR augmente le nombre de cellules mortes (augmentation de cellules caspases 3 positives) après exposition

aux UVB. La suppression partielle d'ATR augmente notamment le stress réplicatif et entraîne une sensibilisation des cellules [196]. Comme pour les kératinocytes HaCaT, l'état prolifératif ou non-prolifératif des fibroblastes change le profil d'ATR et de ses cibles. Ainsi, la présence d'ATR et son activité pourraient avoir des effets différents sur la mort cellulaire induite par les UVR dans les fibroblastes selon leur état prolifératif [179]. Le signal pourrait passer par l'activation d'ATR, et potentiellement d'ATM [197], afin d'induire les protéines pro-apoptotiques de la famille BCL2 ou inhiber les protéines anti-apoptotiques, par des voies p53 dépendantes ou indépendantes.

Dans les fibroblastes de peau, la voie apoptotique intrinsèque passant par les protéines de la famille BCL2 semble largement responsable de la mort induite par les UVB. Notamment l'activation de l'apoptose est confirmée par une activation des caspases 3, 9 et 8 dans les fibroblastes dermiques [198,199].

Il a été montré que les UVB activent p53 dans des fibroblastes humains de peau, et que p53 inhibe le facteur de transcription E2F1, supprimant ainsi la surexpression de Bcl-2 par E2F1. Bcl-2 étant un anti-apoptotique, la balance p53-E2F1 est centrale dans l'induction de l'apoptose par les UVB. L'apoptose induite par les UVB a donc une composante dépendante de p53, mais possède aussi une composante indépendante car une portion des fibroblastes de peau p53^{-/-} meurt post-UV [191]. L'augmentation de p53 et la diminution de Bcl-2 par les UVB avaient déjà été observées dans des fibroblastes de peau [193,200]. De plus, dans les fibroblastes de souris, une étude a mis en évidence l'activation de p53 puis des protéines pro-apoptotiques BH3 Noxa et Puma après irradiation aux UVB [188]. Toujours dans des MEF, les UVC active les protéines pro-apoptotiques Bim et Bak. La protéine Apaf-1 est nécessaire à la mort induite dans ce modèle et les UVC activent les caspases 9 et 3, indiquant l'activation de la voie intrinsèque apoptotique [189]. Une autre étude dans des MEF confirme le rôle d'Apaf-1 dans la mort activée par les UVC. Les UVC élèvent le niveau protéique de Bax (pro-apoptotique), et des caspases actives 3 et 8 [190].

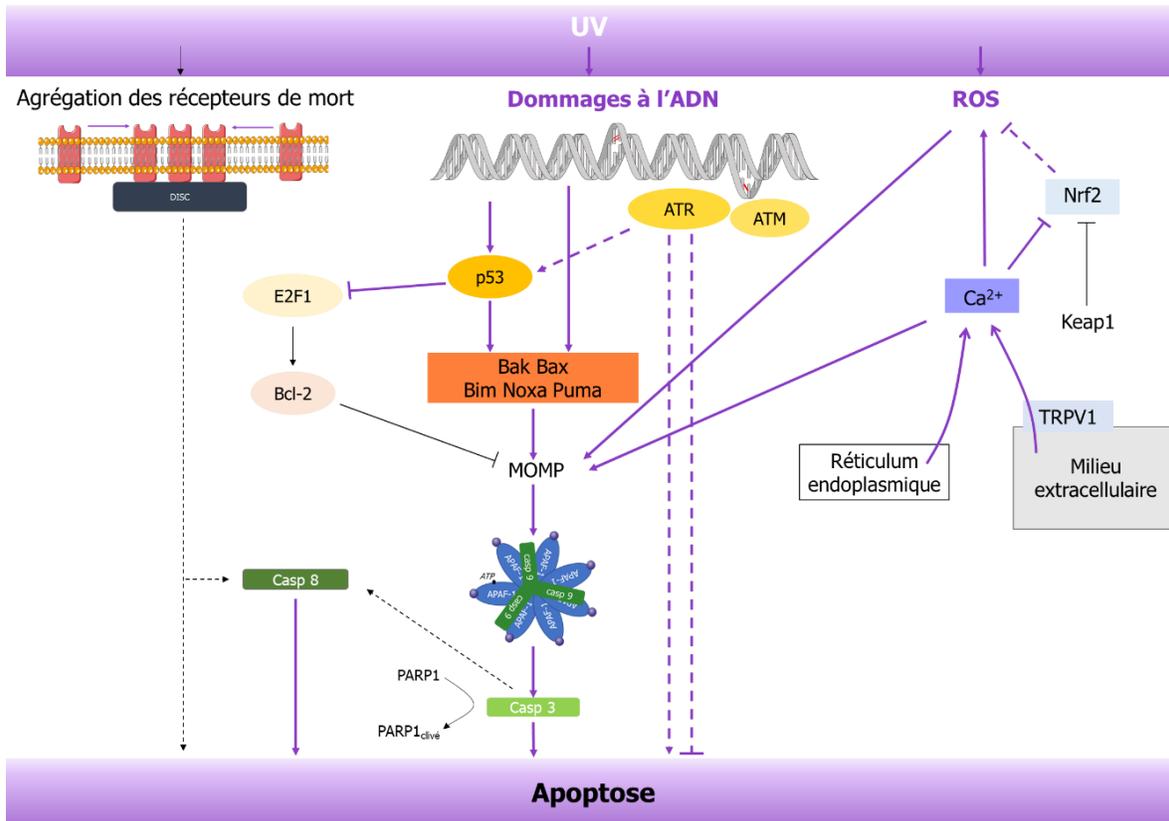


Figure 26 Schéma bilan des voies d'activation de l'apoptose dans les fibroblastes de peau après une dose létale d'UVR.

Schéma résumé des résultats obtenus sur des fibroblastes primaires de peau humaine et de souris, ainsi que des fibroblastes de peau provenant de patients XP. La voie apoptotique intrinsèque est activée par les dommages à l'ADN (CPD et 6-4PP) et les ROS. Les dommages à l'ADN entraînent une régulation des protéines de la famille BCL2 de manière dépendante et indépendante de p53, menant à l'apoptose. Les récepteurs de mort cellulaire pourraient jouer un rôle dans l'apoptose induite par les UVR. Les caspases-9, -3 et -8 sont retrouvées activées suite à la dépolarisation des membranes mitochondriales par l'ouverture du pore externe mitochondrial (MOMP).

Les ROS pourraient aussi initier la mort cellulaire dans les fibroblastes irradiés par des UVR. Dans un modèle de fibroblastes de souris, les UVA, et non les UVB, induisent une translocation de la protéine Nrf2 au noyau et protègent de la mort cellulaire une partie des fibroblastes. Une inhibition de Nrf2 sensibilise les cellules à la mort tandis qu'une inhibition de Keap1 a l'effet opposé [201]. Ainsi, la mort induite par les UVA dans les fibroblastes de peau pourrait être en partie induite par les ROS et dépendante des facteurs Keap1-Nrf2. Dans les fibroblastes de peau irradiés aux UVB, les ROS peuvent aussi avoir un rôle dans la mort cellulaire. Une étude propose un modèle dans lequel l'activation d'un transporteur de calcium

(TRPV1) par les UVB induit l'entrée du Ca^{2+} dans les fibroblastes, augmentant les ROS et diminuant le niveau protéique de Nrf2 et sa translocation au noyau. Ceci entraîne une perte du potentiel membranaire et une activation des caspases 3, menant à une augmentation de la mort cellulaire [202]. Une autre étude met en évidence l'augmentation du stress oxydatif par les UVB et la libération de calcium du réticulum endoplasmique au cytosol. La réduction du stress oxydatif et le maintien de l'homéostasie du calcium cellulaire limite l'apoptose induite par les UVB [200]. Ainsi, l'augmentation de calcium et des ROS intracellulaires conjointement à la baisse des défenses antioxydantes pourraient jouer un rôle dans l'apoptose des fibroblastes exposés aux rayons UVB.

En résumé, dans les fibroblastes de peau, une dose létale d'UV induit des dommages à l'ADN de type dimères de pyrimidines, qui ne pouvant être tous réparés, conduisent à l'activation des voies de mort cellulaire. L'activation de ces voies passe en partie par la régulation de ATM, ATR et p53 ainsi que le contrôle des protéines de la famille BCL2. L'activation des caspases aboutit à l'apoptose. Les ROS et le niveau de calcium intracellulaire jouent aussi un rôle dans la mort induite par les UVR, soit en diminuant les défenses antioxydantes ou en intervenant sur l'ouverture du pore externe mitochondrial (Figure 26). Les ROS pourraient jouer un rôle d'initiateur de l'apoptose ou d'amplificateur de la voie apoptotique.

En conclusion, malgré des différences entre les fibroblastes et les kératinocytes de peau, les UVR induisent de l'apoptose liée à la formation de CPD et 6-4PP (dimères de pyrimidines) et de ROS. L'agrégation des récepteurs de mort cellulaire par les UVR, ou leur activation par des ligands, peut aussi activer la voie extrinsèque apoptotique. Le mécanisme de mort initié par les dommages à l'ADN est en partie contrôlé par les protéines ATM, ATR, p53, et la régulation des protéines de la famille BCL2. L'induction de l'apoptose par les UVR est confirmée par l'activation des caspases. Les ROS semblent aussi avoir un rôle dans la mort induite par les UVR en passant par une régulation de la protéine Nrf2 et de ses cibles dans les cellules de peau (Figure 27). Ces résultats ont aussi été observés dans d'autres modèles dont les cellules HeLa ou encore des cellules cancéreuses [203–206].

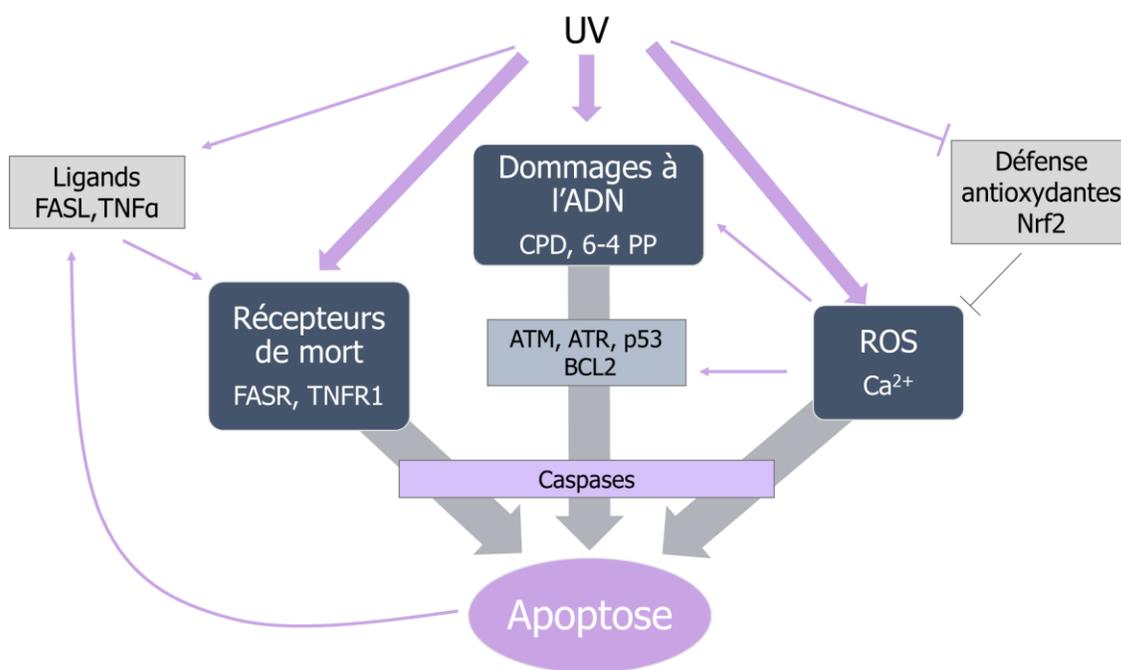


Figure 27 Mécanismes induits par les UVR menant à l'apoptose dans les cellules de peau.

5.2.3. Autres voies de mort cellulaire régulées induites par les UVR

Peu de publications se sont intéressées aux autres voies de mort cellulaire (non-apoptotiques) pouvant être activées par les UVR dans les kératinocytes et fibroblastes de peau. D'ailleurs, par le passé, l'apoptose était souvent caractérisée par les changements morphologiques et/ou la présence de la phosphatidylsérine sur la membrane externe, or ces changements peuvent

être présents dans d'autres types de mort que l'apoptose, menant à des conclusions potentiellement erronées. Afin de conclure à l'activation de l'apoptose, il est important de regarder l'activation des caspases ou le clivage de leurs cibles. Ce qui a par le passé été décrit comme de la nécrose, a par ailleurs, déjà été observé après expositions de cellules aux UVR. Ici, nous verrons que dans des modèles spécifiques, les UVR activent des voies non-classiques apoptotiques ou non-apoptotiques, laissant supposer qu'il pourrait en être de même pour les cellules de peau.

Il a été proposé dans les neutrophiles que les UVC induisent en parallèle de l'apoptose, mesurée par le clivage de la caspase 3, la libération de pièges NET mesuré par la décompaction de la chromatine et la présence d'ADN extracellulaire. Cette étude suggère qu'il existe une nouvelle forme de mort cellulaire induite par les UVC qui mêle des caractéristiques de l'apoptose et de la NETose, qu'ils nomment « apoNETose ». Cette voie passerait par la production de ROS par la mitochondrie menant à l'activation de la protéine MAPK p38 puis la production de pièges extracellulaires NET, et en parallèle, passerait par le clivage de la caspase 3 [207]. Il reste dans ce modèle à définir le rôle exact de la production de NET induite par les UVC dans la mort cellulaire. Néanmoins, cette publication suggère que les UVR peuvent induire d'autres formes de mort que la voie classique apoptotique.

Dans un modèle *in vitro* cellulaire et *in vivo* chez la souris, des macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM) et des macrophages péritonéaux (PM) ont été irradiés aux UVC. L'étude met en évidence une activation de l'apoptose dans les cellules « wild-type » et une diminution de la mort cellulaire dans les cellules déplétées en protéine MYD88 (myeloid differentiation primary response 88). En absence de MYD88, la mort induite par les UVC passe d'un phénotype apoptotique à un phénotype nécrotique qui semble être de la nécroptose (augmentation du niveau protéique de RIPK3). Les chercheurs proposent une activation de la nécroptose par les UVC dans les BMDM et PM en absence de MYD88 et une initiation de l'apoptose en présence de MYD88 [208]. Cette publication suggère que les cellules peuvent avoir une solution de sauvegarde en réponse aux UVR lorsque l'apoptose est inhibée, soit des mécanismes de compensation permettant de supprimer les cellules endommagées malgré une impossibilité d'initier l'apoptose.

De plus, PARP1 et AIF semblent avoir un rôle dans la mort induite par les UVR dans différents types cellulaires, suggérant une possible activation de la parthanatos sous certaines conditions par les UVR [209–212]. En effet, dans les cellules HaCaT, l'exposition aux UVR (A et B) induit l'activation de PARP1 et l'augmentation de son activité (production de PAR) avec la consommation de NAD⁺, ainsi que l'activation des caspases 3, 7 et 9, et la libération du cytochrome c et de AIF de la mitochondrie au cytosol. L'inhibition de PARP1 réduit tous ces changements et bloque une partie de la mort cellulaire induite par les UVR, et diminue la réparation des CPD. Au vu du rôle important de PARP1 dans la mort cellulaire et du relargage d'AIF, les auteurs suggèrent l'activation d'une voie PARP1-AIF indépendante des caspases en plus de l'apoptose, qu'ils nomment « apoptose indépendante des caspases », et qui correspondrait potentiellement à la parthanatos [210]. Cette hypothèse devra être vérifiée et il est à noter que les HaCaT possèdent des mutations dans le gène p53 (dans les deux allèles), rendant possiblement p53 non fonctionnel [213]. Il est probable que le statut de p53 influence les voies de mort activées par les UVR. PARP1 est activée de manière biphasique dans des fibroblastes humains et murins [214], ainsi que dans des cellules épithéliales de cristallin [209], soit rapidement après une irradiation UVB (5 min post-UV), puis 1 à 2h plus tard. La première activation serait liée aux dommages de types dimères de pyrimidines, la seconde aux ROS [214]. Il serait intéressant d'étudier le lien entre cette activation biphasique de PARP1 par les UVB et la mort cellulaire.

Dans les cellules humaines Jurkat, des lymphocytes T, les UVB induisent de l'apoptose qui est mesurée par l'activation des caspases 3, 9 et 8. Une perte du potentiel membranaire mitochondrial, la translocation d'AIF de la mitochondrie au noyau, ainsi qu'une externalisation de la phosphatidylsérine (marquage par l'annexine V) au niveau de la membrane plasmique, sont aussi observées après une exposition aux UVB. Ces changements ne sont pas modifiés par l'inhibition des caspases (z-VAD-fmk, inhibiteur de caspases général) mais par une inhibition des ROS, suggérant que les UVB sont capables d'activer l'apoptose par une voie dépendante des caspases, et active une autre voie de mort, qui est indépendante des caspases et qui passe par la translocation d'AIF, soit une voie non-apoptotique [211]. Dans des cellules de trophoblaste embryonnaire, l'inhibition de PARG, la protéine de dePARylation, entraîne un switch dans l'activation des voies de mort cellulaire. En effet, lorsque PARG est présente, les cellules irradiées aux UVC meurent par apoptose

(clivage de la caspase 3, clivage de PARP1, externalisation de la phosphatidylsérine) sans translocation d'AIF. En revanche, dans des cellules déplétées en PARG, la mort cellulaire observée corrèle avec une augmentation de la quantité de PAR qui transloque à l'extérieur du noyau, une translocation de la protéine AIF de la mitochondrie au noyau, une diminution du clivage de la caspase 3 et de PARP et une diminution de l'externalisation de la phosphatidylsérine [212]. Cette voie semble correspondre à la parthanatos. Ainsi, la perte de la protéine PARG change la voie de mort activée par les UVC de l'apoptose à la parthanatos.

Différentes voies de mort cellulaire pourraient être activées par les UVR en fonction du type cellulaire, de leur environnement, de la présence et/ou du statut (mutations) des protéines clés comme p53, mais aussi du type et de la dose d'UVR employés. Notamment, de la parthanatos ou de la nécroptose pourrait être activée.

De nouvelles études ont permis de mieux comprendre et caractériser les formes de nécroses programmées (section 5-1). En plus de leur récente caractérisation, la découverte de nouveaux marqueurs, le développement de techniques et la disponibilité de nouveaux outils (anticorps spécifiques par exemple) permettent d'envisager l'étude de voies non-apoptotiques pouvant être activées par les UVR dans les cellules de peau.

5.2.4. La mort un mécanisme de protection anti-tumorale ?

L'activation des voies de mort cellulaire est nécessaire chez l'humain au développement et au maintien de l'homéostasie des tissus et de leur fonctionnalité. La mort cellulaire représente aussi un mécanisme de protection anti-tumorale. En effet, la mort cellulaire régulée, souvent appelée « suicide cellulaire », permet de supprimer les cellules endommagées notamment les cellules contenant des dommages à l'ADN. Or, ceux-ci peuvent mener à des mutations du génome, pouvant affecter les séquences et la fonctionnalité des protéines traduites. Les protéines mutées peuvent avoir une perte ou un gain de fonction [215,216].

Les dommages à l'ADN induits par les UVR peuvent conduire à des mutations (mutations signatures, chapitre 3-1) notamment dans le gène du facteur de transcription p53. Celui-ci est essentielle à différents processus cellulaires, dont la réparation des dommages, la mort cellulaire et l'arrêt du cycle cellulaire. Les mutations de protéines clés, comme p53, ont un rôle dans l'initiation et le développement tumoral, notamment des cancers de peau [215,216].

Lors de dommages, les cellules induisent un arrêt du cycle cellulaire et la réparation des dommages afin d'éviter la formation de mutations. Lorsque la présence de dommages à l'ADN et dommages cellulaires dépasse la capacité cellulaire de réparation, la balance mort-survie change et la cellule initie les voies de mort cellulaire programmées [216]. Cela permet de supprimer les cellules à risque de développer des mutations et de l'instabilité génomique. La mort cellulaire est un mécanisme de protection puisqu'elle supprime l'initiation de la transformation tumorale.

Les cellules cancéreuses sont capables d'éviter la mort cellulaire, en plus de déclencher une immunosuppression, d'être prolifératives et éventuellement d'acquérir un phénotype invasif [215]. Ainsi, les cellules saines sont en général capables de mourir par voies régulées, ou s'engagent dans la sénescence. La possibilité, pour une cellule, d'activer plusieurs voies de morts cellulaires et/ou d'avoir des voies de compensation (backup) dans le cas d'une inhibition de la voie de mort cellulaire principale, peut être un avantage pour contrer l'initiation tumorale. En revanche, un excès de mort cellulaire peut être néfaste dans les tissus, et notamment induire une réaction immunitaire importante, pouvant mener à des pathologies [217].

Le rôle de la mort cellulaire dans la progression tumorale est complexe, car si la mort cellulaire régulée est d'abord vue comme un mécanisme de protection par suppression des cellules endommagées, elle peut aussi avoir un rôle pro-tumoral. En effet, dans un tissu épithélial comme l'épiderme, l'induction de la mort cellulaire, notamment par les UVR, peut laisser un espace à combler par les cellules alentours. Si une cellule alentour a échappé aux mécanismes de défenses antitumorales, elle a alors la place de se diviser et commence à envahir le tissu [217]. Il existe la théorie du « double punch solaire » qui propose un modèle dans lequel une première exposition d'UVR induit des dommages à l'ADN, qui se transforment en mutations dans au moins une cellule, qui échappe alors à la mort cellulaire. Une deuxième exposition, entraîne la mort de kératinocytes alentours, permettant à la cellule mutée de proliférer par expansion clonale [218] et éventuellement d'acquérir de nouvelles mutations pro-tumorales, et le cycle continue et se répète. Dans ce contexte, la mort cellulaire peut avoir un rôle indirect pro-tumoral [219,220].

Ainsi, la mort cellulaire permet à la fois de supprimer les cellules endommagées et donc réduit l'initiation tumorale, mais peut promouvoir l'expansion de cellules prolifératives mutées et ainsi avoir un rôle pro-carcinogène (Figure 29) [217].

La suppression des cellules cancéreuses par activation de la mort cellulaire est une stratégie étudiée et utilisée en oncologie [217]. Une des stratégies, basée sur la létalité synthétique est maintenant utilisée. La létalité synthétique est le fait d'utiliser un médicament afin de déclencher la mort de cellules cibles, ici cancéreuses, qui possèdent une sensibilité à la mort liée à la perte d'un gène, tout en n'initiant pas la mort des cellules saines (ou non ciblées) car elles ne possèdent pas cette sensibilité [221]. Activer différentes voies de mort cellulaire dans les cellules cancéreuses pourrait s'avérer une stratégie intéressante en synergie avec la chimio/radio/immuno-thérapie, notamment pour activer différentes réponses immunitaires et/ou tuer les cellules cancéreuses résistantes à la mort apoptotique [222].

Ainsi, l'étude des voies de mort cellulaire activées par les UVR, notamment par les UVB qui ont un rôle important dans la cancérogénèse via la formation de dimères de pyrimidines, est essentielle. Connaître les protéines impliquées, les voies activées par les UVR et les potentielles voies de compensation en absence d'apoptose sont des connaissances clés vers le développement de stratégies de protection contre la transformation tumorale. Dans cette thèse, les fibroblastes sont utilisés comme un premier modèle d'étude de la mort induite par les UVB.

5.3.Complexité des voies de signalisation

La mort cellulaire est une des réponses face au stress génotoxique que sont les UVR et représente un mécanisme de protection vis-à-vis de l'initiation tumorale. Néanmoins, elle a aussi un rôle à jouer dans la progression et l'expansion de cellules mutées. L'étude des voies de signalisation est complexe car un même stimulus, ici les UVR, peut entraîner différentes réponses selon le type cellulaire, les UVR utilisés (A, B ou C) et leur dose. Chaque cellule, après l'initiation de la signalisation cellulaire, intègre les signaux et active en parallèle différentes voies, pouvant avoir des conséquences opposées, comme pro- ou anti-survie. Pour complexifier le tableau, certaines protéines sont impliquées dans plusieurs des voies activées. Ces multiples rôles rendent possible une régulation fine des différentes réponses cellulaires.

5.3.1. Activation de la mort cellulaire dépendante du type de cellules et d'UVR

Nous avons vu que des spécificités existent entre les kératinocytes et les fibroblastes en ce qui concerne la mort induite par les UVR. Les fibroblastes, les kératinocytes ou encore les mélanocytes répondront différemment à une même dose d'UVR et seront plus ou moins sensibles à la mort. De plus, la mort cellulaire sera influencée par le type d'UVR choisi. En effet, les UVC et UVB conduisent principalement à la formation de dommages à l'ADN CPD et 6-4PP, avec une faible formation de ROS comparée aux UVA qui produisent une plus grande quantité de ROS [56,223]. Comme la mort cellulaire dépend en partie des dommages, de leur nature et de leur quantité, il est à prévoir que le type d'UVR et la dose appliquée aura un effet différent sur un même type cellulaire.

En effet, il a été observé que différentes cellules (lymphome de souris 3SB, lymphocyte humain Jurkat, carcinome humain HeLa et MCF-7) exposées à la même dose d'UVC ont une réponse apoptotique différente. Notamment, la vitesse d'activation des caspases et de condensation de l'ADN varient. L'inhibition des caspases induit une suppression totale ou partielle de la mort cellulaire induite par les UVC dépendamment du type cellulaire [224]. Pour une même dose d'UVA, les fibroblastes et les kératinocytes ont un profil de marquage des cellules par l'iodure de propidium et l'annexine V distinct, suggérant une divergence dans les voies de mort cellulaire activées [225]. Ainsi, malgré des similarités, les voies de mort cellulaire activées par les UVR peuvent varier d'un type cellulaire à l'autre.

De plus, les kératinocytes de peau humaine répondent différemment à une irradiation UVA et UVB. Une irradiation aux UVA mène à des dommages à la membrane plasmique, réparés par exocytose lysosomale, et un stress lysosomal qui entraîne l'activation de la caspase 8 par les cathepsines, ce qui n'est pas le cas après une exposition aux UVB [226]. Dans les cellules HaCaT, les chercheurs ont comparé des doses d'UVB et UVC menant à une diminution similaire de la viabilité (80% de cellules mortes à 24h post-irradiation). Ils observent alors une plus grande quantité de CPD et 6-4PP après exposition aux UVC, mais un clivage des caspases 3 et de PARP1 plus rapide après une irradiation aux UVB. Cette contradiction est expliquée par une activation de la caspase 8, indépendamment de l'activation des caspases 3 et 9 par les UVB, qui n'est pas présente avec les UVC [227]. Ces exemples montrent les différentes réponses cellulaires dépendamment du type d'irradiation choisie.

5.3.2. Interaction entre les différentes voies activées par les UVR: réparation, arrêt du cycle, mort, survie et métabolisme

Lors d'une exposition aux UVR, les cellules activent une pléthore de voies signalétiques dont des voies pro-survie, tel que les voies PI3K-Akt, NFκB ou Nrf2 (section 4-3), ou des voies de mort cellulaire (section 5-2). Il existe donc un équilibre entre les signaux pro-survie et anti-survie, qui penchera vers l'une ou l'autre des réponses en fonction du contexte et de l'environnement.

De plus, l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation des dommages sont intimement liés, et on peut rajouter à cela la part du métabolisme, puisque l'ATP est nécessaire à la réparation [228,229]. L'arrêt du cycle cellulaire et la réparation des dommages peuvent être vu comme des mécanismes pro-survie, puisqu'ils laissent le temps à la cellule de corriger les dommages ou de les tolérer. En revanche, lorsque les dommages sont trop importants, les voies de mort cellulaire prennent le dessus, avec la mitochondrie comme organelle centrale à plusieurs voies de mort cellulaire régulées, dont l'apoptose. Au centre de ces voies de signalisation, on retrouve des protéines communes aux différentes branches de la réponse cellulaire aux UVR. En voici trois: p53, PARP1 et ATR (Figure 28).

La protéine p53 est activée par les UVR. Ce facteur de transcription peut induire l'arrêt du cycle cellulaire par l'activation transcriptionnelle des protéines p21 et p14, qui en jouant sur les cyclines, arrête le cycle cellulaire en phase G1. En parallèle, p53 affecte directement deux protéines de la GG-NER en activant la transcription de XPE et XPC. Enfin, p53 joue sur l'apoptose en interagissant avec les protéines de la famille BCL2. FASR est aussi une des cibles du facteur de transcription p53 [216]. Ainsi, p53 exerce un rôle central dans la réponse cellulaire aux radiations UV.

PARP1 joue aussi un rôle décisif dans la réponse cellulaire. En effet, PARP1 est capable de lier et PARyler différents composants de la machinerie de réparation de l'ADN, dont la NER [230]. PARP1 est clivée par les caspases lors de l'apoptose, mais pourrait aussi jouer un rôle plus direct dans la mort UVR induite (section 5-2). Notamment, PARP1 est activée par les UVB et est liée à des changements du métabolisme induits par les UVB dans les cellules HaCaT (section 4-4).

ATR est recrutée aux dommages à l'ADN produits par les UVR [231]. ATR phosphoryle de nombreuses cibles et intervient ainsi dans des processus majeurs, dont l'arrêt du cycle cellulaire (section 4-1), et la mort cellulaire (section 5-2). Le rôle anti-apoptotique d'ATR suite à des UVC semble passer par une interaction directe d'ATR avec t-Bid, ce qui empêcherait t-Bid de lier Bax et d'engendrer une ouverture du pore externe mitochondrial [232]. En plus de cela, ATR exerce un rôle direct dans la réparation NER. Notamment, ATR phosphoryle XPA et cette phosphorylation promeut la réparation des dommages CPD [233]. La phosphorylation de XPA par ATR stabilise la protéine XPA en évitant sa dégradation [234].

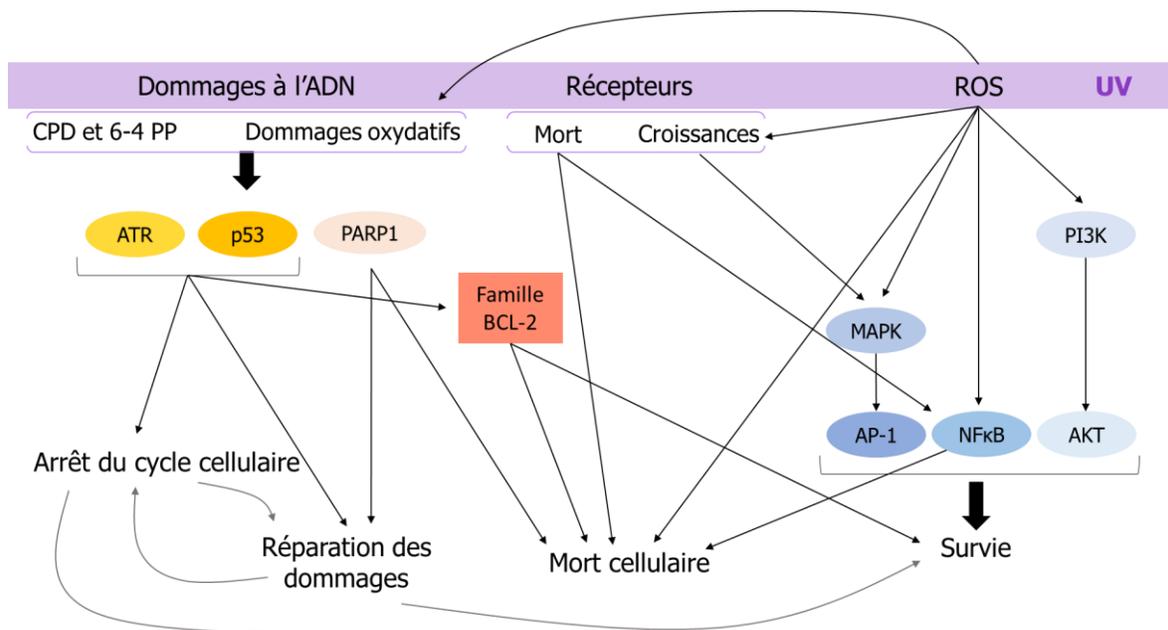


Figure 28 Complexité et crosstalk des voies de signalisations activées par les UVB.

Certaines protéines comme ATM, PARP1 et p53 ont des rôles dans différentes voies cellulaires, dont la réparation des dommages, l'arrêt du cycle cellulaire, la mort cellulaire et la survie. Ces voies peuvent être activées par les UVB qui induisent des dommages à l'ADN (CPD, 6-4PP), des ROS et l'activation des récepteurs membranaires. La régulation des différentes voies peut aboutir à la survie cellulaire, qui dépendra de la réparation des dommages et l'arrêt du cycle cellulaire concomitant, ou bien à la mort des cellules.

Ainsi, des protéines comme p53, PARP1 et ATR coordonnent la réponse cellulaire au stress génotoxique que sont les rayons UV. Leur contribution à différents processus permet la régulation et la synchronisation de l'arrêt du cycle cellulaire, de la réparation des dommages, de la mort ou de la survie, et de l'utilisation du métabolisme cellulaire.

6. Rôle de l'exposition chronique et effet à long terme des UVR

Jusqu'à présent, nous avons vu la réponse cellulaire à une irradiation unique d'UVR, qu'elle soit létale ou non. Nous aborderons ici, l'effet d'expositions solaires répétées (chronique) sur la réponse cellulaire et sur la peau.

L'exposition chronique aux UVR a des effets bénéfiques pour la santé humaine mais également des effets néfastes. La réponse biologique aux UVR peut être immédiate ou se développer à plus long-terme. L'exposition chronique est difficilement quantifiable, tant elle varie pour chaque individu. Des irradiations chroniques aux UVR peuvent induire la sénescence, l'immunosuppression, l'initiation et le développement des cancers de peau, le photo-vieillessement, mais aussi la production de vitamine D et la mélanisation de la peau.

6.1. La sénescence induite par les UVR

Le processus de sénescence peut être subdivisé en « sénescence répllicative » et « sénescence prématurée induite par un stress ». La sénescence se caractérise par un arrêt permanent de la croissance, sans activation des voies de mort cellulaire. La sénescence répllicative comprend un maintien des cellules en arrêt du cycle cellulaire pouvant être causé par un raccourcissement des télomères critique et l'activation des protéines p53, p21 et p16. Les cellules non-immortalisées finissent par atteindre la sénescence répllicative, comme c'est le cas pour les fibroblastes de peau. Les cellules en sénescence prématurée induite par un stress expriment des biomarqueurs de la sénescence répllicative, soit une augmentation de l'expression de p21 et p16, et n'est pas associée à une réduction des télomères critique à la réplication. Des doses chroniques d'UVB peuvent induire la sénescence des fibroblastes de peau [235]. Un modèle de sénescence induite dans les fibroblastes de peau utilise 8 doses d'UVB à 3250 J/m² réparties sur 4 jours afin d'obtenir des cellules sénescents. Celui-ci a mis en évidence un rôle du protéasome et de l'autophagie dans la sénescence induite par les UVB [236]. Un second modèle a été mis en place en exposant des fibroblastes de peau à 10 irradiations de 2500 J/m² réparties sur 5 jours, et dans ce modèle TGF- β s'est avéré un facteur clé de la sénescence [237]. L'induction de la sénescence dans les cellules de peau et le photo-vieillessement sont foncièrement reliés, la sénescence est d'ailleurs une des marques du vieillessement [238].

6.2. Immunosuppression

Les UVR sont capables d'induire une immunosuppression, locale et systémique, et de jouer sur la réponse immunitaire innée et adaptative dans la peau par différents mécanismes. L'acide urocanique (UCA) est un métabolite de la dégradation de l'histidine qui, sous l'effet des UVR, passe d'un isomère trans à un isomère cis. Le cis-UCA entraîne la production de la prostaglandine E2 qui supprime la réponse à l'hypersensibilité de contact, qui est une réaction inflammatoire en réponse à un haptène (une partie d'un antigène) exogène par les lymphocytes T. Les dommages à l'ADN de type CPD modulent la réponse immunitaire. Par exemple, les CPD induits dans l'ADN de cellules de Langerhans vont induire une différenciation des cellules T en cellules régulatrices (T_{REG}) au lieu de cellules T effectrices [239]. Les ROS et l'oxydation des lipides sont aussi impliqués dans l'immunosuppression. L'activation du récepteur de la vitamine D sur les cellules dendritiques inhibe la maturation de ces cellules qui ne présenteront pas l'antigène de manière optimale. La modulation de la réponse immunitaire est observée par un changement dans la production des peptides antimicrobiens par la peau après une exposition aux UVR et par de l'inflammation liée à la production de cytokines pro-inflammatoires par les kératinocytes. L'immunosuppression et la tolérance immunitaire induites par les UVR passent par la modification de la fonction des lymphocytes T, notamment par l'induction de cellules T_{REG} [239,240]. La modulation chronique de la réponse immunitaire par les UVR joue un rôle dans les cancers de peau.

6.3. Les cancers de peau

Les cancers de peau peuvent être classés en deux sous-groupes, soit les cancers mélanomes et les cancers non-mélanomes. Parmi les cancers non-mélanomes, on retrouve principalement les carcinomes basocellulaires et spinocellulaires. L'exposition chronique aux UVA et UVB est un risque majeur dans la formation des cancers de peau [241].

6.3.1. Carcinomes et mélanomes

Les carcinomes proviennent de la transformation tumorale de kératinocytes. Le carcinome basocellulaire (CBC) est le type de cancer le plus fréquent et provient des cellules basales de l'épiderme, soit des cellules souches au niveau des follicules pileux ou des cellules souches

et/ou progénitrices de la couche basale de l'épiderme. Ce type de cancer n'est pas connu pour métastaser mais peu envahir les tissus proches. Le CBC est associé à des expositions fortes et peu fréquentes ou intermittentes d'UVR. Le carcinome spinocellulaire (CSC) est la deuxième forme de cancer de peau la plus fréquente. Il prend naissance dans les cellules squameuses de la peau et contient des cellules souches ou progénitrices des kératinocytes. Il peut envahir les tissus voisins et s'infiltrer s'il est non traité. Les CSC peuvent métastaser et sont associés à une exposition chronique modérée et fréquente d'UVR [215]. Les mélanomes sont moins fréquents et proviennent de la transformation de mélanocytes, les cellules produisant le pigment de mélanine. Ils sont considérés comme les cancers de peau les plus dangereux, notamment car ils sont hautement invasifs et sont les cancers de peau les plus mortels. Les personnes de peau claire, cheveux roux et yeux clairs sont les plus à risque de développer des cancers de peau car ils sont moins protégés par la mélanine produite par la peau [242].

Les mutations signatures des UVR sont retrouvées dans les cancers de peau, spécifiquement dans le gène p53. Néanmoins, les carcinomes et principalement les mélanomes, portent des mutations dans les gènes RAF qui ne sont pas des mutations signatures des UVR [243].

On retrouve de 30 à 70% des CSC et CBC contenant des mutations dans le gène p53, avec une majorité de ces mutations correspondant à des mutations signatures des UVR (environ 70%) [57,216]. La protéine p53 est souvent surexprimée et possède une demi-vie plus longue dans les cellules CSC comparées aux cellules saines [244]. La protéine p53 est aussi surexprimée dans les CBC [245]. Dans les CBC, la voie de signalisation Hedgehog est fréquemment retrouvée dérégulée (jusqu'à 90% des cas). Le récepteur PTCH1 (Patched 1) et la protéine SMO (smoothened) font partie de la voie de signalisation Hedgehog, qui est impliquée dans l'organogénèse, la maintenance des cellules souches, la réparation et la régénération des tissus. Dans la peau, cette voie contrôle le maintien de la population de cellules souches et le développement du follicule pileux. Dans des cellules saines, en absence de son ligand, PTCH1 inhibe et séquestre la protéine SMO, tandis qu'en présence de son ligand, PTCH1 relâche SMO, menant à l'activation de facteurs de transcription. Dans 90% des CBC une perte de fonction de PTCH1 et une activation aberrante de SMO sont retrouvées. Dans 10 à 20% des CBC, SMO acquiert un gain de fonction [246].

Concernant les mélanomes, 40 à 60 % des mélanomes primaires cultivées en laboratoire possèdent des mutations dans le gène BRAF, principalement la mutation V600E, qui rend la protéine constitutivement active. B-Raf, fait partie de la voie de signalisation des MAPK, son activation entraîne notamment la prolifération des cellules. Une fois mutée, B-Raf entraîne une hyper-prolifération des cellules tumorales. Le dérèglement de p53 est aussi un facteur important dans l'initiation des mélanomes. Enfin, les personnes ayant des variants du gène MC1R (récepteur melanocortin-1) sont plus à risque de développer des mélanomes. La production de mélanine est induite par l'exposition aux UVR. Les kératinocytes et mélanocytes produisent des peptides de mélanocortines qui stimulent les récepteurs MC1R à la surface des mélanocytes. Le récepteur activé régule la pigmentation de la peau par la production de mélanine, la prolifération cellulaire et l'apoptose. Certains variants du récepteur MC1R ne peuvent pas s'associer à la protéine PTEN, un inhibiteur de la voie PI3K-Akt, ce qui conduit à la survie des cellules tumorales [215,242].

L'immunosuppression et la perte des voies de mort cellulaires participent à la cancérogénèse [242]. Les dommages à l'ADN de type dimères de pyrimidines jouent aussi un rôle dans l'initiation des tumeurs. Les patients XP, qui possèdent des mutations dans les gènes codant les protéines XP impliquées dans la NER, ont un risque très élevé de développer des cancers de peau très jeunes. Une étude sur 106 patients montre qu'à 13 ans, la moitié de la cohorte a développé au moins un cancer de peau [247].

Le derme joue un rôle dans la progression des carcinomes de peau. La dégradation du collagène de la membrane basale (membrane entre la couche dermique et épidermique) aide notamment à l'infiltration des cellules tumorales dans le derme. Les fibroblastes associés au cancer (CAF) jouent un rôle dans l'invasion des cellules cancéreuses [215]. Les CAF sont des cellules recrutées dans l'environnement tumoral qui favorise les métastases par le remodelage de la matrice extracellulaire, l'angiogenèse, la production de cytokines et la modulation du système immunitaire [248].

6.3.2. Mécanismes de protection antitumorale

Dans la peau, les UVA et UVB sont à la fois initiateurs et promoteurs des cancers (Figure 29). Les UVR induisent la formation de dommages à l'ADN menant à des mutations,

notamment dans le gène de p53. La mort induite par les UVR permet ensuite l'expansion des cellules transformées dans les niches cellulaires voisines. Enfin, les UVR favorisent le maintien et l'invasion des cellules cancéreuses par immunosuppression et digestion de la matrice dermique, créant un environnement facilitant la migration des cellules cancéreuses [215,216,242].

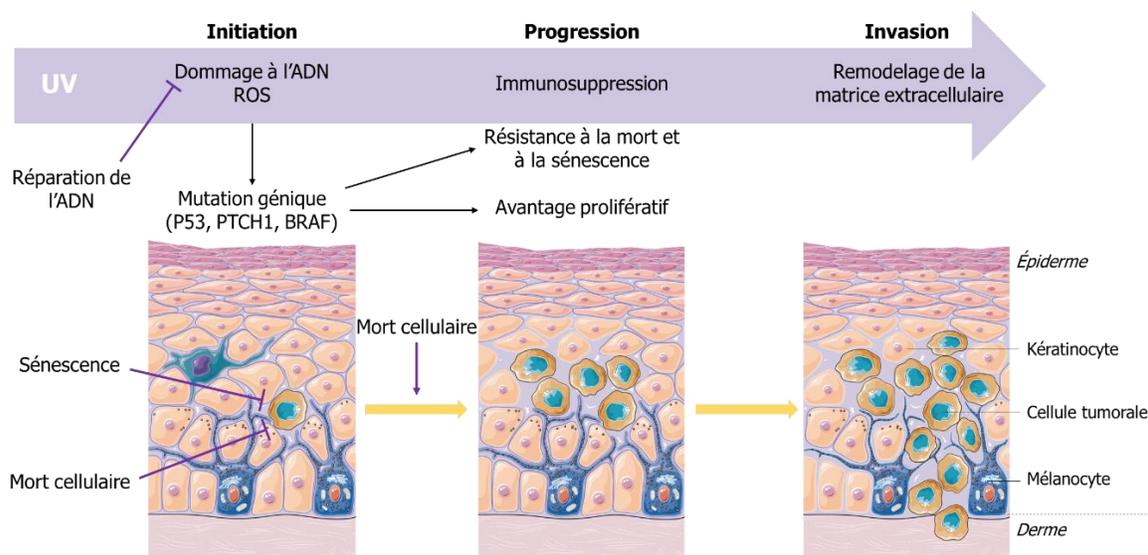


Figure 29 Mécanismes menant à l'initiation, la progression et l'invasion tumorale dans la peau.

Les UVR sont des initiateurs et promoteurs de la carcinogénèse. La réparation des dommages, la sénescence et la mort cellulaire sont des mécanismes de protection antitumorale.

La réparation des dommages ou la mort cellulaire sont des mécanismes qui suppriment l'initiation tumorale, en réparant les dommages ou en supprimant les cellules. Un autre mécanisme protégeant les cellules de l'initiation et de la progression tumorale est la sénescence, qui empêche la prolifération des cellules [249,250]. Par conséquent, la réparation des dommages, la mort cellulaire et la sénescence forment une première ligne de défense face à la transformation tumorale (Figure 29).

6.4. Le photo-vieillessement

Le vieillissement est un processus naturel accompagné de changements phénotypiques, structuraux et fonctionnels des tissus. Le débalancement de l'équilibre oxydants/antioxydants et l'accumulation de ROS et dommages oxydatifs au cours de la vie jouent un rôle important dans le processus du vieillissement cutané. Le photo-vieillessement est une forme de

vieillessement prématuré qui se produit sous l'effet de l'exposition chronique à la lumière et notamment aux UVA et UVB [251]. Nous aborderons brièvement le rôle des UVR dans le photo-vieillessement de la peau.

6.4.1. Changements accompagnant le photo-vieillessement

Dans la peau, le vieillissement se caractérise par l'apparition de rides, une perte de l'élasticité, une atrophie du derme et de l'épiderme avec perte de l'organisation structurale de la matrice extracellulaire dermique. Le photo-vieillessement accélère ou augmente les effets visibles du vieillissement et impacte les tissus exposés. L'exposition de la peau au soleil provoque des rides plus creusées, une inégalité de la pigmentation de la peau, une altération profonde de la matrice dermique et une fragilisation de la peau [252,253]. L'accumulation d'élastine et la dégradation du collagène sont des marqueurs du photo-vieillessement [253].

Les UVR induisent la production de métalloprotéinases matricielles (MMP), notamment via les voies MAPK, qui active le facteur de transcription AP-1 (section 4-3) entraînant la production des MMP 1, 3 et 9 [70,71,205,254]. La formation de ROS et de dommages oxydatifs, comme l'oxydation des lipides, sont liés à la production de MMP, et participe donc au photo-vieillessement. L'utilisation d'antioxydants diminue l'activation des MMP induites par les UVR. En plus de l'activation des MMP, les UVR pourraient changer la balance MMP/TIMP [253,255]. Les gènes du collagène I, COL1A1 et COL1A2, sont négativement régulés par AP-1. De plus, les changements dans l'expression de cytokines et de facteurs de croissance (TNF- α , TGF β , ...) ou de leur récepteurs, induits par l'exposition des cellules aux UVR, jouent aussi sur le remodelage de la matrice extracellulaire [251,255]. Les UVR induisent, par exemple, une diminution de l'expression du récepteur II du TGF β , ce qui réduit la signalisation du TGF β et diminue la synthèse de procollagène [256,257]. Les UVR induisent des changements structuraux de la matrice extracellulaire causant et accompagnant le photo-vieillessement, passant par la production de MMP et la réduction de la synthèse du collagène I (Figure 30).

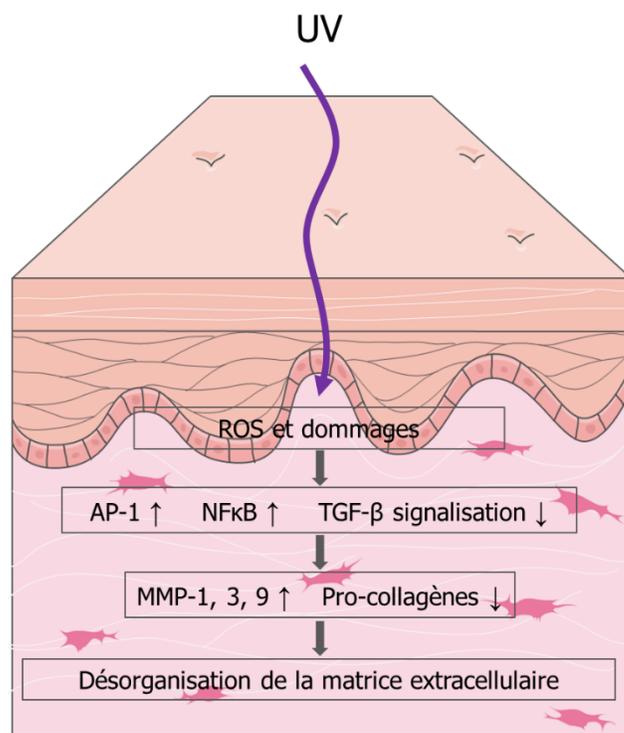


Figure 30 Mécanismes menant au photo-vieillessement de la peau.

Des changements dans l'expression des cytokines inflammatoires après exposition aux UVR, et le déséquilibres entre cytokines pro et anti-inflammatoires pourraient être un marqueur du photo-vieillessement [258,259]. De plus, l'expression d'enzymes et protéines dans les cellules de peau exposées aux UVR est aussi modifiée, comme celle de la stratifine, la tenascine, des lysozymes, des granzymes B ou de la cathepsines K, et pourraient jouer sur le photo-vieillessement [260]. Le rôle de ces différents facteurs et les mécanismes par lesquels ils agissent restent à comprendre afin d'avoir une image plus complète des processus menant au photo-vieillessement.

De surcroît, des mutations de l'ADNmt et des détériorations de l'activité métabolique mitochondriale pourraient accélérer le photo-vieillessement ou en être en partie la cause [71,253].

6.4.2. Au sein des mitochondries : mutations et ROS

Les mutations mitochondriales apparaissent durant le vieillissement et certaines s'accumulent dans les zones exposées à la lumière. Les mitochondries sont centrales au métabolisme cellulaire, possèdent un environnement propice à la formation de ROS (section

4-4) et sont affectées par les UVR (section 3-2). La délétion commune 4977pb et la délétion 3895pb sont retrouvées dans différents tissus au cours du vieillissement [261–264]. Chaque cellule détient de nombreuses mitochondries, qui possèdent elles-mêmes plusieurs génomes. Ainsi, maintes copies d'ADN mitochondrial sont présentes dans une cellule. Les cellules sont capables de tolérer des mitochondries contenant des génomes mutés (mutations ponctuelles et/ou délétions) et des génomes non-mutés. Cela mène à de l'hétéroplasmie, soit un mélange de génomes mitochondriaux sains et mutés dans une même mitochondrie [84].

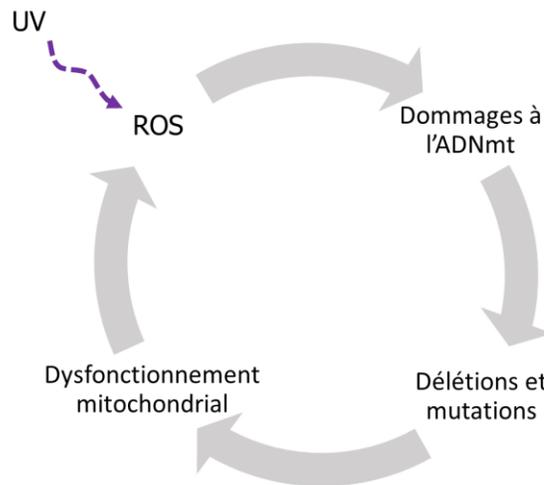


Figure 31 Cercle vicieux favorisant le vieillissement des cellules et tissus.

Les ROS induisent des dommages à l'ADN mitochondrial (mutations ponctuelles et délétions), entraînant un dysfonctionnement de l'activité mitochondriale et la production de ROS. Ce cercle peut être favorisé par les UVR, et participerait au vieillissement.

Il existe l'hypothèse d'un cercle vicieux du vieillissement (Figure 31). Dans celui-ci, la production de ROS induit des dommages mitochondriaux tel que les délétions dans l'ADNmt. L'accumulation de ces dommages provoque éventuellement des déficiences dans la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui induit la production de ROS, contribuant ainsi au déséquilibre oxydants/antioxydants cellulaires. Le cycle se poursuit ainsi de suite menant au vieillissement des tissus [84]. Plusieurs hypothèses existent quant à l'origine de ces mutations. En ce qui concerne les mutations ponctuelles, il a été proposé qu'une mauvaise incorporation de nucléotides par la polymérase face à des dommages oxydatifs dans l'ADN mitochondrial pourrait créer des mutations ponctuelles. Les délétions pourraient être causées par une mauvaise réplication au niveau de motifs répétés, ou par la formation de cassures

double brin ou simple brin menant à une mauvaise liaison et/ou une dégradation d'une partie de l'ADNmt [265].

Les UVR et l'augmentation du stress oxydatif peuvent induire une accumulation de ces mutations qui peuvent alors être considérées comme des marqueurs du photo-vieillessement. L'accumulation des mutations mitochondriales a été étudiée dans les organes exposés aux radiations solaires, soit la peau et les yeux. Un ensemble de mutations est retrouvé en plus grande quantité dans la peau exposée comparée à la peau non-exposée (T414G, délétion commune 4977pb, délétion 3895pb, etc.) [87,88,266,267], et dans certaines structures oculaires (délétion commune 4977pb, délétion 3895pb) [85,86] attestant d'une accumulation dépendante de l'âge et de l'exposition solaire.

Dans les yeux, la présence des délétions 4977pb et 3895pb a été étudiée au sein du laboratoire. Ces études ont mis en évidence l'accumulation des délétions dans le stroma cornéen avec l'âge [85,86]. Le stroma est un tissu très exposé aux UVR car il fait partie de la cornée, qui a pour fonction de filtrer les UVB [9]. Ainsi les délétions 4977pb et 3895pb pourraient être utilisées comme marqueurs du photo-vieillessement dans le stroma cornéen. L'étude de la mutation T414G dans l'œil est traitée dans l'annexe 1.

La mesure et le rôle de l'exposition solaire oculaire cumulée sont difficiles à évaluer de façon épidémiologique. La quantification de l'ensemble de ces mutations en lien avec l'exposition solaire dans les différentes structures de l'œil procurera un outil de mesure de l'exposition solaire cumulée chez l'humain. Avec cet outil, il deviendra alors possible d'évaluer la contribution de l'exposition solaire dans différentes pathologies où ce facteur de risque est encore controversé (e.g., dystrophie de Fuchs, glaucome, dégénérescences liées à l'âge, mélanome uvéal) [268–271].

6.5. Production de la vitamine D

La vitamine humaine D3 est une vitamine liposoluble qui démontre un large éventail d'action, et qui se retrouve dans le corps entier. Elle agit comme une hormone stéroïdienne et augmente l'absorption du calcium et du phosphore intestinal, inhibe la prolifération cellulaire, induit la différenciation terminale, inhibe l'angiogenèse et stimule la production

d'insuline. Elle influence différents processus au niveau des os, du système immunitaire et cardiovasculaire, du pancréas, des muscles ou encore du cerveau. La vitamine D3 est produite à partir de 7-déhydrocholestérol qui est converti par l'absorption d'UVB en pré-vitamine D3, puis en cholécalficérol par isomérisation thermique dans la peau. Le 7-déhydrocholestérol, un dérivé du cholestérol, a son spectre d'absorption complètement inclus dans les UVB [272]. La vitamine D3 est ensuite activée par deux hydroxylations. La première se fait dans le foie par la D-25-hydroxylase et permet la formation de la 25-hydroxyvitamine D3 (25-OHD) appelée calcidiol, puis est hydrolysée principalement dans les reins par l'hydrolase CYP27B1 pour former la vitamine D3 active 1,25-dihydroxyvitamine D3 (1,25-OHD), appelée calcitriol (Figure 32) [273]. La principale source de vitamine D3 est la synthèse de la pré-vitamine D3 par l'action des UVB. Un faible apport de vitamine D3 est amené par l'alimentation. Ainsi, une exposition quotidienne à la lumière solaire est nécessaire à la production de vitamine D3 active. En effet, les déficiences en vitamine D induisent chez l'adulte des faiblesses osseuses, avec une diminution de la densité minérale osseuse liée à des problèmes dans l'absorption du calcium et du phosphore, augmentant le risque de fracture. Chez les enfants en développement une telle déficience peut entraîner des déformations osseuses et du rachitisme [274].

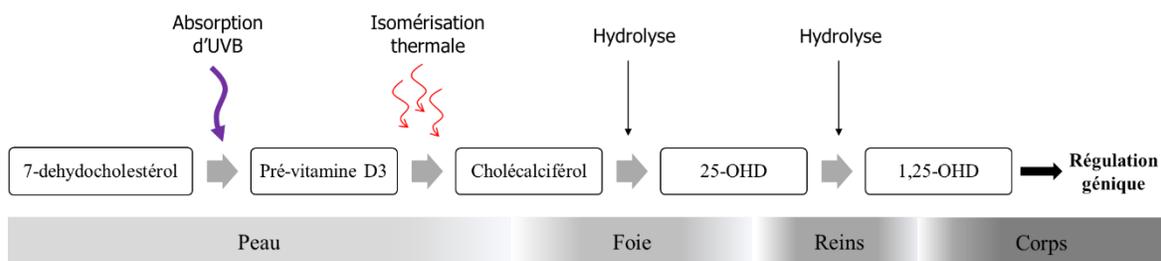


Figure 32 Processus de production de la vitamine D3 et rôle des UVB.

6.6.La mélanisation

Pour conclure sur l'effet chronique des UVR sur la peau, nous aborderons la production et l'influence de la mélanine dans la peau. Sous l'effet du soleil, la peau peut prendre une teinte plus foncée et bronzer. C'est, en fait, une réaction des mélanocytes en réponse aux UVR, qui vont produire de la mélanine dans des organelles que l'on nomme mélanosomes. Ceux-ci

sont ensuite redistribués aux kératinocytes avoisinants. Le pigment de mélanine permet de protéger les cellules de peau en absorbant l'énergie de la lumière et notamment des UVR. La mélanine s'accumule principalement autour du noyau et forme ainsi une protection comme un chapeau au-dessus du noyau [275]. En dermatologie, les individus sont subdivisés en sous-groupes allant de la peau de type I au type VI, en fonction de la couleur de peau et de la capacité de la peau à bronzer et prendre des coups de soleil. C'est le système de Fitzpatrick [276] qui est utilisé (tableau 1).

Type de peau	Phénotype (site non-exposé)	Sensibilité au coup de soleil (rougeur et brûlure)	Habilité à bronzer	Susceptibilité au cancer de peau
I	Peau blanche (très claire)	Brûle toujours	Jamais	Forte
II	Peau blanche (claire)	Brûle facilement	Bronze à minima	Forte
III	Peau blanche (couleur crème)	Brûle moyennement	Bronze graduellement	Forte
IV	Peau légèrement brune	Brûle légèrement	Bronze facilement	Moyenne
V	Peau brune	Brûle rarement	Bronze abondement	Basse
VI	Peau noire	Ne brûle jamais	Bronze toujours	Basse

Tableau 1 Type de peau et leur sensibilité à prendre des coups de soleil et bronzer selon le système de Fitzpatrick.

Il existe deux types de mélanine : la phéomélanine, claire et jaunâtre, et l'eumélanine, foncée et brune. Chaque individu produit un mélange de ces deux pigments avec un ratio variable, et présente une redistribution des mélanosomes différente, donnant la couleur à notre peau. Le ratio d'eumélanine sur la mélanine totale est un facteur clé de la pigmentation de la peau, plus il y a d'eumélanine, plus la peau est foncée [275].

Les pigments de mélanines (phéo- ou eu- mélanine) sont formés à partir du substrat initial tyrosine par oxydation et cyclisation. La production d'eumélanine nécessite l'activation des enzymes TRP1 et TRP2 (tyrosine -related protein 1 et 2). Le récepteur de la mélanocortine MCR1 joue un rôle dans le choix du type de mélanine produit. Ainsi, une déficience ou une inhibition du récepteur empêche la formation de l'eumélanine et favorise donc la production de phéomélanine. En effet, MCR1 active les voies de signalisation liées à l'activation de la transcription de TRP1 et TRP2 [277].

Les peaux foncées ont donc plus d'eumélanine que les peaux claires. De plus, elles ont généralement plus de mélanine totale, qui est redistribuée dans tout l'épiderme, tandis que les peaux blanches ont moins de mélanosomes et ceux-ci sont principalement concentrés dans la couche basale et épineuse. Les personnes plus claires de peau ont plus de risque de développer des cancers de peau [278,279]. La mélanine, du moins l'eumélanine semble avoir un effet protecteur.

Une étude a démontré que les dommages CPD et 6-4PP après une exposition aux UVR sont répartis différemment dans l'épiderme de personnes à peau claire et à peau foncée. En effet, moins de CPD sont retrouvés dans la couche basale épidermique chez les personnes foncées comparées aux personnes claires, qui présentent des dommages dans tout l'épiderme [280]. Une seconde étude a observé cette même différence, et trouve une protection des cellules basales chez les personnes à peau foncée (type VI) 59 fois plus élevée au regard des CPD, comparé à des peaux claires (Type I et II). De plus, la quantité de mélanine chez les personnes foncées est plus élevée comparativement aux personnes claires [281]. Cette protection de la couche basale par la mélanine pourrait expliquer la faible susceptibilité des personnes foncées aux cancers de peau.

Néanmoins, la phéomélanine entraîne une production de ROS pouvant endommager les cellules, avec ou sans exposition aux UVR. Les personnes rousses ou blondes, aux yeux clairs et peau claire, qui ont moins d'eumélanine, sont plus à risque de développer des cancers de peau [279]. De plus, la mélanine participe à la formation de dark CPD (section 3-1).

Le rôle de la mélanine comme agent protecteur est obscurci par le fait que la phéomélanine induit la formation de ROS sous l'effet des UVR, mais aussi que certains variants du gène MCR1, qui inhibe la production d'eumélanine, augmentent le risque de mélanome. Le ratio phéomélanine/eumélanine pourrait donc jouer sur les capacités protectrices de la mélanine face à la lumière.

6.7. Comparaison du régime d'irradiation aigu et chronique sur la réparation de l'ADN

L'exposition chronique aux UVR a des effets sur différents processus cellulaires, dont la sénescence, l'immuno-modulation, la mélanisation, la production de vitamine D, et participe à l'initiation et progression des cancers de peau. La chronicité joue également sur la réparation de l'ADN.

Au sein du laboratoire, une méthode d'irradiation chronique d'UVB a été mise en place pour étudier la réponse cellulaire à ce stress génotoxique. Ce traitement utilise une répétition de 15 doses faibles non-létales d'UVB (75 J/m^2), soit une irradiation toutes les 12h durant 7.5 jours. Ce régime d'irradiation est nommé CLUV pour « chronic low dose of UVB ». Ce traitement peut être suivi d'une dose aiguë plus forte pour étudier la réponse adaptative des cellules. Il sera utilisé au chapitre 3.

Il a ainsi été observé dans les fibroblastes de peau que le traitement CLUV induit, à lui seul, des CPD qui ne sont pas réparés par la cellule et qui sont tolérés. De plus, après une irradiation aiguë de 400 J/m^2 (non-létale), les fibroblastes ayant reçu un pré-traitement CLUV réparent plus de CPD comparativement aux cellules non prétraitées. Ainsi le traitement CLUV induit une réparation plus rapide ou plus efficace des CPD lorsque les cellules subissent ensuite une exposition UVB [282,283]. Il a été montré que la CLUV induit une augmentation du niveau protéique de p53, XPC et DDB2. XPC et DDB2 sont les protéines de reconnaissance des dommages de la GG-NER (section 4-2). L'augmentation du niveau protéique de XPC et DDB2 par la CLUV pourrait expliquer pourquoi les cellules qui subissent une irradiation aiguë plus forte d'UVB suivant une CLUV ont une réparation plus rapide des CPD [283]. Les fibroblastes humains de peau ont donc une réponse adaptative à l'exposition chronique d'UVB.

Dans les kératinocytes transformés spontanément HaCaT la réparation de l'ADN est ralentie par un pré-traitement CLUV. La CLUV induit des dommages CPD non-réparés qui sont tolérés par les cellules HaCaT. À l'opposé des fibroblastes de peau, les cellules HaCaT ont plus de CPD restants après une CLUV suivie d'une irradiation aiguë, comparé à une

irradiation aigüe seule (résultats en cours de publication Marie M. Dorr and Patrick J. Rochette).

Ainsi, l'efficacité de la réparation de l'ADN est modifiée par une exposition chronique des cellules *in vitro*.

7. Contexte et objectifs des travaux de recherches

L'exposition aux UVR est un facteur important dans l'initiation et le développement des cancers de peaux qui affectent principalement les cellules de l'épiderme, soit les kératinocytes et les mélanocytes (section 6-3). Le rôle des UVB en tant que stress génotoxique est mis en évidence par la production de dommages à l'ADN sous forme de CPD et 6-4PP (section 3-1). La réparation des dommages par la voie NER (section 4-2) a été étudiée dans les kératinocytes et les fibroblastes de peau sous un régime d'irradiation principalement unique et parfois chronique [282,284]. La mort cellulaire est une autre réponse possible à l'exposition UVB. Les études se sont concentrées sur la voie apoptotique en utilisant différents modèles (types cellulaires) afin de caractériser les voies d'activation de l'apoptose par les UVR, notamment les UVB. Néanmoins, l'activation d'autres voies de mort cellulaire par les UVB n'a été que très peu étudiée et les protéines impliquées dans la mort cellulaire induite par les UVB dans les cellules de peau restent à identifier (section 5-2). De plus, l'effet du régime d'irradiation, unique ou chronique, sur la mort cellulaire induite par les UVB a été peu abordée [282]. Nous posons l'hypothèse que des voies non-apoptotiques, et leurs protéines spécifiques, pourraient être activées par des irradiations UVB dans les fibroblastes primaires de peau humaine (NHDF).

Dans ces travaux de recherche, les NHDF ont été utilisés pour répondre aux différents objectifs. Ils représentent un modèle qui a l'avantage d'être simple à utiliser et sur lequel il est possible de réaliser des irradiations chroniques. De plus il a pour avantage d'utiliser des cellules primaires dont les protéines pouvant être impliquées dans la mort cellulaire sont sous forme non-mutées (wild type), à l'opposé des cellules transformées ou des cellules cancéreuses ou pré-cancéreuses. Enfin, les précédentes études utilisant la CLUV au sein du laboratoire ont été menées sur ce même modèle de fibroblastes de peau, permettant de

comparer et de croiser les résultats obtenus. Cette étude représente une première étape de caractérisation des voies de mort activées par les UVB dans des cellules humaines de peau en régime unique et chronique.

7.1.Premier objectif : Caractériser les voies de mort activées par les UVB dans les fibroblastes de peau humaine

La première question à laquelle cette thèse s'applique à répondre est la suivante : Quelles voies de mort cellulaire, apoptotiques et non-apoptotiques, peuvent être induites par les UVB dans les cellules de peau humaines ?

Pour répondre à cette question, les NHDF exposés à une dose unique létale d'UVB ont été utilisés comme modèle d'étude. L'objectif consistait à mettre en évidence les voies de mort pouvant être activées par les UVB dans des cellules humaines de peau. Les voies d'apoptose, de ferroptose, de nécroptose et de parthanatose ont été évaluées. Le premier chapitre vise donc à examiner l'activation des voies de mort cellulaire apoptotiques et non apoptotiques par une exposition unique aiguë d'UVB dans les fibroblastes dermiques.

7.2.Second objectif : Évaluer le rôle de RIPK3 et MLKL dans la mort induite par les UVB dans les fibroblastes de peau

Une étude faite précédemment au sein du laboratoire a mis en évidence que des irradiations chroniques d'UVB (CLUV) induisent une augmentation de la transcription du gène RIPK3 [282]. Cette protéine est impliquée dans la voie de nécroptose et active l'effecteur de la nécroptose MLKL. La question posée dans le second chapitre est la suivante : les protéines RIPK3 et MLKL sont-elles impliquées dans la mort induite par les UVB dans les cellules de peau ?

Les NHDF exposés à une irradiation aiguë létale d'UVB ont été utilisés comme modèle pour répondre à cette question. L'objectif consistait à vérifier l'implication des protéines RIPK3 et MLKL dans la mort induite par les UVB. Étant donné le rôle de RIPK3 et MLKL dans la nécroptose, ce chapitre vise à décrypter dans quelle voie ces deux protéines sont impliquées après une exposition unique d'UVB, c'est-à-dire dans l'apoptose et/ou dans la nécroptose.

7.3. Troisième objectif : Examiner l'effet du régime d'irradiation

Après avoir sondé les voies de mort activées et la participation des protéines RIPK3 et MLKL dans la mort cellulaire induite par une irradiation aigüe létale d'UVB, le rôle du régime d'irradiation dans la mort cellulaire a aussi été exploré. En effet, plusieurs questions se posent : 1/ l'exposition chronique aux UVB sensibilise-t-elle les cellules à la mort induite par une dose létale d'UVB ? et 2/ Les voies de mort activées sont-elles différentes pour des cellules ayant subi des irradiations chroniques d'UVB ?

Afin de répondre à ces questions, des NHDF ont été exposés au régime d'irradiations chroniques CLUV. La mort cellulaire a été évaluée après une irradiation aigüe létale d'UVB, dans des cellules prétraitées ou non par la CLUV. L'activation des protéines RIPK3, MLKL et des caspases a aussi été comparée dans des cellules prétraitées par la CLUV et des cellules non prétraitées, afin d'évaluer si l'exposition chronique aux UVB modifie la voie de mort activée à la suite d'une irradiation aigüe d'UVB.

Chapitre 1 : Apoptosis, the only cell death pathway that can be measured in human diploid dermal fibroblasts following lethal UVB irradiation

Sci Rep 2020 Nov 3;10(1):18946. doi: 10.1038/s41598-020-75873-1.

Anne-Sophie Gary^{1,2} and Patrick J. Rochette^{1,2,3,*}

1. Centre de Recherche du CHU de Québec – Université Laval, Axe Médecine Régénératrice, Hôpital du Saint-Sacrement, Québec, Qc, Canada

2. Centre de Recherche en Organogénèse Expérimentale de l'Université Laval/LOEX, Université Laval, Québec, Qc, Canada.

3. Département d'Ophtalmologie et ORL - chirurgie cervico-faciale, Université Laval, Québec, Qc, Canada.

* To whom correspondence should be addressed. Tel: (418) 682-7568; Fax: (418) 682-8000;

E-mail : Patrick-J.Rochette@crchudequebec.ulaval.ca

1.1 Résumé

Les radiations UV (UVR) sont hautement génotoxiques. Dans la peau, les UVR mènent à la formation de dommages mutagènes à l'ADN. Plusieurs mécanismes cellulaires existent afin d'empêcher la conversion de ces dommages en mutations. Un de ces mécanismes est la mort programmée, qui supprime les cellules endommagées. L'apoptose est la voie de mort la plus étudiée et la mieux caractérisée, mais de nombreuses autres voies de mort programmée émergent. En utilisant des antioxydants et différents agents pharmacologiques capables d'inhiber des voies de mort, nous avons évalué l'implication de l'apoptose, la nécroptose, la ferroptose et la parthanatos dans la mort induite par les UVB dans les fibroblastes dermiques humains. Nos résultats montrent que l'apoptose est la seule voie activée par une irradiation UVB dans les fibroblastes de peau. Une irradiation létale d'UVB induit aussi une diminution drastique de l'activité métabolique liée à l'activation de PARP et à une surutilisation du NAD⁺.

Mots clés:

Rayons ultraviolets (UVR), UVB, mort cellulaire programmée, apoptose, ferroptose, nécroptose, parthanatos, fibroblastes, activité métabolique cellulaire, PARP.

1.2 Abstract

Ultraviolet radiation (UVR) is a major environmental genotoxic agent. In skin, it can lead to the formation of mutagenic DNA damage. Several mechanisms are in place to prevent the conversion of these DNA damage into skin cancer-driver mutations. An important mutation prevention mechanism is the programmed cell death, which can safely dispose of the damaged cells. Apoptosis is the most studied and best characterised programmed cell death, but an increasing amount of new cell death pathways are emerging. Using different pharmacological cell death inhibitors and antioxidants, we have evaluated the implication of apoptosis, necroptosis, ferroptosis and parthanatos in UVB-induced cell death in human diploid dermal fibroblasts. Our results show that apoptosis is the only known cell death mechanism induced by UVB irradiation in fibroblasts. We also showed that lethal UVB irradiation induces a PARP-dependent drastic loss of cellular metabolic activity caused by an overused of NAD⁺.

Keywords:

Ultraviolet radiation (UVR), UVB, programmed cell death, apoptosis, ferroptosis, necroptosis, parthanatos, fibroblasts, cellular metabolic activity, PARP.

1.3 Introduction

A major environmental stress for skin is ultraviolet radiation (UVR) ¹. UVR is composed of UVC (200-280 nm), UVB (280-315 nm) and UVA (315-400 nm). UVC and short UVB (<295 nm) are extremely toxic for the cells but they are completely blocked by the ozone layer. Long UVB (295-315 nm) and UVA are poorly filtered by the ozone layer and are known to cause DNA damage and cell death to ocular and skin cells ²⁻⁶. UVA and UVB can penetrate skin and affect the epidermis and the dermis ^{7,8}. UVB wavelengths lead mainly to bi-pyrimidine DNA damage, i.e. cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) and pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts (6-4 PP) ^{9,10}. It can also cause oxidative damage to a lesser extent ^{11,12}. Several mechanisms are in place to prevent these damage from being converted into keratinocyte cancer-driver mutations ^{13,14}. An important mutation prevention mechanism is the nucleotide excision repair (NER) system, which removes bi-pyrimidine DNA photoproducts in human cells ¹⁵. When the extent of DNA damage is important, programmed cell death can be triggered to safely dispose of the damaged cell.

Programmed cell death is thus important for the suppression of damaged cells and is considered as an important skin cancer prevention mechanism ¹⁶. Among regulated cell death (RCD) pathways, apoptosis is the most studied and best characterised. Apoptosis is described as a cascade of activated caspases, leading to cell death, and triggered either by the intrinsic pathway (e.g. via DNA damage) or by the extrinsic pathway (e.g. via death receptors activation) ¹⁷. More recently, other programmed cell death pathways, such as necroptosis, ferroptosis and parthanatos, have been described and studied (reviewed in ¹⁸). Necroptosis results from the activation of a cascade of phosphorylation involving receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3 (RIPK3) and mixed lineage kinase domain-like (MLKL) kinases ^{19,20}. Ferroptosis is defined by the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 as a “form of RCD initiated by oxidative perturbations of the intracellular microenvironment that is under constitutive control by anti-glutathione peroxidase 4 (GPX4) and can be inhibited by iron chelators and lipophilic antioxidants”. Parthanatos is triggered by an hyperactivation of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and can be coupled to translocation of apoptosis inducing factor (AIF) from mitochondria to nucleus ^{21,22}. The study of cell death is

complicated by the crosstalk of cell death pathways and by the fact that death pathways depend on death signal, cell type and environment ²²⁻²⁴.

Apoptosis is the only pathway known to be activated by UVB in dermal fibroblasts and in epidermal keratinocytes ^{25,26}. However, recent studies have shown that UVR can induce other type of programmed cell death in other cell types. Indeed, UVC can induce neutrophil extracellular traps cell death (NETosis) and apoptosis simultaneously in neutrophil from human peripheral blood, with a predominance of apoptosis at low UV dose and an increase of NETosis at higher dose ²⁷. PARP-1 has been found to play a role in protecting human lens epithelium against low levels of UVB light, and the authors present the possibility that PARP may trigger cell death following a toxic level of radiation ²⁸. Also, the protein AIF has been shown to be involved in UVB-induced caspase-independent cell death in Jurka T Cell ²⁹. In a previous publication, we found an increased RIPK3 transcription post-UVB in fibroblasts ³⁰, suggesting the activation of necroptosis by UVB. Others studies have also shown that UVB-induced ROS are also involved in UVB-induced cell death and that PARP1 is involved in DNA damage response (DDR) ³¹⁻³⁴. Those results imply that UVR can potentially induce non-apoptotic programmed cell death in skin cells.

In this project, we have used different pharmacological cell death inhibitors and antioxidants to evaluate UVB-induced apoptosis, necroptosis, ferroptosis and parthanatos in human diploid dermal fibroblasts. Our results show that apoptosis is the only UVB-induced cell death pathway in fibroblast. We have also shown that PARP plays a non-parthanatos but rather metabolic key role in response to UVB.

1.4 Matériel et méthodes

All experiments in this study were performed in accordance with the Declaration of Helsinki, and the research protocol received approval by the CHU de Québec-Université Laval (Québec) institutional ethics committees for the protection of human subjects with written informed patient consent for study participation.

Cell Culture

Normal human diploid fibroblasts (NHDF) were taken from skin biopsies (mastectomy) of 4 healthy women from 18 to 38 years old (F18, F21, F23, F38). Fibroblast were cultured in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM; Wisent, Canada) supplemented with 5 % FBS (Sigma, Canada) and 1% penicillin/streptomycin (Wisent, Canada) at 37°C, 5% CO₂.

UVB irradiation and cellular treatment

NHDF were seeded at low confluency (day 1) in 6 or 12 well-plate for western blot, flow-cytometry or NAD-NADH analysis, or in 96 well-plate for cell viability assay (MTS). When cells reached full confluency, they were treated with either cell death inhibitors, antioxidant, or control media at the given concentration in DMEM. After 30 min of incubation, cells were irradiated in phosphate buffered saline (PBS; Wisent, Canada) with a lethal UVB dose of 20 000 J/m² in 6 well-plate or 12 well-plate and with 30 000 J/m² in 96 well-plate. The UVR source consisted of RPR-3000 lamps with an emission peak at 300 nm (Southern New England Ultraviolet Co., USA) filtered through a sheet of cellulose acetate to eliminate wavelengths under 295 nm (Kodacel TA-407 clear 0.015 inches; Eastman-Kodak Co., USA). Irradiance of this source is 19 W/m² as measured using an UVX radiometer equipped with an UVX-31 sensor (UVP, Upland, CA, USA). After irradiation, cells were returned in the incubator in DMEM containing or not the inhibitors or the antioxidants until they were harvested or analysed.

Inhibitor used to block necroptosis was Necrosulfonamide (NSA; R&D System, UK). Ferroptosis was inhibited using Ferrostatin-1 (Ferro-1; Millipore Sigma, USA). The potent and specific inhibitor Q-VD-Oph (Q-VD; Millipore Sigma, USA) was used to inhibit caspases. Two PARP inhibitors were used: ABT888, also known as veliparib (ABT; Santa

Cruz Biotechnology, USA) and 3-Aminobenzamide (3-ABA; Millipore Sigma, Germany). α -Tocopherol (α -Toc; Sigma, Germany) and N-acetylcysteine (NAC; Sigma, China) were used as general antioxidant, liposoluble and hydrosoluble respectively. Ethyl Sorbate was used as a triplet quencher (EthS; Millipore Sigma, USA).

Flow cytometry

After irradiation, NHDF were harvested 0 to 6h post-UVB. Cells were then labeled with propidium iodide (PI) and Annexin V-FITC to analyse cell death by FACS, using the kit Annexin FITC/PI (Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI for flow cytometry, Invitrogen, US). Irradiated cells (UVB) were compared to un-irradiated cells (NoUV). Total cell death was measured by adding the percentage of PI+ / Annexin V- cells, PI- / Annexin V+ cells and double positive cells. Annexin V binds to externalized phosphatidylserine of dying cells and PI enter cells when membranes are permeabilized.

Metabolic activity assay

MTS assay was performed (CellTiter 96® Aqueous non-radioactive Cell proliferation assay, Promega, USA) to assess metabolic activity, as describe by the manufacturer. Briefly, after UVB irradiation, cells were incubated at 37°C for 0 to 24h. Metabolic activity was then assessed by adding MTS reagents directly on cells. After 30 min to 1 h of incubation with the MTS reagent, absorbance at 490nm was measured. For each time point, irradiated cells (UVB) were normalised on un-irradiated cells (NoUV) of the same condition. Cells treated with the different inhibitors were compared to cells treated with the vehicle Dimethyl Sulfoxide (DMSO; Sigma, UK).

Western Blot analysis

After treatment and irradiation of NHDF, cells were harvested 0 to 12hr post-UVB. Cytosolic or total proteins were then quantified using BCA quantification (Pierce BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific, USA). Proteins were run on SDS-PAGE and visualised by SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA). Membrane were scanned using the C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences, USA) and analysed with Image Studio Lite software (LI-COR Biosciences, USA).

PAR and PARP analysis: To analyse PAR chain and PARP polymerase, cells were first wash in PBS and then harvest on ice directly in RIPA buffer (1% NP 40, 0.5% Sodium Deoxycholate, 0.1% SDS, 150mM NaCl, 50mM Tris HCl pH8) complemented with cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Germany) and phosphatase inhibitor PhosSTOP™ (Roche, Germany) using a cell scrapper. α -PAR (10H, 100ug/mL, 1:500, Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-56198, RRID: AB_785249) and α -PARP (F2, 200ug/mL, 1:500, Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-8007, RRID:AB_628105) were used in Western blot.

AIF analysis: To analyse AIF, cell pellets were harvested, and proteins were extracted from cytosol, mitochondria, and nucleus, using the Cell fractionation kit - Standard (Abcam, UK), according to the manufacturer. Nuclear proteins were resuspended in RIPA buffer. α -AIF (E-1, 200ug/mL, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-13116, RRID:AB_626654) was used in Western blot. AIF was also used as a mitochondrial control by simultaneously scanning the membranes from the 3 fractions. In the same way, α -Tubulin (DM1A, 1:500, Abcam Cat# ab7291, RRID:AB_2241126) and α -Lamin A/C (4C11, 1:500, Cell Signalling Technology Cat# 4777, RRID:AB_10545756) were used as cytosolic and nuclear controls, respectively.

NAD⁺ and NADH quantification

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)/NADH assay kit (Abcam, UK) was used as described by the manufacturer. Briefly, following UVB irradiation, cells were washed twice with PBS and 3×10^6 cells were harvested directly in 350ul of Extraction Buffer provided by the kit. After two thaw/freezing cycles, samples were centrifuged and supernatants containing NAD-NADH were collected. A protein quantification was performed by BCA quantification (Pierce BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific, USA). Same amount of proteins was used for each condition. Samples were divided, half was used to heat degrade NAD⁺, and the other half represents total NAD. The samples for total NAD was diluted in Extraction Buffer. Samples were then mixed with reaction buffer and Cycling Enzyme to transform all NAD⁺ in NADH, allowing the measure of total NAD (NAD_t). Concentration of NAD⁺ and NADH was then calculated by comparison to NADH standard curve.

Cell Death Assay (CellTOX)

Following UVB exposure, a cell death assay was performed (CellTox™ Green Cytotoxicity Assay; Promega, USA) according to the manufacturer protocol. Briefly, media supplemented with the different cell death inhibitors was added after UVB exposure, the fluorescent dye measuring changes in membrane integrity occurring as a result of cell death was added directly in media. Fluorescence (excitation peak at 480 nm, emission peak at 530 nm) was then measured at different time-point post-UVB (0h, 6h, 12h and 24h). Value from un-irradiated cells (NoUV) were subtracted to fluorescence from irradiated cells to remove the background. Fluorescence of each condition was relative to the 0h post irradiation.

Statistical analysis

Data are presented with mean +/- SD (or +/- SEM if specified), statistical significance was assessed using repeated measures (mixed model) two-way ANOVA with a Bonferroni post-test to compare the indicated experimental groups at different time points. The “N” indicates the number of human primary cultures used in each experiment. At least duplicates for each culture were averaged in each experiment to generate one value per culture. Then values from “N” culture were average and SD was calculated to generate data point within each experiment. A p-value < 0.05 was considered statistically significant. GraphPad Prism8 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) was used to determine statistical significance.

1.5 Résultats

1- UVB-induced early cell death

The apoptotic pathway can be activated by intra or extra-cellular stresses. UVB radiation can induce apoptosis in keratinocytes and fibroblasts ³⁵⁻³⁷. In fact, UVB radiation triggers the intrinsic and extrinsic pathway by damaging DNA, inducing oxidative stress and activating cell death receptors, causing a cascade of events leading to caspases activation ²⁵. Apoptosis can be visualised using Annexin V and propidium iodide (PI). We used this method to visualize early cell death in NHDF, 3h and 6h after UVB exposure. UVB irradiation increased PI positives cells from 13% to 22.7% and Annexin V positives cells from 4.2% to 16.2 % at 3h and 6h post irradiation, respectively. The total cell death (i.e. PI+/Annexin V- , PI+/Annexin V+ and PI-/Annexin V+ cells) also increased by 19% and 22.5 % at 3 and 6h post irradiation compared to unirradiated cells, respectively (Figure 1).

2- UVB-induced caspase and PARP -dependant loss of metabolic activity

To determine the specific pathway involved in UVB-induced cell death, we used different cell death inhibitors to block necroptosis, ferroptosis, PARP-dependent cell death or apoptosis. We assessed cell viability by measuring cellular metabolic activity using a MTS assay ³⁸. We showed a UVB-induced decrease in metabolic activity in primary human fibroblasts as early as 3-6h post exposition (Figure 2). Necrosulfonamide (NSA), the inhibitor of necroptosis, and Ferrostatin-1 (Ferro-1), the inhibitor of ferroptosis, did not induce any change in metabolic activity (Figure 2A, B). PARP inhibitors, i.e. ABT888 and 3-ABA, both prevented a loss of metabolic activity at 3-6h post-UVB in NHDF (Figure 2D, E). Moreover, the caspases inhibitor Q-VD-OPH prevented 26.8% of the metabolic activity loss observed at 24h post-UVB in NHDF (Figure 2C). Those results indicate a key role of PARP and caspases in UVB-induced metabolic activity loss in NHDF. Since caspases are specifically activated in the apoptosis cascade, the loss of metabolic activity at 24h can be attributed to UVB-induced apoptosis. PARP is known to play an important role in DNA damage response, notably in the repair of specific UVB-induced DNA damage ^{31,32,39}. Our results suggest that PARP have a new role in preventing cellular metabolic activity loss early (3-6h) after lethal

UVB irradiation in NHDF. Noteworthy, ABT888 blocked PAR formation without preventing caspase-dependent cleavage of PARP1 (Figure 2F). The prevention of metabolic activity loss using PARP inhibitors and caspase inhibitor did not occur at the same time period (i.e. early, 3-6h and late, 24h). This might reflect two independent events, but they can also be related. Using combination of different cell death inhibitors, we have thus focused on understanding the possible interplay between cell death pathways.

3- PARP inhibition and caspase inhibition independently prevent metabolic activity loss

Programmed cell death pathways depend on cell type, environment and cell death signal. Crosstalk can occur between different cell death pathways and/or survival and cell death signalling^{40,41}. We thus combined the inhibitors of necroptosis, ferroptosis and PARP with the caspases inhibitor in order to see potential compensation mechanisms or crosstalk between the different cell death pathways. Indeed, blocking apoptosis could lead to the induction of other cell death pathways to compensate. Q-VD alone had a similar effect on metabolic activity decrease caused by UVB irradiation than Q-VD combined with necroptosis inhibitor (NSA) or ferroptosis inhibitor (Ferro-1) (Figure 3A, B). This suggests that there is no compensation mechanism by necroptosis or ferroptosis after blocking apoptosis. However, combining PARP inhibitor (ABT888) and apoptosis inhibitor (Q-VD-Oph) restored both the early and late metabolic activity loss caused by UVB irradiation in NHDF. Indeed, the effect of the two inhibitors added up, restoring the metabolic activity from 73.6 % to 92.5 % at 6h post-UVB and from 28 % to 86 % at 24h (Figure 3C). We used another PARP inhibitor, 3-ABA, to confirm this result. The combination of 3-ABA and Q-VD-Oph also prevent metabolic activity loss at 6 and 24h post irradiation, but to a lesser extent than ABT888 (Figure 3D). Those results indicate that lethal UVB irradiation induces two independent and biphasic phase loss of metabolic activity, i.e. an early caspase-independent and PARP-dependent phase, and a late phase caspase-dependent apoptotic cell death. This effect is UVB dose independent (Figure S1).

4- UVB-induced cell death is independent of oxidation

Signal for UVB-induced cell death can come from direct DNA damage, oxidative stress or the activation of cell death receptors (review in ^{25,35}). We assessed the implication of oxidation in metabolic activity loss observed post UVB irradiation to determine the signal for early and late UVB-induced cell death. We used two broad-spectrum antioxidants, i.e. N-acetylcysteine (NAC) and α -Tocopherol, and a triplet acceptor, Ethyl Sorbate (Figure 4D). Neither antioxidants nor triplet quencher had an effect on early or late UVB-induced loss of metabolic activity (Figure 4A, B, C). This strongly suggests that oxidation does not play a significant role in UVB-induced apoptosis or PARP-dependant loss of metabolic activity in NHDF.

5- Total NAD is depleted by the UVB-induced PARP activation

It has been previously shown that the PARP inhibitor ABT888 suppresses the loss of metabolic activity induced by the depletion of NAD⁺ pool in HaCaT keratinocyte cells ⁴². We hypothesised that UVB irradiation of NHDF leads to an over-activation of PARP, leading to a depletion of NAD⁺/NADH pool. Indeed, PARP uses NAD⁺ to PARylate targeted proteins such as the ones involved in DNA damage repair ^{31-33,43}. We measured the concentration of NAD⁺ and NADH in NHDF UVB-irradiated or not, supplemented with ABT888 or not. Total NAD drastically decreases when cells are exposed to a lethal UVB dose (Figure 5A). Total NAD is mainly composed of NAD⁺ pool since the measured NADH concentration were around 200 times lower than NAD⁺ (Figure 5B, C). Interestingly, ABT888 was able to restore almost a third of the lost NAD pool (Figure 5A, C). This result suggests that a lethal UVB irradiation induces an overactivation of PARP, leading to a depletion of NAD⁺. This depletion in NAD⁺ is translated in a reduction of metabolic activity (Figure 5D). ABT888 partly restores the pool of total NAD and NAD⁺ after a genotoxic stress. This also implies that the loss of metabolic activity caused by UVB irradiation, as measured by the MTS assay, could be due to NAD⁺ depletion and not cell death (Figure 5D). However, the question remains as whether PARP activation and NAD reduction after UVB irradiation leads to cell death or not.

6- PARP does not induce parthanatos post-UVB

The loss of metabolic activity generally correlates with cell death³⁸. PARP inhibitors help maintaining cellular metabolic activity post UVB-exposure (Figure 2D, E). Since this mechanism is independent of caspases (Figure 2F), UVB could induced a PARP-dependant cell death called parthanatos. Parthanatos is a cell death triggered by PARP, independent of caspases activations and dependant of AIF translocation from mitochondria to the nucleus after overactivation of PARP1 (review in^{44,45}). AIF was shown to be release after parylation in the mitochondria and translocate to the cytoplasm and/or the nucleus⁴⁶. We first investigated the translocation of AIF in NHDF after a lethal UVB dose. We observed a molecular weight shift after UVB in each fraction but could not find a translocation of AIF from the mitochondria to the cytoplasm or the nucleus (Figure 6A, B, C). This molecular weight shift could be the results of a posttranslational modification post UVB but this would need further investigation, which we feel is not the purpose of this study. Since no AIF translocation was detected, we verified the role of PARP in UVB-induced cell death with a direct measure of cell death using CellTOX kit (CellTox™ Green Cytotoxicity Assay; Promega)⁴⁷. The inhibition of caspases using Q-VD-OPh drastically prevent UVB-induced cell death, which confirms the involvement of apoptosis in response to lethal UVB irradiation in NHDF. However, ABT888, the PARP inhibitor, was not able to prevent UVB-induced cell death (Figure 6D). This indicates that the PARP-dependent caspase-independent loss of metabolic activity is not related to cell death.

Our results clearly show than the only known cell death mechanism induced by lethal UVB irradiation in NHDF is apoptosis and that no compensation mechanisms backup apoptosis if this one is deficient. We found no evidence of ferroptosis, necroptosis or parthanatos in UVB-induced cell death in NHDF. We also showed that 3 to 6h following lethal UVB irradiation, there is a loss of metabolic activity triggered by an overused of NAD⁺ due to PARP activation.

1.6 Discussion

Metabolic activity does not always correlate with cell death

In this study, we described 2 independent cellular metabolic activity loss in response to UVB irradiation in NHDF. The later loss of metabolic activity (24h post-UVB) corresponds to UVB-induced caspase-dependent apoptosis (Figure 2 and 6). The earlier loss of metabolic activity (3-6h post-UVB) is dependent of PARP activity (Figure 2). PARP-dependent cell death (parthanatos) was thus assessed using PARP inhibitor ABT888 and this could neither prevent, nor delay UVB-induced cell death (Figure 6). AIF, an important factor in parthanatos, was observed mainly in mitochondria, but also in cytoplasm (Figure 6). A shift in AIF size was observed in UVB irradiated cells, suggesting that AIF have a function in response to UVB exposition but not related to parthanatos. Altogether, our results show that, even if PARP does not contribute to UVB-induced cell death, the MTS assay and NAD/NADH measure show that PARP plays an important role in metabolic activity change caused by UVB irradiation. In summary, we have clearly shown that metabolic activity does not always reflect cell death. Thus, metabolic activity using substrate reduction in formazan, such as MTT or MTS assays, should be taken with caution, especially when using PARP inhibitors.

Apoptosis is the sole UVB-induced cell death mechanisms in NHDF

Our results showing the absence of necroptosis, ferroptosis or parthanatos strongly suggest that apoptosis is the sole UVB-induced cell death mechanism involved in NHDF (Figure 2). Moreover, no cell death-related compensation mechanism could be found when apoptosis was inhibited (Figure 3). Other cell death pathways exist but we excluded the study of regulated cell death (RCD) connected to immunogenicity since this component is absent in our model (ex. NETotic cell death, pyroptosis and Immunogenic cell death). Antioxidants had no effect on UVB-induced metabolic activity change (Figure 4). Thus, RCD triggered by ROS formation such as ferroptosis, Lysosome-dependent cell death and MPT-driven necrosis can be excluded (cell death pathways review in ²¹).

Previous work from our laboratory, and others, have shown that chronic UVB irradiation leads to improvement of DNA repair response in skin but results in the accumulation of unreparable residual DNA damage^{30,48,49}. We have shown that chronic low UVB dose (CLUV) treatment of NHDF induce RIPK3 transcription level, a key factor in necroptosis³⁰. However, using a necroptosis inhibitor, we could not find any implication of necroptosis in UVB-induced cell death. RIPK3 could also play a role in another aspect of stress-response, such as survival signal, cytokine expression⁵⁰, matrix production⁵¹ or cell cycle and cell division⁵², this should be further investigated. Chronic exposure better reflects the exposure to which we are exposed and it would be relevant to study the impact of chronic irradiation on cell death. Indeed, chronic irradiation could lead to an adaptive response or an increased sensitivity. Cells could be more sensible to apoptosis as they accumulate DNA damage or other cell death pathways could be activated in cells pre-treated with chronic irradiation.

UVB exposure leads to PARP-dependent changes in metabolic activity

Exposure of fibroblasts to UVB irradiation induces a drastic depletion of their NAD pool, which is reverted in part by the PARP inhibitor ABT888 (Figure 5). PARP has been shown to be hyperactivated post-UVB and use directly NAD⁺ to add poly ADP-ribosylation (PARylate) proteins³⁴. Notably, PARP1 have a key function in DNA damage repair^{31-33,39}, which could explain the observed metabolic changes following UVB. The question remains whether NAD pool depletion could accelerate cell death post-UVB. We have shown that the PARP inhibitor ABT888 is able to prevent one third of the NAD⁺ pool depletion, which explains the restoration of metabolic activity (Figure 5). However, the un-prevented depleted NAD⁺ could play a role in cell death. NAD⁺ depletion could accelerate or promote cell death, which would help explaining the early cell death induced by UVB radiation observed by FACS and CellTOX assay (Figure 1 and 6). Recently, a publication highlighted mitochondrial changes mediated by UV in HaCaT cells, as well as the implication of PARP in those changes⁴², which supports our findings. Further works is necessary to decipher the precise role of mitochondria in response to genotoxic stress such as the one induced by UVB.

To conclude, we have shown that elimination of damaged cells following lethal dose of UVB relies only on apoptosis. UVB-induced cell death is an important anti-tumoral mechanism

and our results imply that a deficiency in apoptosis would have important consequence on skin cancer incidence. However, this have to be taken with caution mainly because the study has been conducted on fibroblasts and skin cancer occurs on keratinocytes and melanocytes. Further research would have to be performed to determine whether the apoptosis is also the sole UVB-induced cell death mechanism in keratinocyte. Moreover, PARP dependent metabolic response changes induce by UVB exposure need to be further investigated. Indeed, it appears to play an important role in response to genotoxic stress and might be implicated in UVB-induced carcinogenesis. Altogether, these data provide new insight on genotoxic response to lethal doses of UVB. This study shed some light on the interconnexion between DNA damage, metabolic response and cell death after UVB irradiation.

1.7 Informations additionnelles

FUNDING INFO

This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to P.J.R. P.J.R is a research scholar from the Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQ-S).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, A-S.G. and P.J.R.; Methodology, A-S.G. and P.J.R.; Investigation, A-S.G.; Formal Analysis, A-S.G.; Writing – Original Draft, A-S.G.; Writing – Review & Editing, A-S.G. and P.J.R.; Funding Acquisition, P.J.R.; Supervision, P.J.R

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing interests.

DATA AVAILABILITY

No datasets were generated or analysed during the current study.

1.8 Bibliographie

1. Rastogi, R. P., Richa, Kumar, A., Tyagi, M. B. & Sinha, R. P. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids* 2010, 592980 (2010).
2. Kerr, J. B. & Fioletov, V. E. Surface ultraviolet radiation. *Atmos. - Ocean* 46, 159–184 (2008).
3. Iwasaki, K., Izawa, M. & Mihara, M. UV-induced apoptosis in rat skin. *J. Dermatol. Sci.* 12, 31–35 (1996).
4. Courdavault, S. et al. Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations. *DNA Repair (Amst)*. 4, 836–844 (2005).
5. Wickert, H. et al. Differential induction of proto-oncogene expression and cell death in ocular tissues following ultraviolet irradiation of the rat eye. *Br. J. Ophthalmol.* 83, 225–230 (1999).
6. Mallet, J. D. & Rochette, P. J. Wavelength-dependent ultraviolet induction of cyclobutane pyrimidine dimers in the human cornea. *Photochem. Photobiol. Sci.* 12, 1310–1318 (2013).
7. Timares, L., Katiyar, S. K. & Elmetts, C. A. DNA damage, apoptosis and langerhans cells--Activators of UV-induced immune tolerance. *Photochem. Photobiol.* 84, 422–436 (2008).
8. Tewari, A., Sarkany, R. P. & Young, A. R. UVA1 induces cyclobutane pyrimidine dimers but not 6-4 photoproducts in human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 132, 394–400 (2012).
9. Mitchell, D. L., Jen, J. & Cleaver, J. E. RELATIVE INDUCTION OF CYCLOBUTANE DIMERS and CYTOSINE PHOTOHYDRATES IN DNA IRRADIATED in vitro and in vivo WITH ULTRAVIOLET-C and ULTRAVIOLET-B LIGHT. *Photochem. Photobiol.* 54, 741–746 (1991).
10. Cadet, J. & Douki, T. Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development. *Photochem. Photobiol. Sci.* 17, 1816–1841 (2018).
11. Zhang, X., Rosenstein, B. S., Wang, Y., Lebwohl, M. & Wei, H. Identification of possible reactive oxygen species involved in ultraviolet radiation-induced oxidative DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 980–985 (1997).
12. Cadet, J., Douki, T. & Ravanat, J. L. Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation. *Photochem. Photobiol.* 91, 140–155 (2015).
13. Nishigori, C. Current concept of photocarcinogenesis. *Photochem. Photobiol. Sci.* 14, 1713–1721 (2015).
14. Mullenders, L. H. F. Solar UV damage to cellular DNA: From mechanisms to biological effects. *Photochem. Photobiol. Sci.* 17, 1842–1852 (2018).
15. Marteijn, J. a, Lans, H., Vermeulen, W. & Hoeijmakers, J. H. J. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 465–81 (2014).
16. Gudipaty, S. A., Conner, C. M., Rosenblatt, J. & Montell, D. J. Unconventional Ways to Live and Die: Cell Death and Survival in Development, Homeostasis, and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 34, 311–332 (2018).
17. Fuchs, Y. & Steller, H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 329–344 (2015).

18. Vanden Berghe, T. et al. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 135–47 (2014).
19. Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T. & Kroemer, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 700–14 (2010).
20. Petrie, E. J. et al. Conformational switching of the pseudokinase domain promotes human MLKL tetramerization and cell death by necroptosis. *Nat. Commun.* 9, (2018).
21. Galluzzi, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 25, 486–541 (2018).
22. Lei, P., Bai, T. & Sun, Y. Mechanisms of ferroptosis and relations with regulated cell death: A review. *Front. Physiol.* 10, 1–13 (2019).
23. Siegmund, D., Lang, I. & Wajant, H. Cell death-independent activities of the death receptors CD95, TRAILR1, and TRAILR2. *FEBS J.* 284, 1131–1159 (2017).
24. Tait, S. W. G., Ichim, G. & Green, D. R. Die another way - non-apoptotic mechanisms of cell death. *J. Cell Sci.* 127, 2135–2144 (2014).
25. Kulms, D. & Schwarz, T. Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 64, 837–841 (2002).
26. Norbury, C. J. & Zhivotovsky, B. DNA damage-induced apoptosis. 2797–2808 (2004). doi:10.1038/sj.onc.1207532
27. Azzouz, D., Khan, M. A., Swezey, N. & Palaniyar, N. Two-in-one: UV radiation simultaneously induces apoptosis and NETosis. *Cell Death Discov.* 4, (2018).
28. Cencer, C. S. et al. PARP-1/PAR Activity in Cultured Human Lens Epithelial Cells Exposed to Two Levels of UVB Light. *Photochem. Photobiol.* 94, 126–138 (2018).
29. Murahashi, H., Azuma, H., Zamzami, N., Furuya, K. & Ikebuchi, K. Possible contribution of apoptosis-inducing factor (AIF) and reactive oxygen species (ROS) to UVB-induced caspase- independent cell death in the T cell line Jurkat Abstract : We analyzed the mechanism of UVB- induced cell death using the Jurkat T cell. 73, 399–406 (2003).
30. Drigeard Desgarnier, M.-C., Fournier, F., Droit, A. & Rochette, P. J. Influence of a pre-stimulation with chronic low-dose UVB on stress response mechanisms in human skin fibroblasts. *PLoS One* 12, e0173740 (2017).
31. Purohit, N. K., Robu, M., Shah, R. G., Geacintov, N. E. & Shah, G. M. Characterization of the interactions of PARP-1 with UV-damaged DNA in vivo and in vitro. *Sci. Rep.* 6, 19020 (2016).
32. King, B. S., Cooper, K. L., Liu, K. J. & Hudson, L. G. Poly(ADP-ribose) contributes to an association between Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and xeroderma pigmentosum complementation group A in nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* 287, 39824–39833 (2012).
33. Pines, A. et al. PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1. *J. Cell Biol.* 199, 235–249 (2012).
34. Vodenicharov, M. D. Mechanism of early biphasic activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in response to ultraviolet B radiation. *J. Cell Sci.* 118, 589–599 (2005).
35. Van Laethem, A., Garmyn, M. & Agostinis, P. Starting and propagating apoptotic signals in UVB irradiated keratinocytes. *Photochem. Photobiol. Sci.* 8, 299–308 (2009).
36. Knezevic, D., Zhang, W., Rochette, P. J. & Brash, D. E. Bcl-2 is the target of a UV-inducible apoptosis switch and a node for UV signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11286–91 (2007).

37. Rochette, P. & Brash, D. Progressive apoptosis resistance prior to senescence and control by the anti-apoptotic protein BCL-xL. *Mech. Ageing Dev.* 128, 207–214 (2008).
38. Riss, T. L. et al. Cell Viability Assays. in Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. *Assay Guidance Manual*. (ed. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>) 1–25 (2004).
39. Ray Chaudhuri, A. & Nussenzweig, A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 610–621 (2017).
40. Vanden Berghe, T., Kaiser, W. J., Bertrand, M. J. M. & Vandenabeele, P. Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling. *Mol. Cell. Oncol.* 2, 1–13 (2015).
41. Moriwaki, K. & Chan, F. K. M. RIP3: A molecular switch for necrosis and inflammation. *Genes Dev.* 27, 1640–1649 (2013).
42. Hegedus, C. et al. PARP1 Inhibition Augments UVB-Mediated Mitochondrial Changes-Implications for UV-Induced DNA Repair and Photocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 12, (2019).
43. Young Kim, M., Zhang, T. & Lee Kraus, W. Poly(ADP-ribosylation) by PARP-1: ‘PAR-laying’ NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev.* 19, 1951–1967 (2005). doi:10.1101/gad.1331805.it
44. Wang, Y., Dawson, V. L. & Dawson, T. M. Poly(ADP-ribose) Signals to Mitochondrial AIF: A Key Event in Parthanatos. *Exp Neurol* 218, 193–202 (2009).
45. David, K. K., Andrabi, S. A., Dawson, T. M. & Dawson, V. L. Parthanatos, A messenger of death. *Front. Biosci.* 14, 1116–1128 (2009).
46. Yingfei, W. et al. Poly (ADP-ribose) (PAR) Binding to Apoptosis-Inducing Factor Is Critical For PAR Polymerase-1-Dependent Cell Death (Parthanatos). *Sci. Signal.* 4, ra20 (2011).
47. Riss, T., Niles, A., Moravec, R., Karassina, N. & Vidugiriene, J. Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells. in Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. *Assay Guidance Manual [Internet]*. 1–15 (Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. , 2019).
48. Desgarnier, M. D. & Rochette, P. J. Enhancement of UVB-induced DNA damage repair after a chronic low-dose UVB pre-stimulation. *DNA Repair (Amst)*. 63, 56–62 (2018).
49. Mitchell, D. L., Byrom, M., Chiarello, S. & Lowery, M. G. Effects of chronic exposure to ultraviolet B radiation on DNA repair in the dermis and epidermis of the hairless mouse. *J. Invest. Dermatol.* 116, 209–215 (2001).
50. Moriwaki, K. et al. The Necroptosis Adaptor RIPK3 Promotes Injury-Induced Cytokine Expression and Tissue Repair. *Immunity* 41, 567–578 (2014).
51. Imamura, M. et al. RIPK3 promotes kidney fibrosis via AKT-dependent ATP citrate lyase. *JCI insight* 3, 1–14 (2018).
52. Al-Moujahed, A. et al. Receptor interacting protein kinase 3 (RIP3) regulates iPSCs generation through modulating cell cycle progression genes. *Stem Cell Res.* 35, 101387 (2019).

1.9 Figures

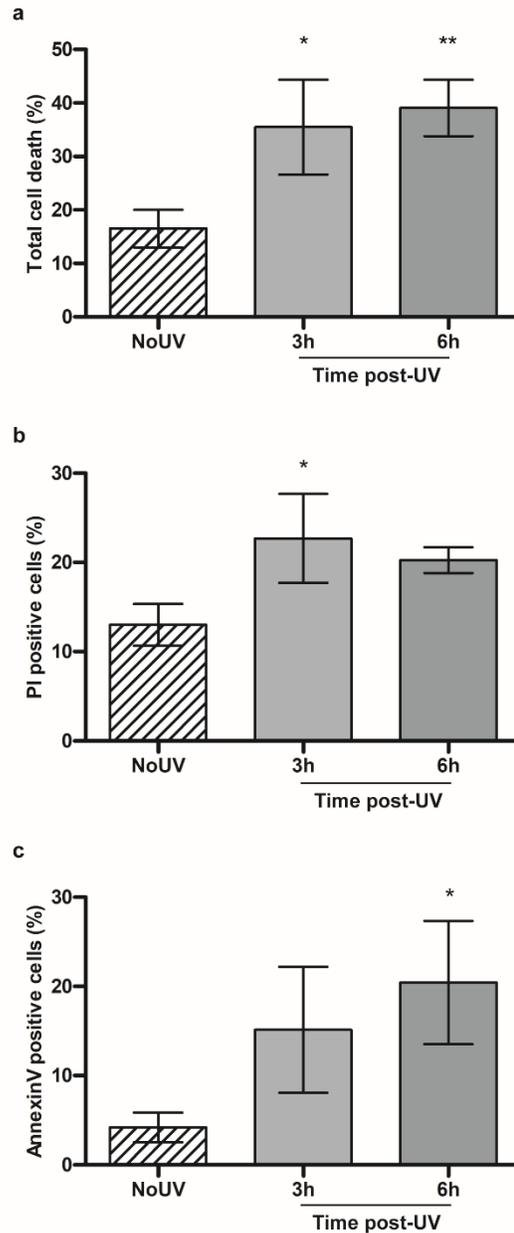


Figure 1 UVB-induced early cell death in primary human fibroblasts.

Using Annexin V-FITC and PI labelling, we assessed cell death in fibroblasts at 3h and 6h following an irradiation with 20 kJ/m² UVB. The fluorescence signal in each cell was assessed by FACS. (a) Total cell death is the addition of Annexin V + / PI - cells, Annexin V + / PI + cells and Annexin V - / PI + cells. (b) PI positive cells is composed of PI + / Annexin V + or - cells. (c) Annexin V positive cells are Annexin V+ and PI -. NoUV are unirradiated control cells. UVB irradiation of fibroblasts leads to cell death as early as 3h. Percentage is representative of a population of at least 8000 cells. N=3, * p-value < 0.05.

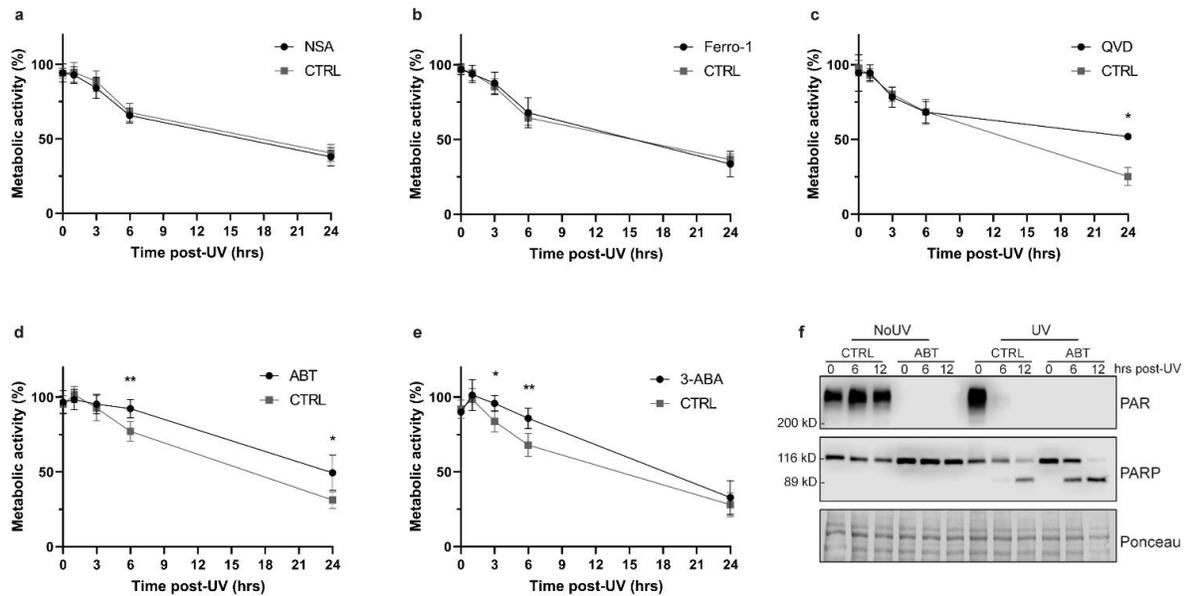


Figure 2 Cellular metabolic activity of UVB-irradiated primary human fibroblasts treated with different cell death inhibitors.

*Prior to UVB irradiation, fibroblasts were incubated 30 min with different cell death inhibitors. Cells were then irradiated in PBS using a lethal UVB dose (30 kJ/m²). The different cell death inhibitors used were: (a) The necroptosis inhibitor Necrosulfonamide (NSA, 2 μ M), (b) the ferroptosis inhibitor Ferrostatin-1 (Ferro-1, 5 μ M), (c) the broad caspase inhibitor Q-VD-OPh (QVD, 20 μ M), (d) the PARP inhibitor ABT888 (ABT, 20 μ M) or (e) the PARP inhibitor 3-Aminobenzamide (3-ABA, 0,5 mM). Cellular metabolic activity was assessed at different time points post-UVB irradiation (0, 1, 3, 6, 24h) using MTS assay. Irradiated cells were normalised on unirradiated cells of the same condition. NSA and Ferro-1 had virtually no effect on cellular metabolism. However, QVD significantly prevent UVB-induced cellular metabolic activity loss at 24h, ABT at 6 and 24h and 3-ABA at 3 and 6h. N=4. * p-value < 0.05, ** p-value < 0.01, *** p-value < 0.001. (f) Efficiency of ABT888 was confirmed by Western Blot, showing an inhibition of PAR formation without abolition of apoptotic PARP cleavage.*

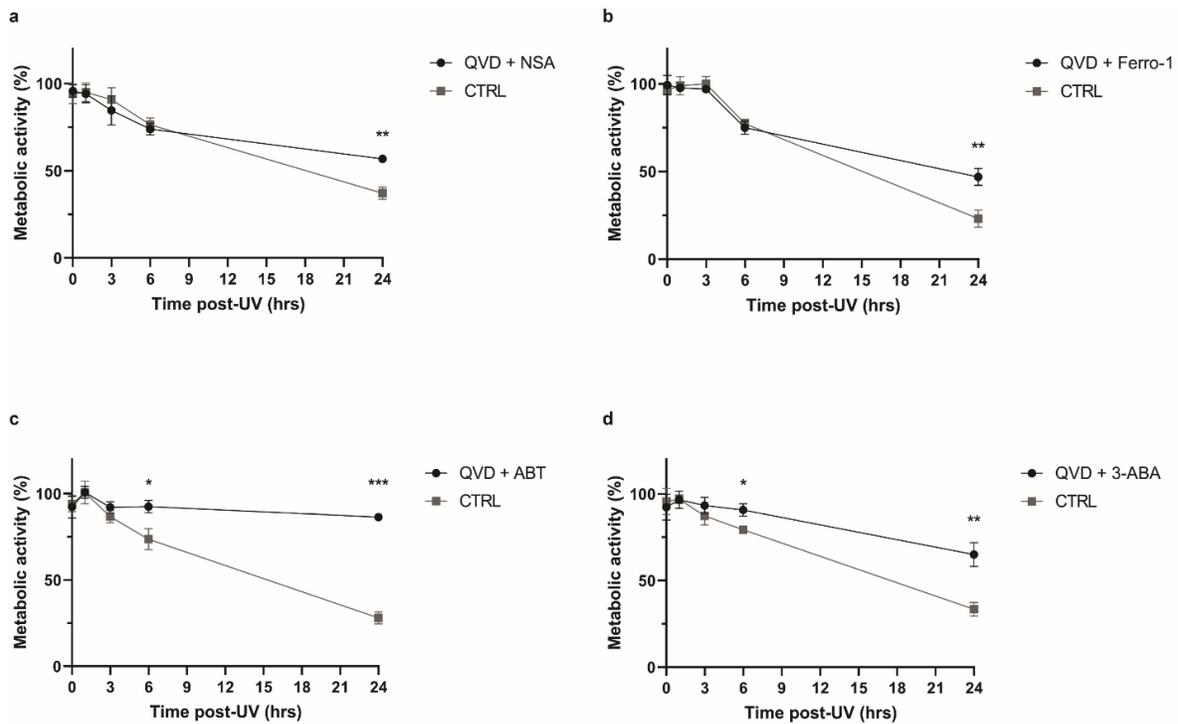


Figure 3 UVB induces two independent reduction of cellular metabolic activity in primary human fibroblasts.

Prior to UVB irradiation, fibroblasts were incubated 30 min with different combinations of cell death inhibitors. Cells were then irradiated in PBS using a lethal UVB dose (30 kJ/m^2). The combinations used were: (a) Necroptosis inhibitor Necrosulfonamide (NSA, $2 \text{ }\mu\text{M}$) and caspase inhibitor Q-VD-Oph (QVD, $20 \text{ }\mu\text{M}$), (b) ferroptosis inhibitor Ferrostatin-1 (Ferro-1, $5 \text{ }\mu\text{M}$) and caspase inhibitor Q-VD-Oph (QVD, $20 \text{ }\mu\text{M}$), (c) PARP inhibitor ABT888 (ABT, $20 \text{ }\mu\text{M}$) and caspase inhibitor Q-VD-Oph (QVD, $20 \text{ }\mu\text{M}$), (d) PARP inhibitor 3-Aminobenzamide (3-ABA, $0,5 \text{ mM}$) and caspase inhibitor Q-VD-Oph (QVD, $20 \text{ }\mu\text{M}$). Cellular metabolic activity was assessed at different time points post UVB irradiation (0, 1, 3, 6, 24h) using MTS assay. Irradiated cells were normalised on unirradiated cells of the same condition. NSA and Ferro-1 had no effect on cellular metabolic activity loss prevention caused by QVD. However, an additive effect of QVD and PARP inhibitors (ABT and 3-ABA) on prevention of cellular metabolic activity loss caused by UVB could be described. $N=4$. * p -value < 0.05 , ** p -value < 0.01 , *** p -value < 0.001 .

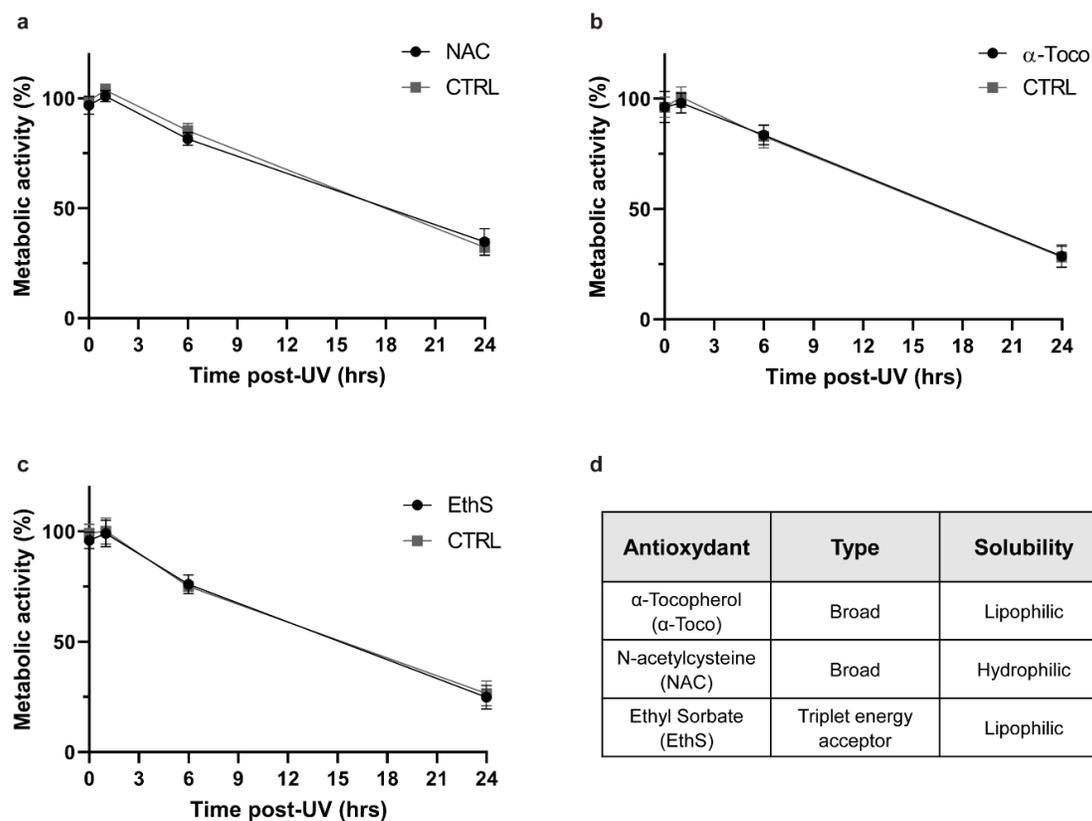


Figure 4 UVB-induced cell death is independent of oxidation in primary human fibroblasts.

Prior to UVB irradiation, fibroblasts were incubated 30 min with different antioxidants. Cells were then irradiated in PBS using a lethal UVB dose (30 kJ/m^2). The different antioxidant used were: (a) Broad-spectrum oxidation inhibitor N-acetylcysteine (NAC, 2.5 mM), (b) broad-spectrum oxidation inhibitor α -Tocopherol (α -Toco, $10 \text{ }\mu\text{M}$), (c) triplet energy acceptor Ethyl Sorbate (EthS, $5 \text{ }\mu\text{g/ul}$). Cellular metabolic activity was assessed at different time points post UVB exposition (0, 1, 6, 24h) using a MTS assay. Irradiated cells were normalised on unirradiated cells of the same condition. None of the antioxidant tested had an effect on UVB-induced cellular metabolic activity loss. $N=4$. (d) Table of antioxidants used, their type and solubility.

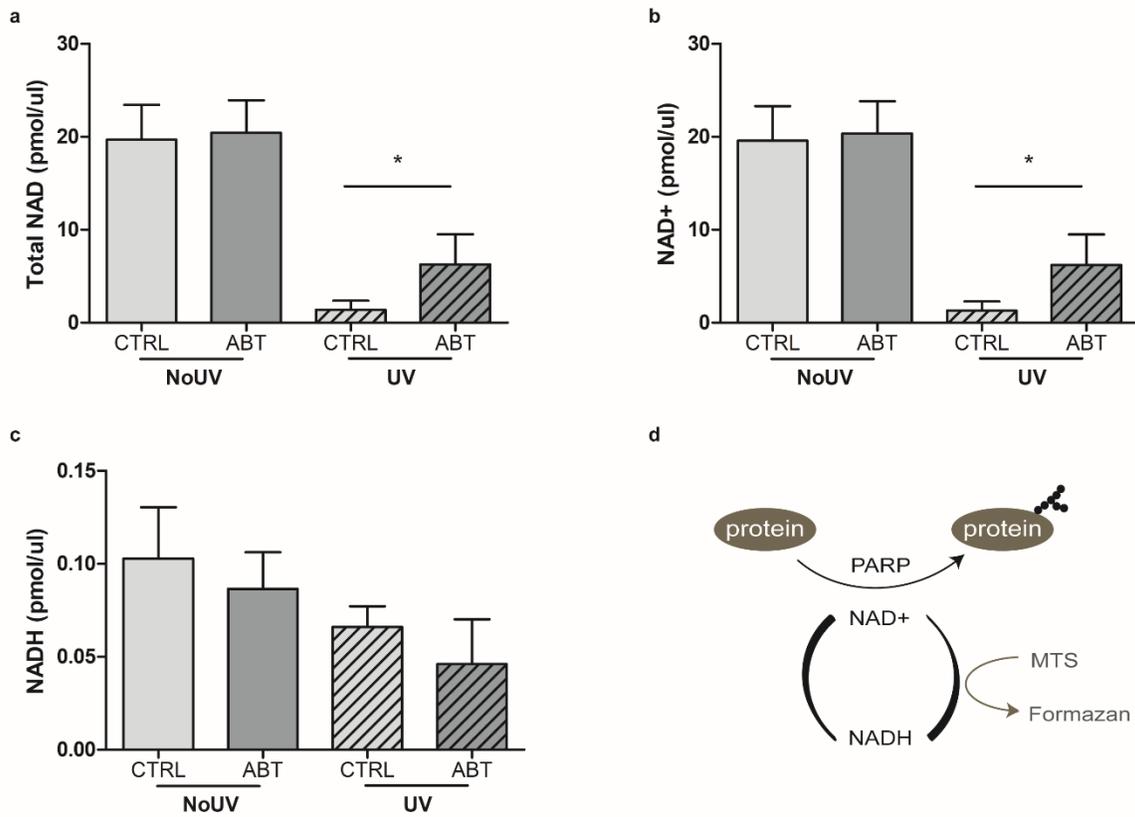


Figure 5 The UVB-induced total NAD and NAD⁺ pool decrease can partially be restored using PARP inhibitor.

Prior to UVB irradiation, fibroblasts were incubated 30 min with or without ABT888 (ABT, 20 μ M). Cells were then UVB irradiated with 20 kJ/m² (UV) or not (NoUV) in PBS. 6h post exposition, cells were harvested to quantify NAD/NADH. Same amount of proteins was taken to compare the different conditions, i.e. NoUV CTRL, NoUV ABT, UV CTRL and UV ABT. (a) Concentration of Total NAD and (b) concentration of NADH were measured. Concentration of NAD⁺ was deduced by subtracting NADH to Total NAD in (c). We found that UVB irradiation significantly reduces total NAD and NAD⁺, but the use of PARP inhibitor ABT significantly prevent this loss. N=4, * p-value < 0.05. (d) Schematic representation of the link between NAD⁺ consumption, PARP1 and the MTS assay.

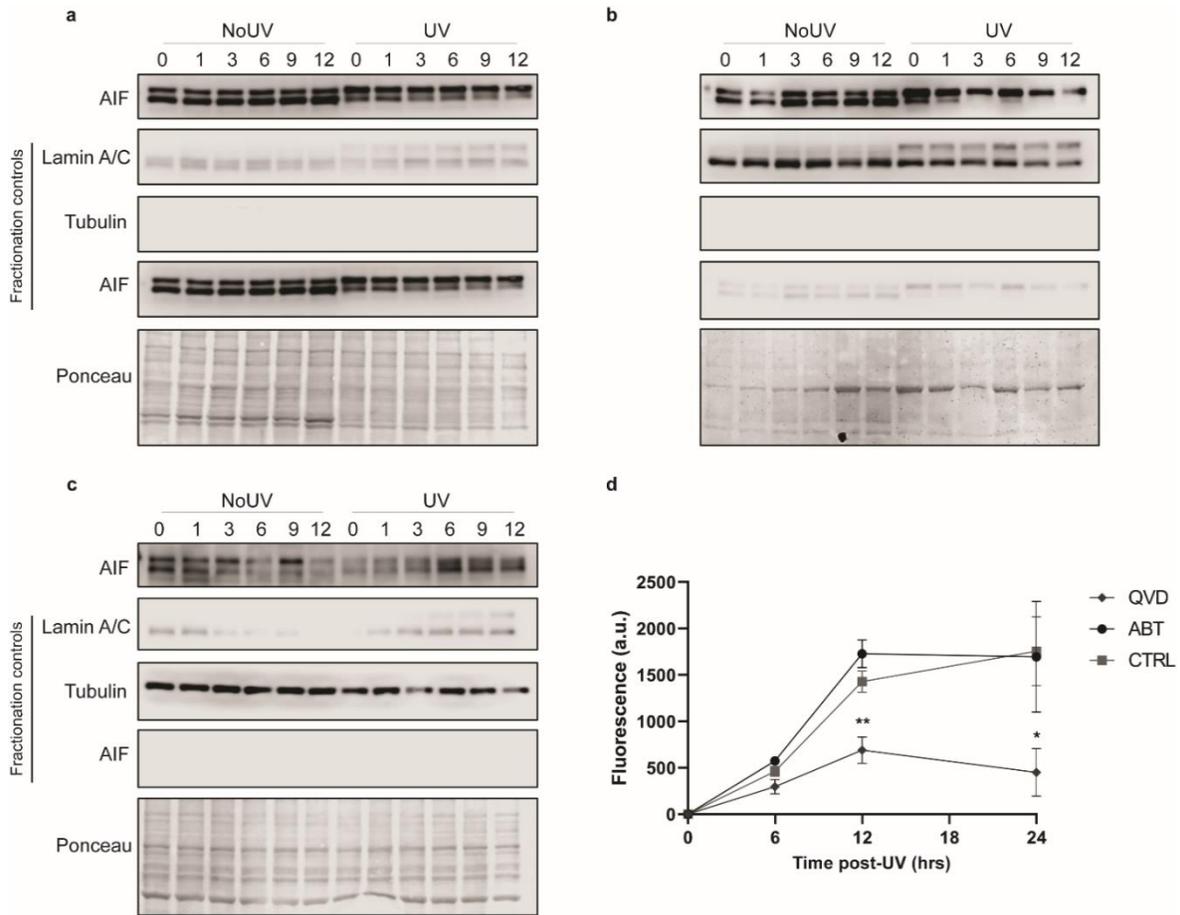


Figure 6 Parthanatos is not induced by UVB in primary human fibroblasts.

Fibroblasts were UVB irradiated with 20 kJ/m^2 (UV) or not (NoUV). At different time points after exposition, cells were harvested (0, 1, 3, 6, 9, 12h) and proteins from mitochondria, nucleus and cytoplasm were separated. Western Blot against AIF using protein fractions of (a) mitochondria, (b) nucleus and (c) cytoplasm showed no translocation of the protein from mitochondria to nucleus. Controls of fractionation were measured by simultaneously scanning the membranes from the 3 fractions. Nuclear, cytosolic and mitochondrial controls are Lamin A/C, Tubulin and AIF, respectively. Ponceau staining has been used as loading control. (d) Prior to UVB irradiation at 30 kJ/m^2 , cells were incubated 30 min with ABT888 (ABT, $20 \mu\text{M}$), Q-VD-OPh (QVD, $20 \mu\text{M}$) or control media (CTRL). Immediately after UVB exposure cells were incubated with corresponding inhibitor and CellTOX dye. CellTOX fluorescence, proportional to cell death, was measure at different time points (0, 6, 12 and 24h). Fluorescence from unirradiated cells (background) was subtracted to irradiated cells for the same condition. The apoptosis inhibitor QVD significantly prevents UVB-induced cell death at 12 and 24h. However, the PARP inhibitor ABT had no effect on UVB-induced cell death. SEM, $N=4$, * p -value < 0.05 .

1.10 Figures supplémentaires

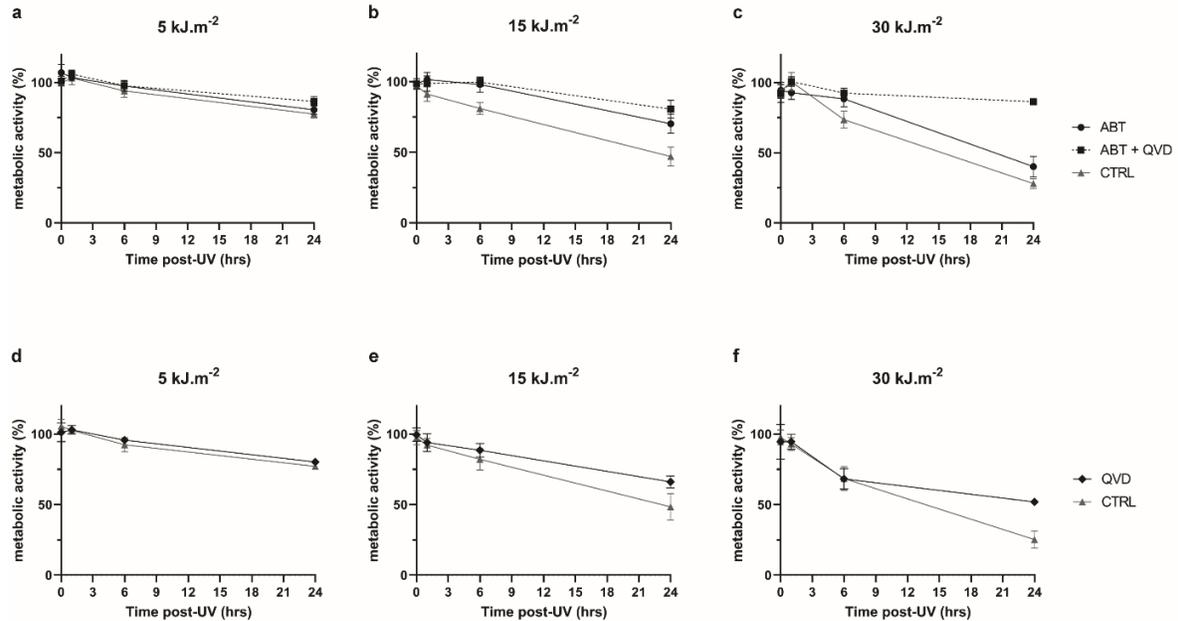
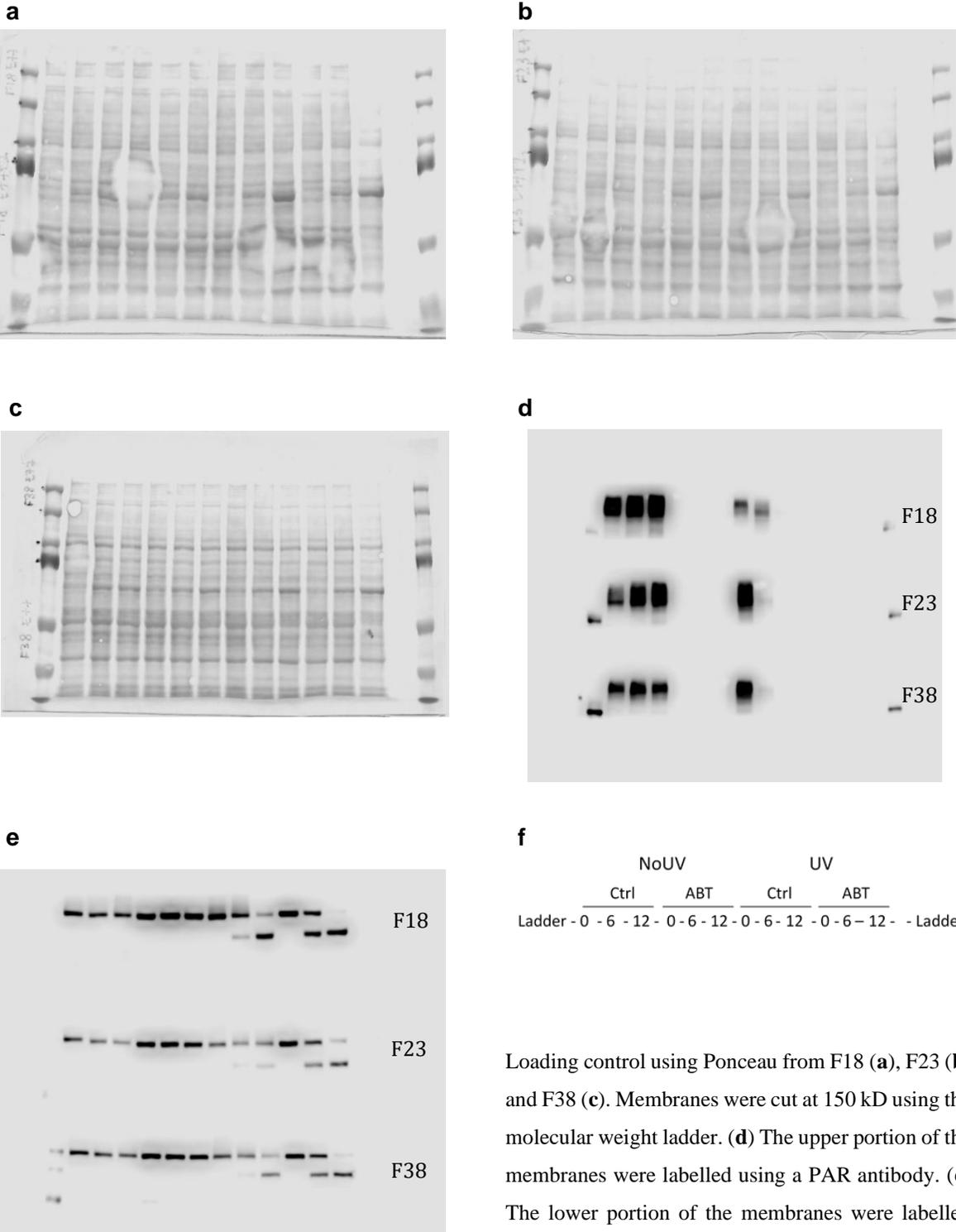


Figure S1: UVB-dose dependent changes in metabolic activity

Prior to UVB irradiation, NHDF were incubated 30 min with ABT888 (ABT, 20 μ M), Q-VD-OPh (QVD, 20 μ M) or the combination ABT888 and Q-VD-OPh (ABT + QVD). Cells were then irradiated in PBS using different lethal UVB doses: (a, d) 5 kJ/m², (b, e) 15 kJ/m² and (c, f) 30 kJ/m². Cellular metabolic activity was assessed at different time points post UVB irradiation (0, 1, 3, 6, 24h) using MTS assay. Irradiated cells were normalised on unirradiated cells of the same condition. 5 kJ/m² had little effect on cellular metabolism. At 15 and 30 kJ/m², QVD significantly prevent UVB-induced cellular metabolic activity loss at 24h, ABT at 6 and 24h and the combination at 6 and 24h with an additive effect of QVD and ABT. N=4.

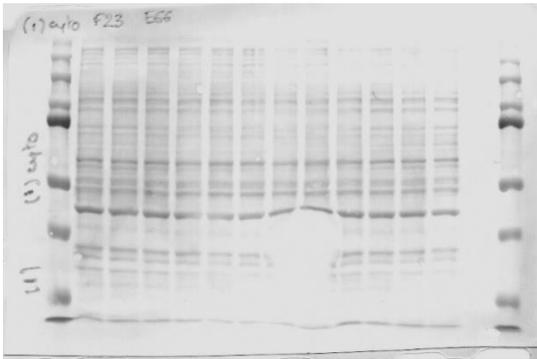
Western Blot Full-length gels used for Figure 2



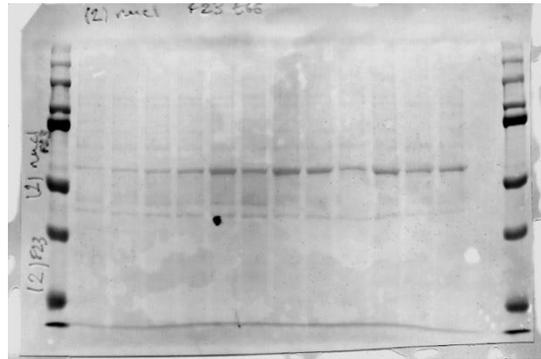
Loading control using Ponceau from F18 (a), F23 (b) and F38 (c). Membranes were cut at 150 kD using the molecular weight ladder. (d) The upper portion of the membranes were labelled using a PAR antibody. (e) The lower portion of the membranes were labelled using a PARP antibody. Samples order is show in (f). Data from F38 are presented in Figure 2.

Western Blot Full-length gels used for Figure 6

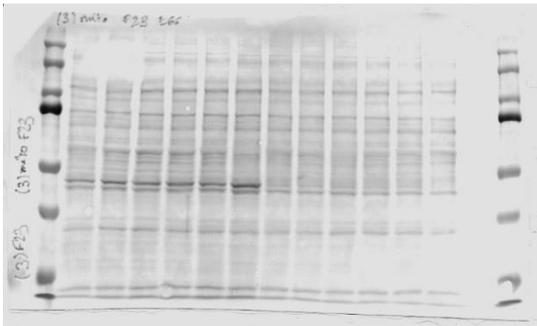
a



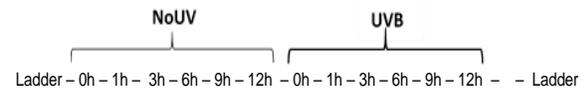
b



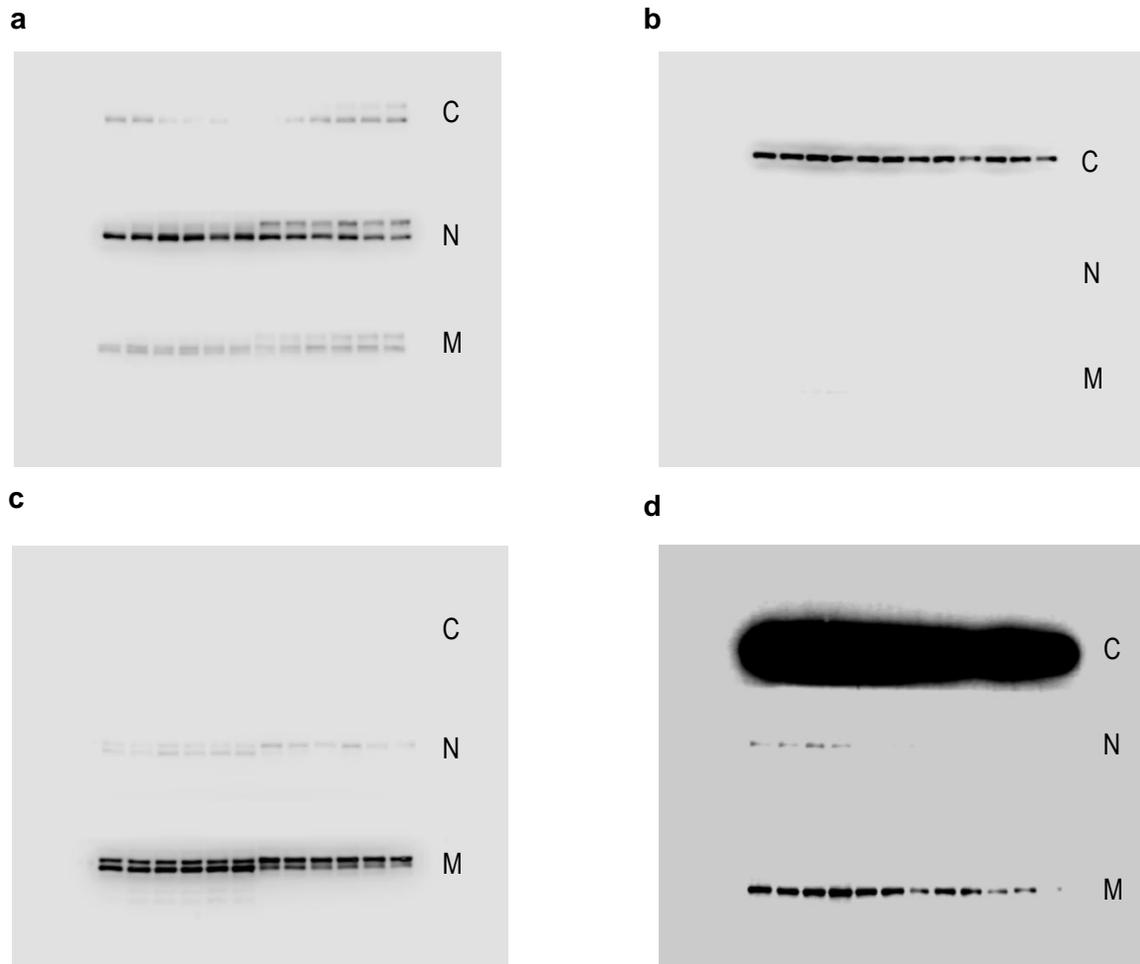
c



d



Ponceau staining has been used as loading control. **(a)** Ponceau from cytoplasmic fraction, **(b)** ponceau from nuclear fraction and **(c)** ponceau from mitochondria fraction. Samples order is show in **(d)**.

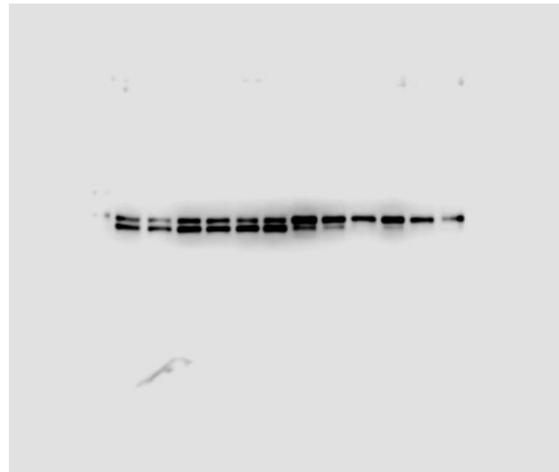


Membranes were cut between 37 and 75kD using molecular weight ladder. Controls of fractionation were measured by simultaneously scanning the membranes from the 3 fractions. Cytosolic (C), nuclear (N), and mitochondrial (M) membranes were placed from top to bottom in the scanner respectively. Controls are (a) Lamin A/C for nucleus, (b) Tubulin for cytoplasm and (c) AIF for mitochondria fraction. (d) Over-exposition of the Tubulin showing the membranes from nuclear and mitochondria fraction.

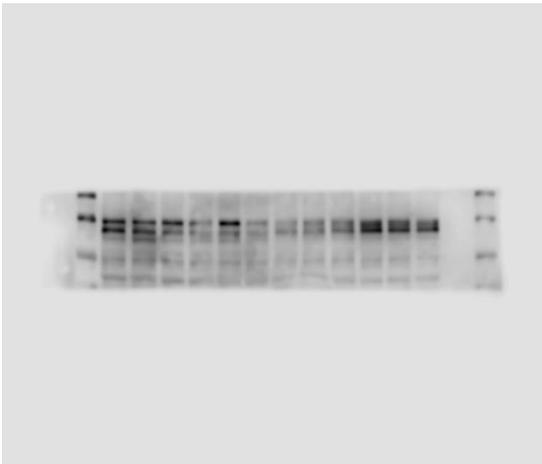
a



b



c



Mitochondrial control of fractionation was used to measure mitochondrial AIF (**a**). As nuclear and cytoplasmic AIF were weaker, nuclear and cytoplasmic fraction were scanned simultaneously showing nuclear AIF in (**b**). Membrane from cytoplasmic fraction was scanned alone to obtain AIF in this fraction (**c**).

Chapitre 2 : MLKL et RIPK3, de nouveaux acteurs dans la mort cellulaire induite par les rayons UVB dans les fibroblastes humains dermiques.

2.1 Introduction

Une irradiation létale d'UVB induit l'activation des voies de mort cellulaire dans les cellules de peau. Ce mécanisme permet de supprimer les cellules endommagées par les UVR. Dans le chapitre 1, nous avons démontré que l'apoptose est la voie de mort programmée privilégiée dans les fibroblastes humains normaux dermiques (NHDF) post-UVB. L'utilisation d'inhibiteurs de nécroptose et de ferroptose n'a pas mis en évidence la contribution de ces voies de mort cellulaire. La parthanatos a aussi été écartée, bien que l'exposition aux UVB induise une diminution de l'activité métabolique cellulaire liée à l'activation de PARP et à l'utilisation du pool de NAD⁺. De plus, aucun mécanisme de compensation n'a été observé lorsque la voie apoptotique est inhibée. Ainsi, l'apoptose est la seule voie de mort cellulaire, mesurable, induite par les rayons UVB dans les NHDF.

Néanmoins, une étude précédente menée au sein du laboratoire a mis en évidence une augmentation de la transcription de la protéine RIPK3 suite à des irradiations chroniques d'UVB (CLUV) [282]. RIPK3 est une protéine majeure de la voie nécroptotique. Son activation par phosphorylation entraîne la phosphorylation de MLKL qui, après oligomérisation, induit la formation de pores dans la membrane plasmique, entraînant la mort cellulaire. Les résultats obtenus dans le chapitre 1 démontrent une absence de nécroptose post-UVB, tandis que l'étude du Dr. Marie-Catherine Drigeard Desgarnier [282] révèle un rôle potentiel de RIPK3 dans la réponse cellulaire aux UVB. Ces résultats paradoxaux font de RIPK3 et de MLKL, son partenaire dans la nécroptose, des protéines d'intérêt dans l'étude des voies de mort induites par les rayons UVB.

Ainsi, dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au rôle de RIPK3 et de MLKL dans la mort induite par les rayons UVB dans les NHDF. Nous avons tout d'abord étudié la déplétion partielle de la protéine RIPK3 et de la protéine MLKL, par utilisation de siARN. Les résultats ont mis en évidence que RIPK3 et MLKL jouent des rôles opposés dans la mort cellulaire induite par les rayons UVB. Plus précisément, RIPK3 protège les NHDF de la mort induite

par les rayons UVB, tandis que MLKL sensibilise les cellules exposées aux UVB à l'apoptose. De ce fait, nous avons ré-évalué l'activation de la nécroptose par les UVB dans les NHDF. L'utilisation d'agents pharmacologiques et l'analyse des phosphorylations de RIPK3 et de MLKL confirment que les rayons UVB n'induisent pas de nécroptose dans les NHDF. Ainsi, RIPK3 et MLKL sont de nouveaux acteurs jouant sur la mort UV-induite, par un mécanisme indépendant de leur activité nécroptotique.

2.2 Matériel et méthodes

Culture cellulaire

Comme dans le chapitre 1, des fibroblastes humains normaux dermiques (NHDF) provenant de biopsies mammaires de 4 femmes ont été utilisés (F18, F21, F23, F38) et cultivés dans du DMEM supplémenté de 5% de FBS et de 1% de pénicilline/streptomycine, à 37°C, 5% CO₂.

Traitement par les siARN et irradiation UVB

Des siARN dirigés contre RIPK3 (siRIPK3) et MLKL (siMLKL) ont été sélectionnés en fonction de leur efficacité par Western Blot. Les siARN dirigés contre RIPK3 et MLKL sont les suivants : siRIPK3 #1 (Qiagen, cat no SI00092792, séquence cible ACCGCTCGTTAACATATACAA), siRIPK3 #3 (Qiagen, cat no SI00092806, séquence cible CAGCCTGATGTCGTGCGTCAA), siMLKL #3 (Qiagen, cat no SI03112249, séquence cible TAGGTTTCAAGAGGCCTTATA), siMLKL #7 (Qiagen, cat no SI04903857, séquence cible CTCGCTGTTACTTCAGGTTGA) et siMLKL #8 (Qiagen, cat no SI04961390, séquence cible ACTGAGACGATTAGAAATCAA). Le siARN contrôle est le siScramble (Qiagen, AllStars Negative Contrôle siRNA, cat no 1027281).

Protocole de transfection des siMLKL : les NHDF sontensemencés et transfectés simultanément au jour 1. Au jour 4, les cellules sont irradiées (UVB) ou non (NoUV), puis analysées à 0, 16 et 24h post-UVB pour l'essai CellTOX, à 24h post irradiation pour l'analyse par FACS, et à 0h ou 24h pour les Western Blot.

Protocole de transfection des siRIPK3 : les NHDF sontensemencés et transfectés simultanément au jour 1. Une seconde transfection est effectuée au jour 2. Au jour 6, les cellules sont irradiées (UVB) ou non (NoUV), puis analysées à 0, 16 et 24h post-UVB pour

l'essai CellTOX, à 24h post irradiation pour l'analyse par FACS, et à 0 ou 24h pour les Western Blot.

La transfection se fait par mélange des siARN dans du milieu opti-MEM (opti-MEM I reduced serum media, Thermofisher) avec un agent de transfection de type lipofectamine (Lipofectamin RNAiMAX, Thermofisher). Suivant le protocole du fabricant, le mélange est incubé 10 à 30 min à température ambiante, puis déposé dans le milieu contenant les cellules (milieu DMEM, 5% FBS, sans antibiotique). Après 6h d'incubation avec les siARN, le milieu est changé pour du milieu contenant des antibiotiques (pénicilline/streptomycine). Les siARN ont une concentration finale de 12 nM. Les cellules sontensemencées en 96 puits pour l'analyse de la mort cellulaire par CellTOX, ou en 12 puits pour les analyses par FACS et par Western Blot.

Les cellules transfectées par siARN sont irradiées aux UVB dans du PBS avec une dose létale de 10 000 J/m² afin d'observer la mort apoptotique à 16h et 24h post irradiation par CellTOX et 24h post-irradiation par FACS et Western Blot.

Traitement par les inhibiteurs de nécroptose et irradiation UVB

Les NHDF sontensemencés à faible confluence en plaque 96 puits au jour 1. Au jour 9, les cellules sont traitées avec les inhibiteurs de nécroptose ou avec du milieu contrôle. Comme pour le chapitre 1, après 30 min d'incubation, les cellules sont irradiées dans du PBS avec une dose létale de 30 000 J/m² afin de confirmer ou infirmer l'activation de la nécroptose par les UVB. Après l'irradiation, les cellules sont incubées de nouveau avec du milieu contenant les inhibiteurs, ou avec du milieu contrôle, puis l'activité métabolique (MTS) ou la mort cellulaire (CellTOX) sont analysés.

Deux inhibiteurs de nécroptose ont été employés. Necrosulfonamide (NSA; R&D System, UK) est utilisé à 2 µM et inhibe l'activation de la nécroptose par les protéines MLKL. Necrostatin-1s (Nec1s; Millipore) est utilisé à 100 µM et inhibe la formation du nécrosome par RIPK1. La combinaison de ces deux inhibiteurs a aussi été appliquée.

Mesure de l'activité métabolique (MTS)

Suivant le même protocole que dans le chapitre 1, un essai MTS a été utilisé afin de mesurer l'activité métabolique des cellules traitées avec les inhibiteurs de nécroptose ou avec du

milieu contrôle, entre 0 et 24h suivant l'irradiation UVB. Pour chaque point, les résultats des cellules irradiées (UVB) sont normalisés par rapport aux cellules non-irradiées (NoUV) pour une même condition.

Essai de mort cellulaire (CellTOX)

Suivant le même protocole que dans le chapitre 1, un essai de mort cellulaire CellTOX a été employé après irradiation UVB, soit à la suite du traitement par l'inhibiteur NSA, ou suite à l'utilisation de siARN. Les cellules traitées sont comparées aux cellules contrôles. La mort cellulaire est proportionnelle à la fluorescence mesurée dans l'essai. La fluorescence des cellules non-irradiées est retranchée à la fluorescence des cellules irradiées pour une même condition afin de supprimer le background. La fluorescence pour chaque condition est relative au 0h post-irradiation (résultats CellTOX dits non-normalisés).

Afin de diminuer la variabilité liée à l'hétérogénéité des résultats obtenus sur quatre cultures primaires de fibroblastes, les résultats sont aussi présentés normalisés. Pour chaque culture, la mort induite par les UVB dans les différentes conditions est normalisée par rapport au siScramble contrôle. La moyenne des quatre cultures pour chaque siARN (RIPK3 ou MLKL) est comparée à celle du siScramble placée à 1 (résultats CellTOX dits normalisés).

Essai de mort cellulaire par Cytométrie en flux (FACS)

Après irradiation des NHDF, les cellules ont été récoltées 24h post-irradiation pour analyser la mort cellulaire. Les cellules ont été marquées à l'iodure de propidium (PI) et à l'Annexine V-FITC (Annexine V) à l'aide du kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (cat no 556547, BD Biosciences). Comme pour le chapitre 1, les cellules irradiées (UVB) sont comparées aux cellules non-irradiées (NoUV). La mort cellulaire totale est mesurée par ajout du pourcentage des cellules PI+ / Annexine V-, PI- / Annexine V+ et des cellules doubles positives (PI+ / Annexine V+). Ces résultats sont dits non-normalisés.

La variabilité liée à l'hétérogénéité des résultats obtenus sur différentes cultures primaires de NHDF est diminuée de la façon suivante : pour chaque culture, le pourcentage de mort totale des cellules non-irradiées est retranché au pourcentage de mort des cellules irradiées d'une même condition (background). Les résultats sont ensuite normalisés, pour chaque culture, par rapport au siScramble contrôle. La moyenne des quatre cultures pour chaque siARN

(RIPK3 ou MLKL) est comparée à celle du siScramble placée à 1 (résultats de FACS dits normalisés).

Western Blot

Afin d'étudier la phosphorylation des protéines RIPK3 et MLKL, et une possible activation de la nécroptose par les UVB, les cellules NHDF sont ensemencées en plaques 6 puits au jour 1. Une fois à confluence, les cellules sont incubées 9 jours. Au jour 12 ou 13, les cellules sont exposées à une dose létale d'UVB de 20 000 J/m² (UVB) puis récoltées à différents temps post-UV (0; 0,5; 1; 6; 9; 12h). Un contrôle non-irradié est récolté au temps 0h (NoUV). Les protéines sont extraites dans du tampon RIPA (1% NP 40, 0,5% Sodium Deoxycholate, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH8) supplémenté avec les inhibiteurs de protéases (cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Germany) et les inhibiteurs de phosphatases (phosphatase inhibitor PhosSTOP™, Roche, Germany) et quantifiées par BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific, USA) puis déposées sur gel SDS-PAGE. Les protéines totales RIPK3, MLKL et leur phosphorylation sont mesurées en Western Blot. Les anticorps α -RIPK3 (6E6.2, #MABC28, Millipore, 1 :1000), α -RIPK3 phospho ser227 (#Ab209384, 0,731 mg/mL, Abcam, 1 :500), α -MLKL (3H1, #MABC604, Millipore, 1:1000) et α -MLKL phospho ser358 (#91689, Cell Signaling Technology, 1 :500) ont été employés.

Suite à la transfection des siARN dirigés contre MLKL ou RIPK3, les cellules sont irradiées à 10 000 J/m² d'UVB (UVB) ou non (NoUV) afin d'étudier l'activation de l'apoptose. Les cellules NHDF sont récoltées 24h post-UVB, les protéines sont ensuite extraites dans du tampon RIPA supplémenté avec les inhibiteurs de protéases et de phosphatases précédemment décrits, puis quantifiées par BCA et déposées sur gel SDS-PAGE. La protéine PARP et son clivage sont mesurés par Western Blot par l'anticorps α -PARP (F2, #sc-8007, 200 ug/mL, Santa Cruz Biotechnology, 1:500). α -RIPK3 (B2, Sc-374639, Santa Cruz Biotechnology, 1:1000) a été utilisé.

Les membranes sont scannées par le C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences, USA) et analysées avec Image Studio Lite software (LI-COR Biosciences, USA). Le ponceau est utilisé pour normaliser la quantité de protéine pour chaque Western Blot.

Analyses statistiques

Les résultats sont présentés avec la moyenne +/- SD et leur significativité est évaluée à l'aide du logiciel GraphPad Prism8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Le « N » indique le nombre de cultures primaires humaines utilisées pour chaque expérience. Une p-value < 0.05 est considérée comme significative.

FACS et CellTOX : Un two-way ANOVA suivi d'une comparaison multiple Tukey est utilisé lors de l'analyse des données à deux variables : traitement siARN et irradiation (FACS, résultats non-normalisés). Les résultats normalisés sur le siScramble sont analysés par un t-test non-pairé (FACS et CellTOX, résultats normalisés), les résultats non-normalisés du CellTOX sont analysés par t-test pairé. L'utilisation d'un t-test pour les données à une seule variable (traitement siARN) permet de comparer individuellement chaque siARN au siScramble contrôle.

Western Blot : Chaque temps post-UV est comparé au contrôle NoUV par un t-test non-pairé.

2.3 Résultats

1- La déplétion partielle de RIPK3 sensibilise les cellules à la mort induite par les UVB

Une irradiation létale d'UVB induit l'activation de l'apoptose dans les NHDF (Chapitre 1) [285]. Néanmoins, une augmentation de la transcription de RIPK3 a été précédemment observée dans les NHDF au sein du laboratoire, suite à des expositions chroniques d'UVB (CLUV) [282]. Nous avons donc évalué le rôle de RIPK3 dans la mort cellulaire induite par les rayons UVB. Pour ce faire, les NHDF ont été transfectés par des siARN dirigés contre RIPK3 afin de dépléter les cellules de la protéine et d'abaisser son niveau total. La transfection des siRIPK3 réduit l'expression de la protéine de 60 et 79% en moyenne pour le siRIPK3 #1 et #3, respectivement (Figure 1, A, B). Le rôle de RIPK3 dans la mort cellulaire a été évalué suite à une dose létale d'UVB ($10\ 000\ \text{J/m}^2$) par mesure de la mortalité via des tests de FACS et de CellTOX. On observe en FACS que les siARN n'induisent que peu de mort dans les cellules non-irradiées, avec une mortalité inférieure à 10% de la population cellulaire totale (Figure 1, C). Post-UVB, les cellules siRIPK3#3 ont une plus grande mortalité que les cellules siScramble, soit 42% et 30% de cellules mortes respectivement, avec une p-value proche de la significativité de 0,06 (Figure 1, C). Néanmoins, l'utilisation de cultures provenant de quatre individus entraîne une grande variabilité. De ce fait, pour chaque culture, le pourcentage de mort induit par les rayons UVB a été normalisé par rapport à celui du siScramble. Ainsi, après normalisation, les deux siRIPK3 employés (#1 et #3) entraînent une augmentation de la mort cellulaire d'un facteur de 1,5 et 1,7 respectivement, à 24h post-UVB comparé au siScramble. Cette différence est significative pour le siRIPK3#3 (Figure 1, D).

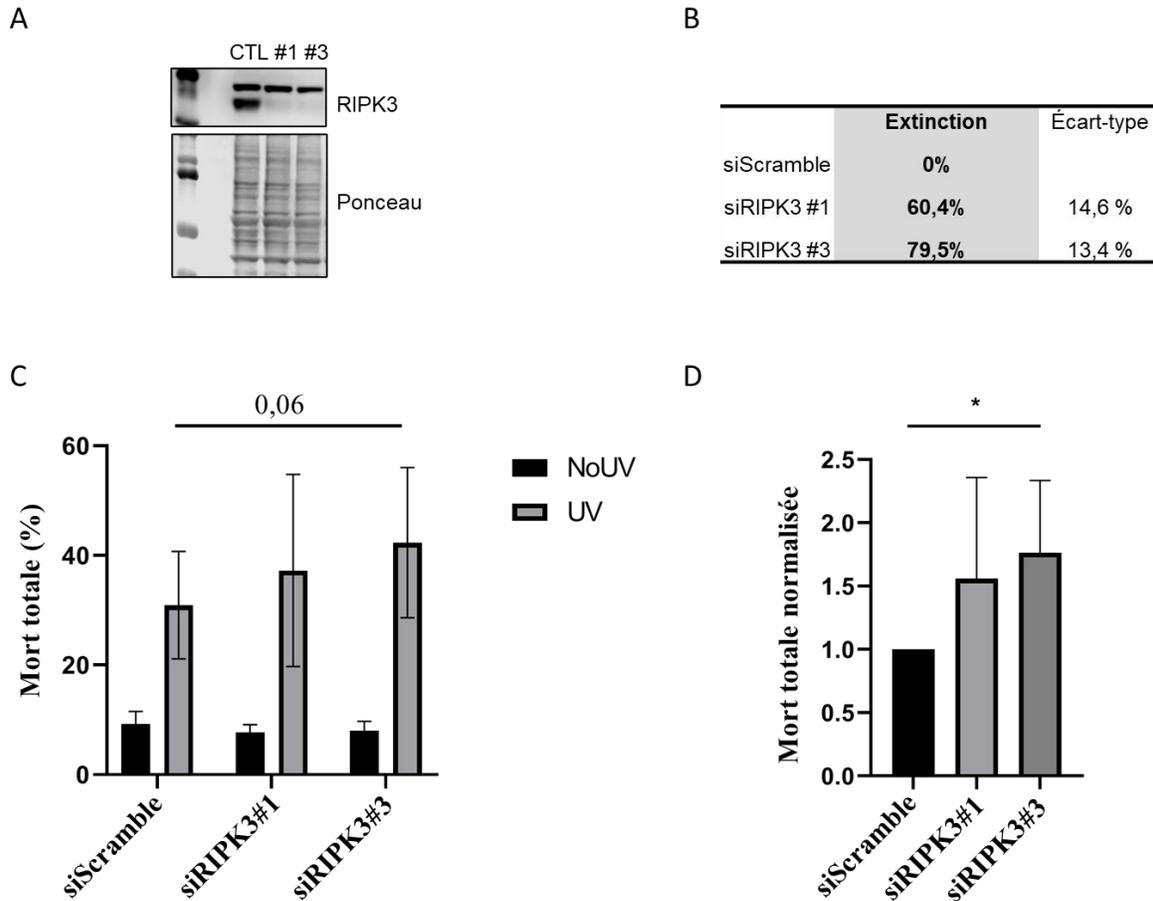


Figure 1 La diminution de l'expression de RIPK3 par siARN induit une augmentation de la mort cellulaire mesurée en FACS.

Les NHDF ont été transfectés par des siARN dirigés contre RIPK3 (siRIPK3#1 et siRIPK3#3) ou par un siARN contrôle (siScramble) au jour 1 (jour de l'ensemencement) et 2. Au jour 6, les cellules ont été exposées aux UVB (UV) ou non (NoUV). La mort cellulaire a été mesurée par FACS 24h post-irradiation. (A) L'expression de RIPK3 au jour 6 a été mesurée par Western Blot. Les siRIPK3 #1 et #3 (#1, #3) sont comparés au siScramble (CTL). Le pourcentage d'extinction de RIPK3 est présenté en (B), N=4. Les résultats de FACS non-normalisés sont présentés en (C), N=4, Two-way ANOVA. (D) Les résultats de FACS normalisés montrent une augmentation significative de la mort cellulaire dans les cellules transfectées par le siRIPK3#3 comparé au siScramble, N=4, *p <0,05, t-test. Le pourcentage de mort totale est faible pour les cellules non-irradiées (background). Les cellules transfectées par les siRIPK3 #1 et #3 montrent une sensibilité plus importante à la mort induite par UVB que les cellules transfectées par siScramble.

Ces résultats sont confirmés par le test de mortalité CellTOX, où une augmentation de la mort cellulaire UV-induite est visible dans les NHDF transfectés par siRIPK3 (#1 et #3) comparés aux cellules transfectées par siScramble. Les siRIPK3 #1 et #3 augmentent significativement la mort cellulaire, d'environ 1,1 et 1,5 fois respectivement, à 16 h post-UVB comparativement au siScramble, sans ou avec normalisation des résultats (Figure 2, A, C). La même tendance est observée à 24h post-irradiation, avec une augmentation d'environ 1,2 fois de la mortalité dans les siRIPK3 comparé au siScramble (Figure 2, B). Une grande variabilité liée à l'utilisation de NHDF provenant de quatre individus différents est visible (Figure 2, B). Après normalisation de la fluorescence pour chaque culture par rapport au siScramble, on observe une augmentation significative de la mort 24h post-UVB dans les cellules siRIPK3#1, d'un facteur de 1,27 comparativement au siScramble (Figure 2, D). Ces résultats et ceux du FACS mettent en évidence qu'une diminution de l'expression de RIPK3 dans les NHDF augmente la mort cellulaire induite par les UVB entre 16 et 24h post-irradiation. RIPK3 semble donc avoir un rôle protecteur dans la réponse des NHDF aux rayons UVB.

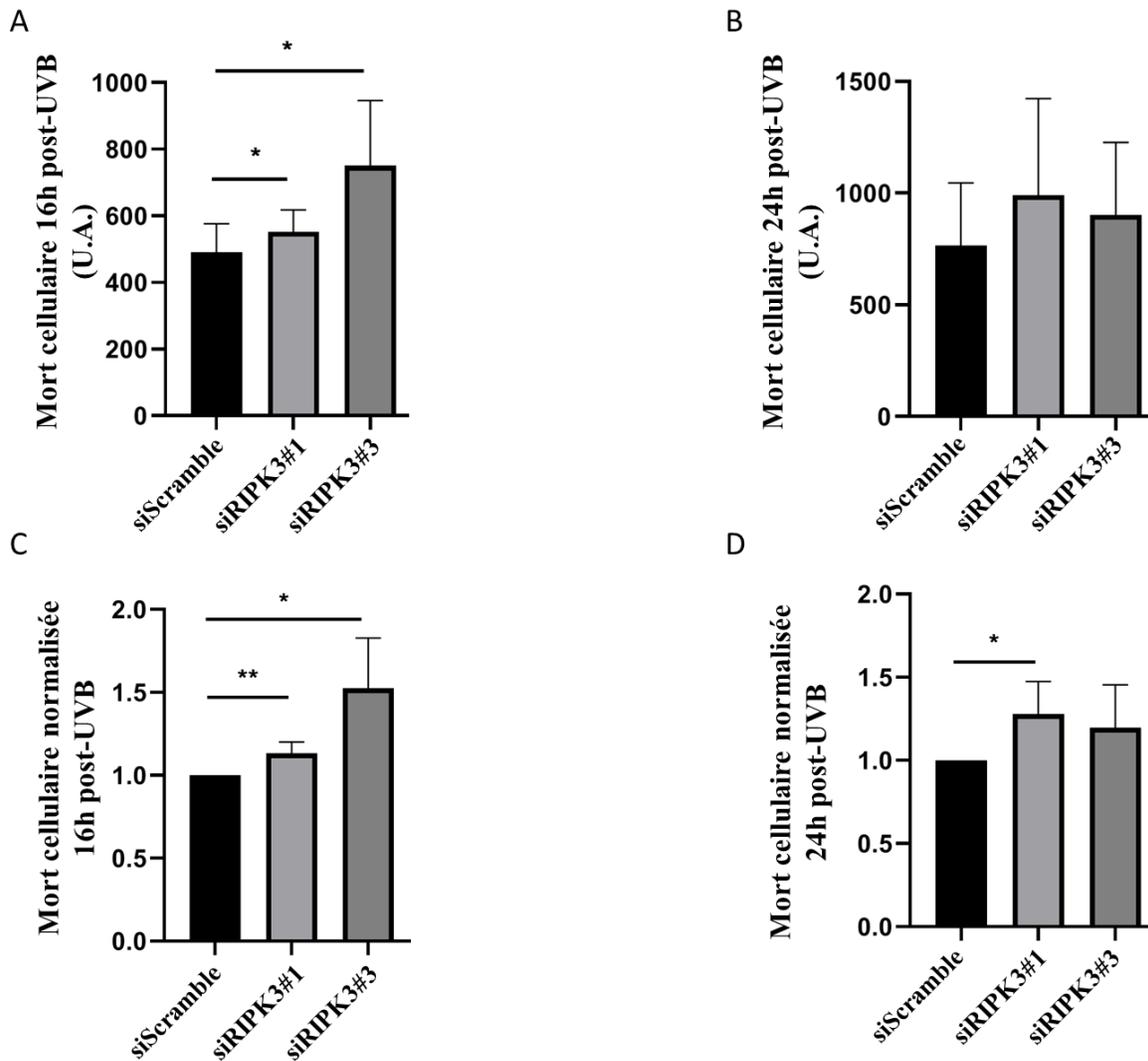


Figure 2 L'utilisation de siRIPK3 induit une augmentation de la mort cellulaire mesurée par essai CellTOX.

Les NHDF ont été transfectés par des siARN dirigés contre RIPK3 (siRIPK3#1 et siRIPK3#3) ou par un siARN contrôle (siScramble) au jour 1 (jour de l'ensemencement) et 2. Au jour 6, les cellules ont été exposées aux UVB ou non. La mort cellulaire a été mesurée par CellTOX 16h (A, C) et 24h (B, D) post-irradiation. La fluorescence mesurée en unité arbitraire (U.A.) est proportionnelle à la mort. Les résultats non-normalisés de mort sont présentés en (A) et (B), $N=4$, $*p < 0,05$, t -test. Les résultats ont été normalisés par rapport au siScramble en (C) et (D), $N=4$, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, t -test. La mortalité des NHDF exposés aux UVB est significativement augmentée par les siRIPK3 comparativement au siScramble à 16h post-irradiation. La même tendance est visible à 24h post-exposition.

2- La déplétion partielle de MLKL entraîne une diminution de la mort induite par les UVB

RIPK3 ayant un rôle dans la mort cellulaire induite par les UVB, le rôle de MLKL a aussi été évalué. Suivant la même stratégie, les NHDF ont été transfectés par des siARN dirigés contre MLKL afin de dépléter les cellules de la protéine et d'en abaisser le niveau protéique total. Trois siARN ont été présélectionnés (siMLKL #3, #7 et #8) avec une réduction de l'expression protéique de 50, 60, et 33% respectivement, (Figure 3, A et B). Suite à une dose létale d'UVB (10 000 J/m²) la mort cellulaire a été mesurée par FACS et CellTOX. Pour les mesures en FACS, les siMLKL les plus efficaces, soit #3 et #7, ont été employés. L'utilisation des siMLKL entraîne une diminution significative de la mort cellulaire 24h post-UVB en FACS comparé au siScramble dans les NHDF, passant de 26,6 % pour le siScramble à 21,6 et 22,6% pour le siMLKL #3 et #7 respectivement (Figure 3, C). Cette différence est retrouvée pour les deux siMLKL (#3 et #7) après normalisation des résultats (Figure 3, D). Les siMLKL #3 et #7 réduisent d'environ 1,3 fois la mortalité cellulaire post-UVB (Figure 3, D). Ainsi, la déplétion partielle de MLKL réduit la mort induite par les UVB.

Ces résultats sont confirmés par le test de mortalité CellTOX, où une diminution de mort cellulaire UV-induite est visible dans les NHDF transfectées par les siMLKL (#3, #7, et #8) à 24h post irradiation (Figure 4, B, D). Cette tendance est aussi observée à 16h post-irradiation, bien que non significative (Figure 4, A, C). En revanche, tous les siMLKL réduisent significativement la mort à 24h post-UVB, avec une diminution de la mortalité d'un facteur de 1,35 pour les siMLKL #3 et #7 et de 1,15 pour le siMLKL#8 comparativement au siScramble (Figure 4, B, D). Ainsi une diminution d'environ 50% de l'expression de MLKL suffit à réduire significativement la mort des NHDF induite par les UVB 24h post-irradiation. Autrement dit, MLKL sensibilise les cellules à la mort induite par les rayons UVB dans les NHDF.

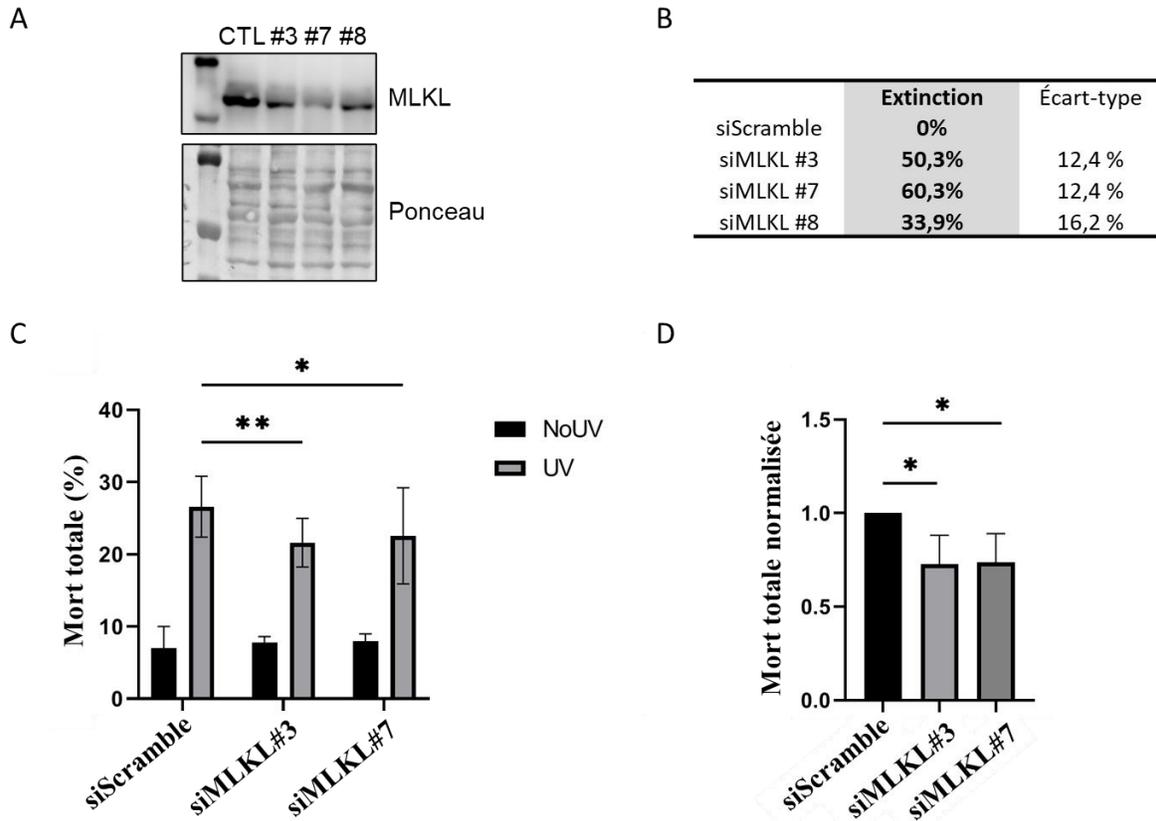


Figure 3 La diminution de l'expression de MLKL par siARN induit une diminution de la mort cellulaire mesurée en FACS.

Les NHDF ont été transfectés par des siARN dirigés contre MLKL (siMLKL#3, siMLKL#7 et siMLKL#8) ou par un siARN contrôle (siScramble) au jour 1 (simultanément à l'ensemencement). Au jour 4, les cellules ont été exposées aux UVB (UV) ou non (NoUV). (A) L'expression de MLKL a été mesurée par Western Blot. (B) Les siMLKL #3, #7 et #8 (#3, #7, #8) sont comparés au siScramble (CTL) afin de déterminer le pourcentage d'extinction de MLKL, N=4. La mort cellulaire a été mesurée par FACS 24h post-irradiation. Les résultats de FACS non-normalisés (C) ou normalisés par rapport au siScramble (D) montrent une diminution de la mort cellulaire dans les cellules transfectées par les siMLKL #3 et #7 comparé au siScramble, N=4, * $p < 0,05$, Two-way ANOVA et t-test respectivement. Le pourcentage de mort totale est faible pour les cellules non-irradiées (background). Les cellules transfectées par les siMLKL #3 et #7 sont moins sensibles à la mort induite par les UVB comparativement aux cellules siScramble.

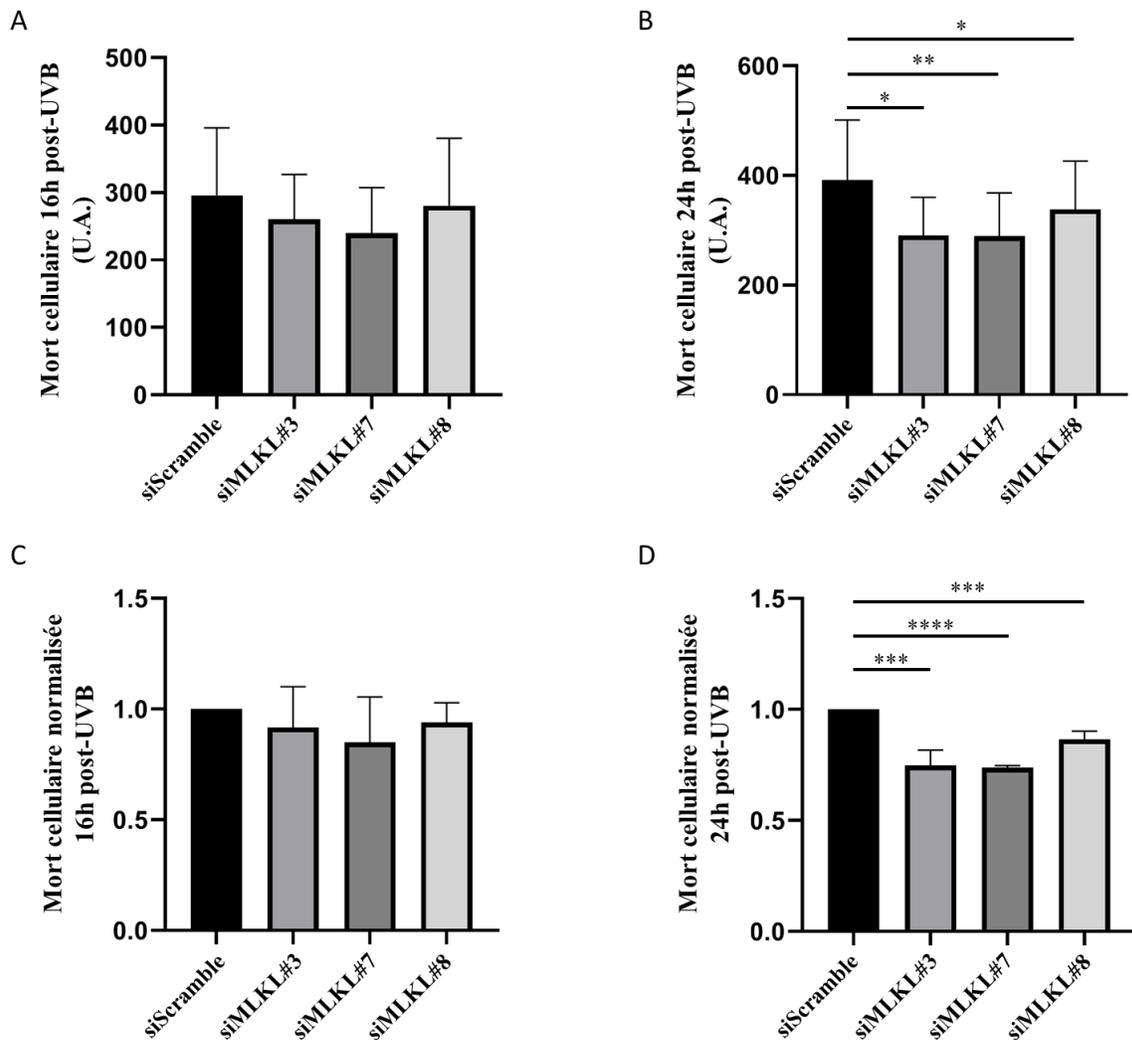


Figure 4 L'utilisation de siMLKL induit une diminution de la mort cellulaire mesurée par essai CellTOX.

Les NHDF ont été transfectés par des siARN dirigés contre MLKL (siMLKL#3, siMLKL#7 et siMLKL#8) ou par un siARN contrôle (siScramble) au jour 1 (simultanément à l'ensemencement). Au jour 4, les cellules ont été exposées aux UVB ou non. La mort cellulaire a été mesurée par CellTOX à 16h (A, C) et 24h (B, D) post-irradiation. La fluorescence mesurée en unité arbitraire (U.A.) est proportionnelle à la mort. Les résultats non-normalisés de mort sont présentés en (A) et (B), $N=4$, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, t -test. Les résultats ont été normalisés par rapport au siScramble en (C) et (D), $N=4$, $***p < 0,005$, $****p < 0,001$, t -test. La mortalité des NHDF exposés aux UVB est significativement diminuée par les siMLKL comparativement au siScramble à 24h post-irradiation.

Les résultats obtenus mettent en évidence un rôle pour RIPK3 et MLKL dans la réponse cellulaire aux UVB. La diminution du niveau protéique de RIPK3 et de MLKL modifie la

réponse des NHDF à une dose létale d'UVB. Or, ces deux protéines sont connues pour leur rôle dans la nécroptose [139]. Leur activité nécroptotique passe par la formation d'une structure appelée le nécrosome, dépendante de la phosphorylation de RIPK3 par RIPK1, puis la formation de pores dans la membrane plasmique dépendante de la phosphorylation de MLKL [152,154]. Ainsi, afin de s'assurer que le rôle de RIPK3 et de MLKL est indépendant de leur activité nécroptotique dans la réponse aux UVB, les NHDF ont été traités par des inhibiteurs pharmacologiques de nécroptose, puis les phosphorylations impliquées dans la nécroptose ont été analysées post-UVB.

3- Les UVB n'induisent pas de nécroptose

Les résultats précédents indiquent des rôles opposés pour RIPK3 et MLKL dans la mort cellulaire des NHDF exposés aux UVB. RIPK3 et MLKL étant des acteurs centraux de la nécroptose, celle-ci a été inhibée afin de vérifier si le rôle de RIPK3 et de MLKL post-UVB est dépendant, ou non, de leur activité nécroptotique. Une forte dose létale d'UVB a été utilisée ($30\ 000\ \text{J/m}^2$) afin d'évaluer une potentielle activation de la nécroptose entre 0 et 24h post-irradiation. Deux inhibiteurs de nécroptose ont été employés, soit Necrosulfonamide (NSA) qui bloque l'activité nécroptotique de MLKL [286,287], et Necrostatin-1s (Nec1s) qui inhibe la nécroptose par liaison à RIPK1 [288], bloquant ainsi la formation du nécrosome composé de RIPK3 (Figure 5, D). L'activité métabolique des cellules a été analysée et représente une mesure indirecte de la viabilité cellulaire. Les rayons UVB induisent une diminution de l'activité métabolique des cellules NHDF (Figure 5, A, B). Dans le chapitre 1, NSA n'avait pas d'effet sur le changement d'activité métabolique induit par les rayons UVB. Ici, nous avons évalué le rôle de l'activité nécroptotique de RIPK1 sur l'activité métabolique cellulaire post-UVB en utilisant Nec1s seul (Figure 5, A), et en combinaison avec NSA (Figure 5, B). L'inhibition de RIPK1 par Nec1s ou l'inhibition combinée de RIPK1 et de MLKL par Nec1s et NSA, n'empêchent pas la perte d'activité métabolique induite par les rayons UVB (Figure 5, A, B). Pour finir, une mesure directe de mortalité (CellTOX) dans les cellules NHDF traitées par NSA ou non, confirme l'absence de nécroptose dans les cellules irradiées aux UVB (Figure 5, C).

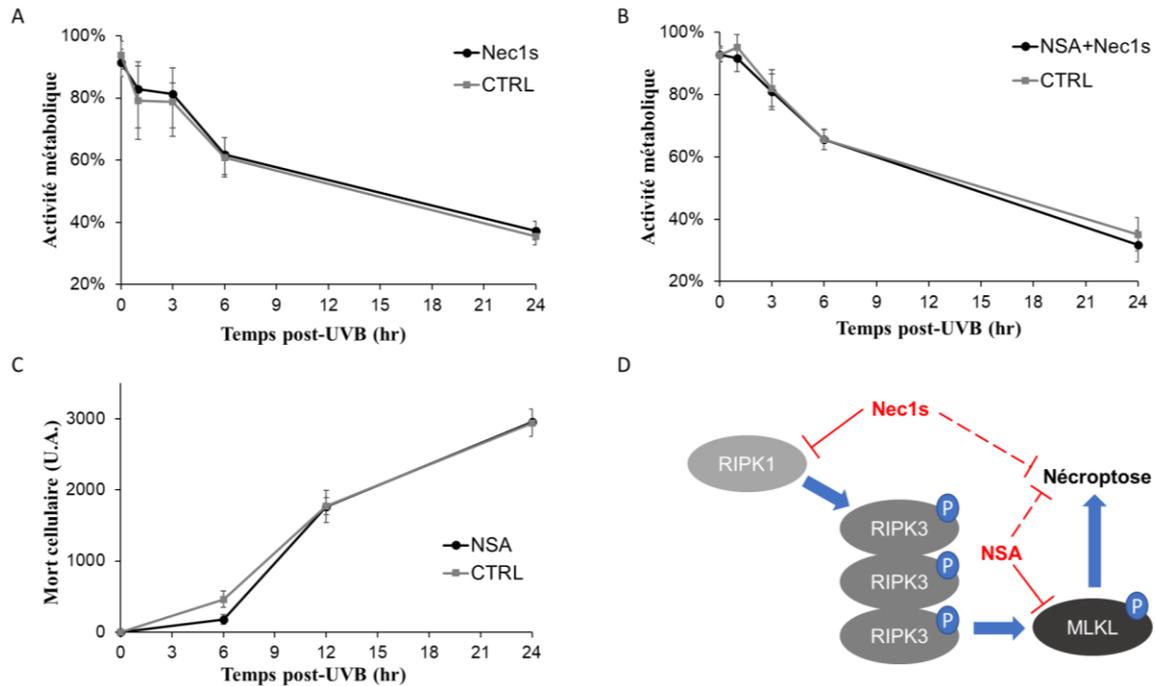


Figure 5 Les UVB n'induisent pas de nécroptose dans les NHDF.

Les NHDF ont été traités avec ou sans inhibiteurs de nécroptose puis irradiés à 30 000 J/m² d'UVB. L'activité métabolique a été évaluée dans les cellules incubées avec l'inhibiteur de RIPK1 Necrostatin-1s (Nec1s, 100 µM) en (A), ainsi qu'avec la combinaison des inhibiteur Necrosulfonamide (NSA, 2 µM) et Nec1s (NSA+Nec1s) en (B). La mort cellulaire a été mesurée dans des cellules traitées avec NSA en (C) par test CellTOX. La fluorescence mesurée en unité arbitraire (U.A.) est proportionnelle à la mort. Aucun changement, ni dans l'activité métabolique, ni dans la mort cellulaire, n'est visible avec l'ajout d'inhibiteurs de nécroptose, N=4. (D) Représentation de la voie de nécroptose et des protéines majeurs impliquées, soit RIPK1, RIPK3 et MLKL. Nec1s inhibe l'activation de la nécroptose par liaison à RIPK1, NSA inhibe l'activation de MLKL.

4- Évaluation des niveaux de phosphorylation de MLKL et RIPK3

En plus de l'utilisation d'agents pharmacologiques, l'activation de la nécroptose par les UVB a été infirmée par Western-Blot. La phosphorylation des médiateurs impliqués dans la voie nécroptotique (RIPK3-P et MLKL-P) a été évaluée après une irradiation létale d'UVB (Figure 6, A). La proportion de RIPK3 phosphorylée augmente significativement entre 0 et 1h post-irradiation UVB, soit une augmentation de 1,6 fois par rapport aux NHDF non-irradiés, puis retrouve le niveau de phosphorylation des cellules non-irradiées, placé à 1 (Figure 6, B). La proportion de protéines MLKL phosphorylées est similaire au contrôle, puis diminue en dessous du niveau des cellules non-irradiées, pour atteindre 0,65 soit une

diminution de 1,5 fois par rapport au contrôle (Figure 6, C). Malgré des variations dans l'état de phosphorylation de la protéine RIPK3 suivant l'exposition UVB, la proportion de MLKL phosphorylée diminue et devient inférieure à celle des cellules non-irradiées. Ces résultats confirment que les UVB ne déclenchent pas la voie de mort nécroptotique malgré la présence des protéines impliquées dans la nécroptose et leur capacité à être phosphorylées.

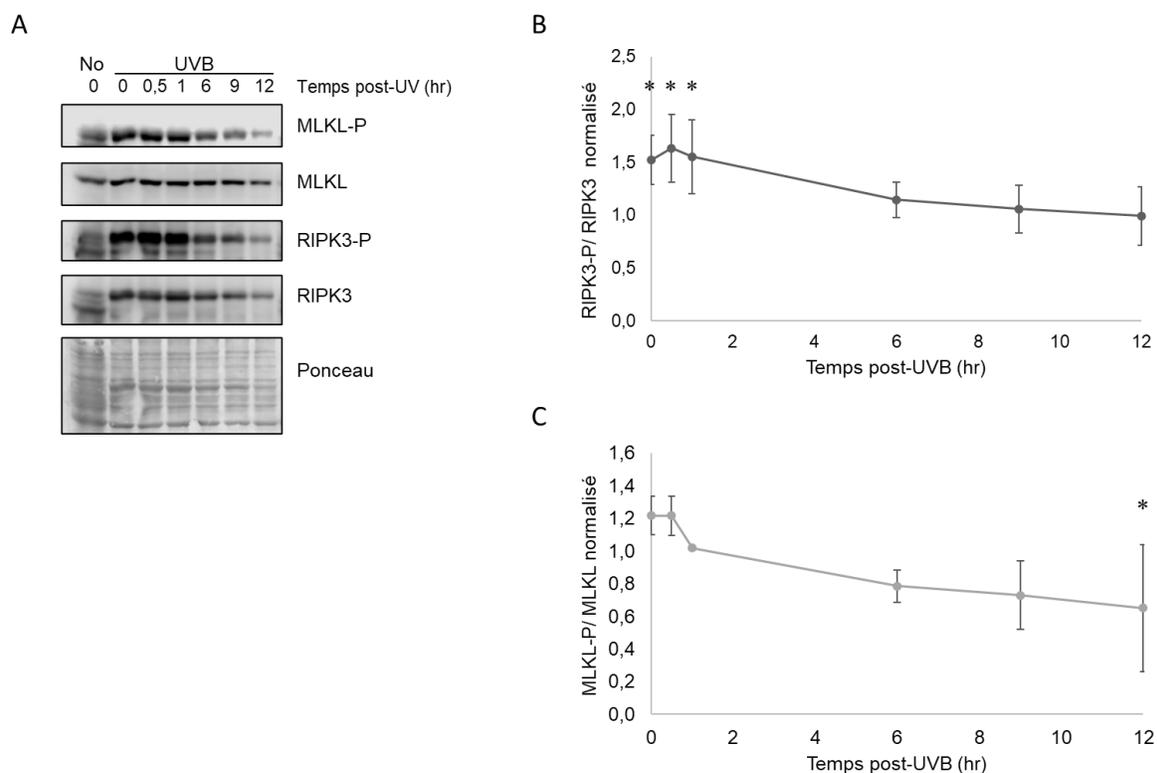


Figure 6 Analyse des phosphorylations de RIPK3 et de MLKL spécifiques à la nécroptose post-UVB.

Les NHDF ont été irradiés à 20 000 J/m² d'UVB (UVB), ou non (No) puis récoltés à différents temps post-irradiation. Les phosphorylations de RIPK3 (RIPK3-P) et de MLKL (MLKL-P), ainsi que les protéines totales RIPK3 et MLKL ont été mesurées par Western Blot. (A) Western Blot de MLKL-P, MLKL, RIPK3-P et RIPK3, ainsi que le ponceau dans des NHDF. (B) La proportion de RIPK3-P sur RIPK3 totale (RIPK3-P / RIPK3) a été quantifiée dans les cellules irradiées et normalisée sur la proportion de RIPK3-P / RIPK3 dans les cellules non-irradiées. (C) De même, la proportion de MLKL-P / MLKL totale (MLKL-P / MLKL) a été quantifiée dans les cellules irradiées et normalisée sur celle des cellules non-irradiées. La proportion de RIPK3-P / RIPK3 est significativement augmentée entre 0 et 1h post-UVB, puis redevient similaire au contrôle non-irradié. La proportion de MLKL-P / MLKL est similaire puis inférieure à celle des cellules non-irradiées, avant et à 12h post-UVB respectivement. N=3, * p-value < 0.05, t-test.

De plus, le rôle de MLKL et de RIPK3 dans la mort induite par les rayons UVB est indépendant de leur activité nécroptotique. Cela est mis en évidence par les résultats précédents (Figure 5 et 6). Premièrement, l'utilisation d'inhibiteurs de nécroptose, bloquant la formation du nécrosome ou l'activité nécroptotique de MLKL, n'empêchent pas la mort des NHDF exposés aux UVB. Deuxièmement, les niveaux de phosphorylation de RIPK3 et de MLKL, connues pour être impliqués dans la nécroptose, ne sont pas augmentées par l'irradiation UVB (à l'exception de RIPK3 dans la première heure post-UVB).

5- MLKL joue un rôle dans l'apoptose induite par les UVB

Les résultats indiquent que RIPK3 pourrait protéger les cellules de la mort UV-induite, tandis que MLKL sensibilise les cellules à la mort induite par les rayons UVB. Ces deux protéines semblent donc exercer des rôles opposés dans la réponse au stress génotoxique. Leur rôle dans la mort UV-induite est indépendant de leur activité nécroptotique, c'est-à-dire la formation du nécrosome et la formation de pores dans la membrane plasmique pour RIPK3 et MLKL respectivement (Figure 5), mais aussi indépendant des phosphorylations jouant dans la nécroptose (Figure 6). Dans le chapitre 1, nous avons observé que seule l'apoptose est mesurable suite à une irradiation UVB dans les NHDF. Ainsi, RIPK3 et MLKL jouent potentiellement un rôle dans l'apoptose induite par les UVR dans les NHDF. Afin de vérifier cette hypothèse, le clivage d'une cible importante des caspases, soit PARP1, a été analysé 24h après une irradiation létale d'UVB ($10\ 000\ \text{J/m}^2$) dans des NHDF déplétés partiellement en RIPK3 ou en MLKL. Les Western Blot démontrent que les siRIPK3 #1 et #3 ne modifient pas le clivage de PARP1 comparativement au siScramble (Figure 7, A, B). Ces résultats indiquent que RIPK3 n'est pas directement impliquée dans l'apoptose UV-induite des NHDF. En revanche, le clivage de PARP1 est significativement réduit avec l'utilisation des siMLKL #3 et #7 (Figure 7, C, D), la portion de PARP1 clivée sur PARP1 totale passant de 6,3 % dans les siScramble à 2,3% et 2% dans les siMLKL #3 et #7 respectivement. Ainsi la déplétion partielle de MLKL, réduit l'activité des caspases, démontrant un rôle direct de MLKL dans l'apoptose induite par les rayons UVB.

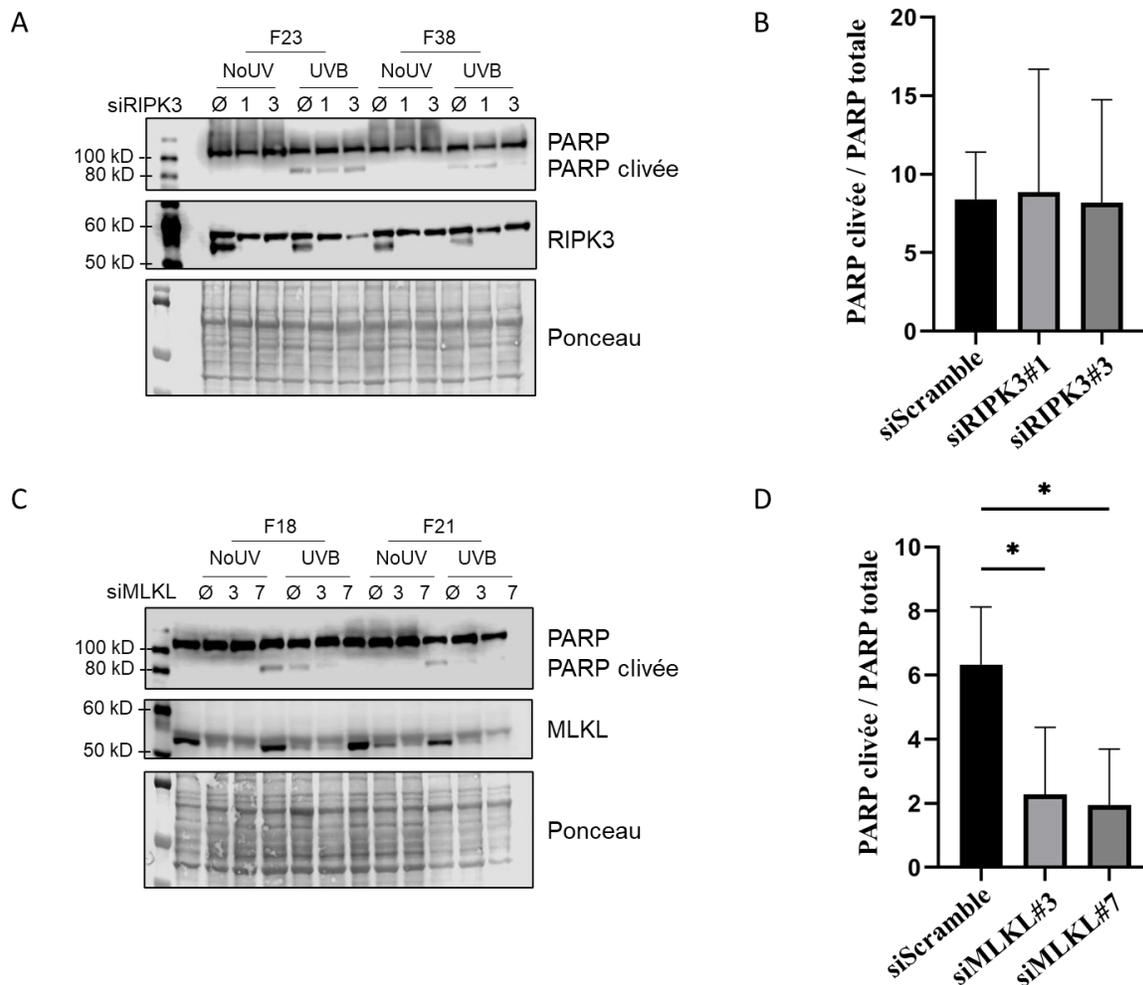


Figure 7 Impact de la déplétion partielle de RIPK3 et de MLKL sur l'activation des caspases post-UVB par mesure du clivage de leur cible, PARP1.

Quatre cultures de NHDF (F18, F21, F23 et F38) ont été transfectées par les siRIPK3 #1 et #3 ou par les siMLKL #3 et #7, ou par le contrôle siScramble (Ø), puis irradiées par une dose létale d'UVB (10 000 J/m²) ou non (NoUV). PARP1 (110kD) et son clivage (89kD) ont été mesurés par Western Blot, ainsi que RIPK3 en (A) et MLKL en (C). Le ponceau sert de contrôle de dépôt. La proportion de PARP1 clivée / PARP1 totale dans les cellules exposées est présentée en (B) suite au siRIPK3 et en (D) suite au si MLKL. PARP1 totale est la somme de la bande à 110kD et celle à 89kD. Les siRIPK3 ne modifient pas la proportion de PARP1 clivé post-UVB comparativement au siScramble. Les siMLKL entraînent une diminution de la proportion de PARP1 clivé dans les NHDF suite à l'irradiation UVB, impliquant une diminution de l'activité des caspases et de l'apoptose. N=4, * p-value < 0.05, t-test.

2.4 Conclusions

RIPK3 protège les cellules de la mort induite par les UVB

La protéine RIPK3 a été étudiée dans le cadre de la mort cellulaire induite par les UVB dans les NHDF. De manière inattendue, la déplétion partielle de RIPK3 entraîne une augmentation de la mort cellulaire induite par les UVB. Ces résultats observés en FACS (Figure 1) ont été confirmés par mesure de la mortalité par CellTOX (Figure 2). RIPK3 semble donc protéger les NHDF de la mort induite par les UVB, donnant à RIPK3 un nouveau rôle dans la survie des cellules exposées aux UVB.

MLKL sensibilise les cellules à la mort induite par les rayons UVB

RIPK3 ayant un rôle dans la mort UV-induite, la fonction de MLKL dans la mort des cellules exposées aux UVR a aussi été analysée. À l'opposé de RIPK3, la déplétion partielle de MLKL entraîne une baisse de la mortalité suite à l'irradiation des NHDF par les rayons UVB. Ces résultats sont confirmés par deux techniques de mesure de la mortalité, soit en FACS (Figure 3) et en CellTOX (Figure 4). Cette étude révèle pour la première fois la participation de MLKL dans la mort UV-induite. Ainsi, la pseudo-kinase MLKL sensibilise les cellules à la mort cellulaire induite par les rayons UVB.

Le rôles de RIPK3 et de MLKL dans la réponse aux UVB sont indépendants de leur activité nécroptotique

RIPK3 et MLKL sont connues comme des acteurs centraux de la nécroptose, avec MLKL comme effecteur de cette voie de mort programmée [139]. Puisque les résultats du chapitre 2 démontrent que RIPK3 et MLKL jouent dans la réponse des NHDF aux UVB, nous avons donc vérifié que les rayons UVB n'induisent pas de nécroptose. L'utilisation d'inhibiteurs de nécroptose suite à une irradiation létale d'UVB a infirmé l'activation de la nécroptose par ces rayons (Figure 5). De plus, les phosphorylations impliquées dans la nécroptose ont été mesurées par Western Blot après une irradiation UVB (Figure 6). La proportion de RIPK3 phosphorylée est augmentée entre 0 et 1h post-irradiation, puis diminue et retrouve le niveau basal placé à 1. La phosphorylation de RIPK3 pourrait potentiellement jouer un rôle dans la

survie des NHDF post-UVB. En revanche, la proportion de MLKL phosphorylée n'est pas significativement augmentée suite à l'exposition des NHDF, celle-ci est diminuée comparativement aux cellules non-irradiées. Ce résultat indique que les UVB n'induisent pas de nécroptose et que la contribution de MLKL dans l'apoptose UV-induite est indépendante de sa phosphorylation.

Ainsi, ces résultats mettent en évidence que le rôle de RIPK3 et de MLKL dans la survie et mort UV-induite des NHDF, est indépendant de leur activité nécroptotique. En effet, la déplétion partielle de ces deux protéines modifie la réponse des cellules à une dose létale d'UVB, tandis que l'inhibition de leur activité nécroptotique (formation du nécrosome pour RIPK3 et formation de pores dans la membrane plasmique pour MLKL) n'a pas d'effet sur la survie des NHDF post-UVB.

RIPK3 joue un rôle dans la survie cellulaire, indépendamment de l'apoptose UV-induite

RIPK3 protège les cellules de la mort cellulaire induite par les rayons UVB. Le rôle de RIPK3 est indépendant de sa fonction dans la nécroptose (Figure 5 et 6), et semble indépendant de l'activation des caspases (Figure 7). En effet, le clivage de PARP1 par les caspases est un marqueur de l'apoptose. Suite à l'exposition UVB, l'apoptose est activée dans les NHDF avec le clivage de PARP1 (Figure 7). Les siRIPK3 n'augmentent pas la proportion de PARP1 clivé post-UVB, indiquant que RIPK3 n'est pas impliquée directement dans l'activation des caspases, et donc dans l'apoptose UV-induite. Le rôle de RIPK3 dans la mort UV-induite est donc indépendant de l'apoptose. Ces résultats soulèvent la question du mécanisme par lequel RIPK3 protège les NHDF de la mort UV-induite. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer son rôle indirect. En premier lieu, RIPK3 pourrait jouer sur les voies de survie cellulaire, en contrebalançant le signal apoptotique. Deuxièmement, RIPK3 pourrait influencer l'avancement du cycle cellulaire, ce qui modifierait la réponse des NHDF à une dose létale d'UVB. Néanmoins les cellules transfectées par siRIPK3 ou siScramble se trouvent principalement en phase G1 au jour de l'irradiation, avec peu de variations dans la distribution des cellules en G1, S, G2/M (Figure S1, B). Une augmentation de la proportion des cellules en G2/M est visible pour les siRIPK3#1, mais une tendance inverse est observée pour les siRIPK3#3, avec 10,7 % des cellules G2/M pour le siScramble, 14,1 % et 7,8% pour

les siRIPK3 #1 et #3 respectivement. RIPK3 ne semble donc pas impliqué dans le cycle cellulaire des NHDF. Enfin, RIPK3 pourrait jouer sur les mécanismes de réparation des dommages induits par les UVB. Ainsi, le mécanisme d'action de RIPK3 dans la réponse des cellules aux UVB reste à explorer.

MLKL joue un rôle direct dans l'apoptose induite par les rayons UVB

La protéine MLKL sensibilise les cellules à la mort UV-induite, indépendamment de son activité nécroptotique et de son niveau de phosphorylation (Chapitre 1 et 2). De plus, l'effet des siMLKL sur l'avancement du cycle cellulaire a aussi été vérifié. Ceux-ci n'influencent pas la distribution des NHDF en phase G1, S et G2/M pré-irradiation (Figure S1, A), démontrant que MLKL ne joue pas dans l'avancement du cycle cellulaire. Ces résultats ont permis de poser l'hypothèse d'un rôle direct de MLKL dans l'apoptose induite par les UVB dans les NHDF. Cette hypothèse est appuyée par les résultats en Figure 7, qui montrent que la déplétion partielle de MLKL réduit l'activité des caspases (clivage de PARP1). Ainsi, les siMLKL réduisent la mort UV-induite des NHDF (Figure 3 et 4), et plus précisément l'activation des caspases (Figure 7). MLKL est donc un acteur direct de l'apoptose UV-induite.

Pour conclure, cette étude met en évidence, pour la première fois, le rôle de RIPK3 et de MLKL dans la survie et la mort cellulaire induites par une dose létale d'UVB. RIPK3 protège les NHDF de la mort, indépendamment de son activité nécroptotique et de l'activation des caspases, et MLKL sensibilise les cellules à la mort, plus précisément à l'apoptose, induite par les rayons UVB. RIPK3 et MLKL sont des nouveaux acteurs de la mort UV-induite.

2.5 Figure supplémentaire

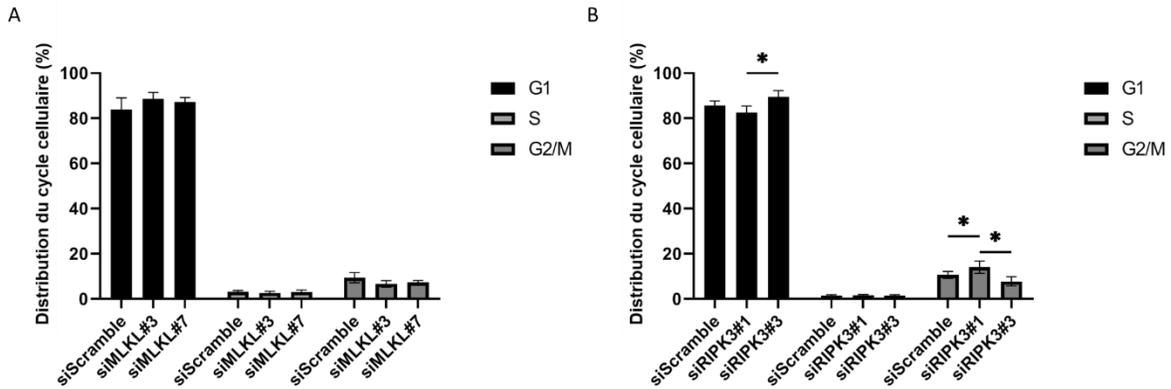


Figure S1 : Distribution des NHDF dans le cycle cellulaire après transfection des cellules par les siMLKL et siRIPK3

Les NHDF sont transfectés au jour 1 avec les siMLKL #3 et #7 en (A) et aux jours 1 et 2 avec les siRIPK3 #1 et #3 en (B). Le siScramble sert de contrôle de transfection. Au jour 4 pour les siMLKL et au jour 6 pour les siRIPK3, soit au jour de l'irradiation théorique, les NHDF sont récoltés, fixés à l'éthanol 70% durant 30 min sur glace, lavés une fois au PBS, puis incubés 30 min avec l'iodure de propidium (50 µg/ml) à 37°C. La distribution des cellules dans le cycle (G1, S, G2/M) est analysée en FACS. N=4, * p-value < 0.05, Two-way Anova et post-test Tukey. Les cellules transfectées sont principalement en G1 (> 80%). De faibles changements sont visibles dans la distribution des cellules siRIPK3 en G2/M (siScramble : 10,7 %; siRIPK3#1 : 14,1 %; siRIPK3#3 : 7,8%).

Chapitre 3 : Influence du régime d'irradiation sur la mort cellulaire induite par les UVB dans les NHDF

3.1 Introduction

Les deux chapitres précédents se sont intéressés à la mort programmée activée par une dose unique et létale d'UVB. Or, la dose et la fréquence d'irradiation UVB influencent certaines réponses cellulaires, dont la réparation de l'ADN. Des doses faibles chroniques d'UVB (CLUV) forment des dommages CPD persistants et tolérés par les fibroblastes dermiques humains (NHDF). De plus, un pré-traitement CLUV entraîne une réparation plus efficace des CPD suite à une dose aiguë non-létale d'UVB dans les NHDF [282,283]. Les NHDF ont donc une réponse adaptative pour la réparation des dommages, suite à des expositions chroniques d'UVB. La mort cellulaire est une autre réponse au stress génotoxique UVB qui pourrait être modifiée en fonction du régime d'irradiation (chronique vs unique). L'effet d'une stimulation des NHDF par des doses chroniques d'UVB (CLUV) sur la mort cellulaire a été précédemment étudié au sein du laboratoire, à 24h post-irradiation UVB. Les résultats ne montraient pas de différences significatives de mortalité à 24h suivant une irradiation létale d'UVB, pour des cellules prétraitées ou non par une CLUV [282]. Les NHDF n'ont donc pas la même réponse cellulaire en ce qui concerne la vitesse de réparation des dommages selon le régime d'irradiation UVB employé, tandis que la mort cellulaire tardive (24h post-UVB) ne semble pas être affectée par le régime d'irradiations chroniques. Ces résultats soulèvent différentes hypothèses et questions. Notamment, la pré-stimulation CLUV des NHDF pourrait induire un changement dans la sensibilité des cellules à la mort cellulaire à temps court post-irradiation (3 et 6h, mort précoce), et n'être pas visible 24h post-irradiation aiguë (mort tardive). De plus, le prétraitement CLUV pourrait activer une voie non-apoptotique en parallèle ou en remplacement de l'apoptose, tel que la nécroptose. Dans ce chapitre, l'effet d'un régime d'irradiation chronique UVB sur la mort précoce des NHDF induite par une dose létale d'UVB est étudié. Pour cela, la sensibilité des NHDF à la mort cellulaire avec ou sans pré-stimulation CLUV est analysée, ainsi que les voies de mort cellulaire activées par une dose létale d'UVB suivant des irradiations chroniques d'UVB. Cette étude raffine les connaissances sur la réponse adaptative des NHDF exposés à un régime chronique d'UVB CLUV.

3.2 Matériel et méthodes

Culture cellulaire

Comme dans les chapitres précédents, des fibroblastes humains normaux dermiques (NHDF) provenant de biopsies de 4 femmes ont été utilisés (F18, F21, F23, F38) et cultivée dans du DMEM supplémenté de 5% de FBS et de 1% de pénicilline/streptomycine, à 37°C, 5% CO₂.

Traitement CLUV et irradiation UVB aigüe

Les cellules sontensemencées au jour 1 en plaque 6 puits (Western Blot), 12 puits (FACS) ou 96 puits (MTS) à une densité de 21 050 cellules/cm². Une fois à confluence, soit entre le jour 4 et 6, le traitement d'irradiation chronique (CLUV) débute et se poursuit durant 7,5 jours. Le traitement CLUV se compose de 15 irradiations UVB de 75 J/m², effectuées toutes les 12h dans du PBS, soit un traitement étalé sur 7,5 jours. En parallèle, un contrôle de cellules non-irradiées (NoUV) est cultivé et subit le même traitement à l'exception des irradiations. 12h après la dernière irradiation chronique, les cellules sont exposées à une irradiation létale, dite aigüe (+A), de 30 000 J/m² (MTS), 20 000 J/m² (Western Blot, FACS) ou de 10 000 J/m² (FACS) dans du PBS suivant le pré-traitement CLUV (CLUV+A) ou sans pré-traitement (NoUV+A). Les contrôles CLUV et NoUV ne subissent pas l'irradiation aigüe (Figure 1).

Un traitement plus court de seulement 5 irradiations chroniques de 75 J/m², toutes les 12h, soit un traitement étalé sur 2,5 jours, a aussi été utilisé et est appelé CLUV₅ (FACS).

Inhibition de l'apoptose

Les NHDF ayant subi ou non la CLUV, sont traitées avec l'inhibiteur d'apoptose Q-VD-OPh (QVD; Millipore Sigma, USA) ou avec du milieu contrôle (CTRL). Comme pour les chapitres précédents, les cellules sont incubées 30 min avec l'inhibiteur ou le contrôle avant d'être irradiées ou non, dans du PBS avec une dose létale aigüe de 20 000 (FACS) ou 30 000 J/m² (MTS). Après l'irradiation, les cellules sont incubées de nouveau avec du milieu contenant l'inhibiteur, ou avec du milieu contrôle. Ainsi on retrouve les quatre conditions d'irradiation : NoUV, NoUV+A, CLUV, CLUV+A, et les deux traitements; QVD et CTRL.

Cytométrie en flux (FACS)

Après irradiation des NHDF à 10 000 ou 20 000 J/m², les cellules ont été récoltées à 3 et 6h post-irradiation pour analyser la mort cellulaire précoce. Les cellules ont été marquées à l'iodure de propidium (PI) et à l'Annexine V-FITC (Annexine V) à l'aide du kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (cat no 556547, BD Biosciences). Les cellules irradiées (NoUV+A et CLUV+A) sont comparées aux cellules non-irradiées (NoUV et CLUV). La mort cellulaire totale est mesurée par ajout du pourcentage des cellules PI+ / Annexine V-, PI- / Annexine V+ et des cellules doubles positives (PI+ / Annexine V +). Un marquage au PI seul a aussi été effectué à 12h post-irradiation pour les quatre conditions d'irradiations.

Western Blot

Les cellules NHDF ont été prétraitées ou non par irradiations CLUV. Les cellules sont ensuite exposées à une dose létale aigüe d'UVB de 20 000 J/m² (NoUV+A et CLUV+A) puis récoltées à différents temps post-UV (0; 0,5; 1; 6; 9; 12h). Les contrôles non-irradiés sont récoltés au temps 0h (NoUV et CLUV). L'extraction et la quantification protéique sont décrites au chapitre 2. Les protéines totales RIPK3, MLKL et leur forme phosphorylée, ainsi que PARP et son clivage ont été mesurés en Western Blot.

Les anticorps α -RIPK3 (6E6.2, #MABC28, Millipore, 1 :1000), α -RIPK3 phsopho ser227 (#Ab209384, 0,731 mg/mL, Abcam, 1 :500), α -MLKL (3H1, #MABC604, Millipore, 1:1000) et α -MLKL phospho ser358 (#91689, Cell Signaling Technology, 1 :500), ainsi que α -PARP (F2, #sc-8007, 200 ug/mL, Santa Cruz Biotechnology, 1:500) ont été employés.

Les membranes ont été scannées à l'aide du scanner C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences, USA) et analysées avec Image Studio Lite software (LI-COR Biosciences, USA). La coloration des protéines au rouge ponceau est utilisée pour normaliser la quantité de protéine pour chaque Western Blot.

Mesure de l'activité métabolique (MTS)

Suivant le même protocole que précédemment (Chapitre 1 et 2), un essai MTS a été utilisé afin de mesurer l'activité métabolique des cellules traitées avec l'inhibiteur d'apoptose ou avec du milieu contrôle, entre 0 et 24h suivant l'irradiation UVB. Pour chaque point, les

résultats des cellules irradiées, NoUV+A et CLUV+A, sont normalisés par rapport aux cellules non-irradiées pour une même condition, NoUV et CLUV respectivement.

Analyses statistiques

Les résultats sont présentés avec la moyenne +/- SD et leur significativité est évaluée en utilisant le logiciel GraphPad Prism8 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), lorsque applicable. Les Western Blot sont analysés par multiple t-test pour comparer à chaque temps les points des différents traitements. Les résultats de FACS et de MTS sont analysés par Two-way ANOVA suivi d'un post-test Tukey, à l'exception des résultats de FACS ne présentant qu'une variable (mesure du PI seulement) qui a été évalué par t-test. « N » indique le nombre de cultures primaires humaines utilisées pour chaque expérience. Une p-value < 0.05 est considérée comme significative.

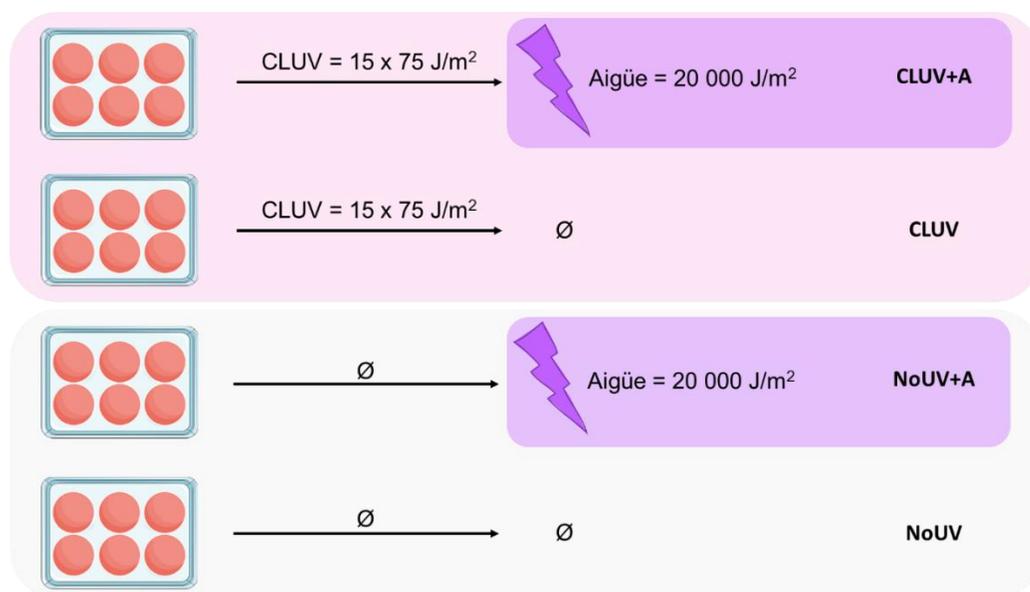


Figure 1 Schéma du protocole d'irradiation.

Les NHDF confluents sont irradiés avec différents traitements d'UVB pour étudier la sensibilité des cellules à la mort cellulaire. Une dose unique létale d'UVB (NoUV+A) est comparée à un pré-traitement chronique suivi d'une dose létale d'UVB identique (CLUV+A). Le contrôle non-irradié (NoUV) et le contrôle traité par la CLUV (CLUV) permettent de s'assurer de la non-létalité du traitement CLUV. La stimulation CLUV consiste en 15 irradiations de 75 J/m² toutes les 12h, soit un traitement étalé sur 7.5 jours. L'irradiation aiguë létale correspond à 10 000, 20 000 ou 30 000 J/m² d'UVB 12h après la dernière irradiation chronique. Les cellules sont ensuite récoltées pour différentes analyses.

3.3 Résultats

La pré-stimulation CLUV permet d'évaluer la réponse adaptative des NHDF selon le régime d'irradiation UVB. Ici, la sensibilité des cellules à la mort cellulaire a été examinée en fonction du régime d'irradiation, chronique ou unique. Une représentation des différents traitements et contrôles est présentée en figure 1.

1- Le pré-traitement CLUV ne change pas la sensibilité des NHDF à la mort cellulaire précoce induite par une dose létale d'UVB

Les résultats obtenus précédemment au sein du laboratoire mettaient en évidence que les NHDF avaient une sensibilité similaire à la mort cellulaire suite à une exposition létale d'UVB, avec ou sans pré-traitement CLUV. Ces résultats avaient été obtenus 24h post-irradiation en FACS, soit une mesure de la mort cellulaire tardive [282].

Nous nous sommes intéressés à la mort cellulaire précoce, soit 3 et 6h post-irradiation, suivant une irradiation létale d'UVB de 20 000 J/m², avec ou sans pré-stimulation CLUV. Tout d'abord, le traitement CLUV seul n'induit pas de mortalité en comparaison avec les cellules non-traitées NoUV (Figure 2). De plus, les NHDF ont la même sensibilité à la mort cellulaire induite par une dose aigüe létale d'UVB, avec ou sans pré-traitement CLUV, à 3h et 6h post-irradiation aigüe (Figure 2, a, b). À 3h post-UVB, la mortalité totale représente 35,4% et 34,2% des cellules NoUV+A et CLUV+A respectivement, et à 6h, 47,5% des cellules sont marquées dans les deux conditions. Les résultats ont été obtenus par marquage à l'iodure de propidium (PI) et à l'Annexine V (AV), deux marqueurs de la mort cellulaire, et ont été mesurés en FACS. Aucune différence n'est apparente dans la proportion de cellules simples positives (PI+/AV- et AV+/PI-) et doubles positives (PI+/AV+). Le PI reflète la perméabilité membranaire des cellules en voie de mort. Une mesure à 12h du PI seul suivant l'irradiation aigüe a aussi été effectuée (Figure 2, c) et confirme les résultats obtenus à 3 et 6h post-UVB. Ainsi, des irradiations chroniques précédant une dose létale d'UVB n'augmentent, ni ne réduisent, la mortalité des NHDF.

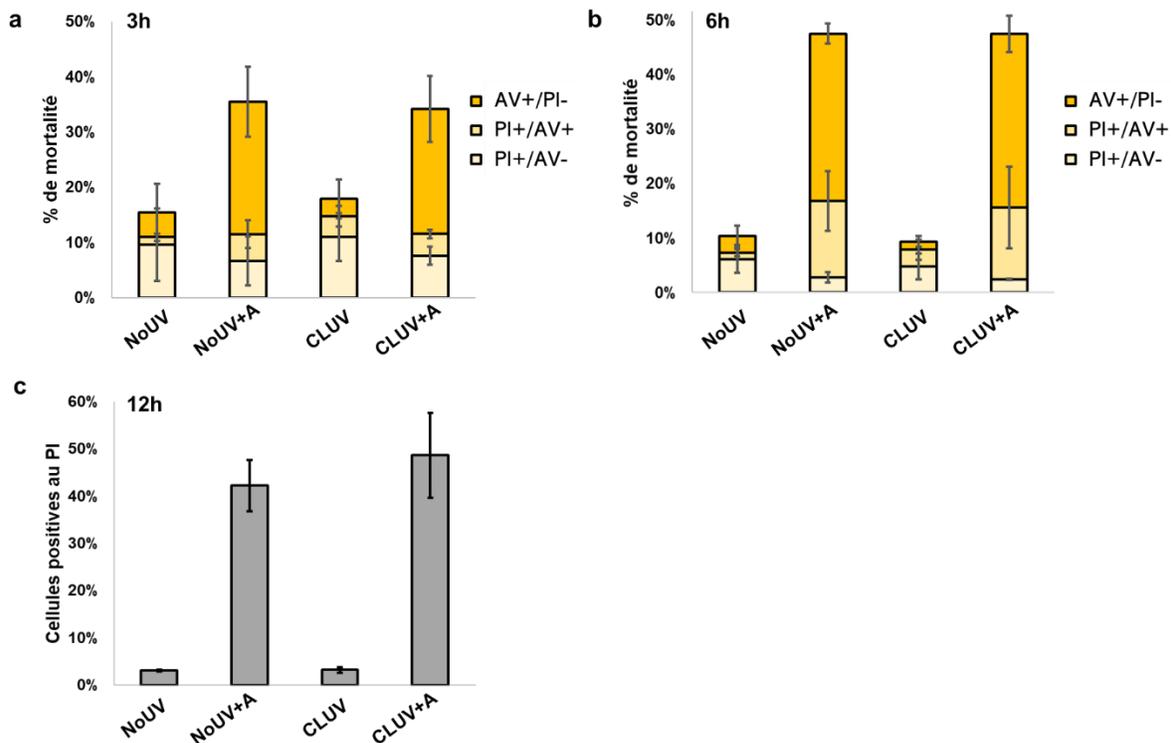


Figure 2 Mort cellulaire mesurée en FACS suivant un prétraitement CLUV.

Les NHDF ont été prétraitées par des irradiations chroniques CLUV ou non (NoUV), une partie des cellules a été exposée à une dose létale aigüe d'UVB de 20 000 J/m², soit les NoUV+A et les CLUV+A. Les contrôles NoUV et CLUV n'ont pas été exposés à cette dose létale. Les cellules ont été récoltées à 3h (a) et 6h (b) post irradiation aigüe et analysées par FACS par des marquages à l'iodure de propidium (PI) et à l'Annexine V-FITC (AV). Les cellules vivantes sont doubles négatives, les cellules en voie de mort sont simples (PI+/AV- et AV+/PI-) ou doubles positives (PI+/AV+). Des cellules ont été récoltées à 12h post-irradiation aigüe et analysées en FACS avec un marquage PI (c). La proportion de cellules en voie de mort est la même avec ou sans prétraitement CLUV à 3h, 6h et 12h post-irradiation aigüe létale. La CLUV seule et les cellules non-irradiées contrôles (NoUV) ont une faible proportion de cellules marquées, comme attendu. N=4.

2- Des modifications dans les conditions d'irradiation CLUV et d'irradiation létale n'altèrent pas le résultat précédent

Au vu des résultats précédents, des modifications dans le régime d'irradiations ont été testées afin de s'assurer que le résultat puisse être généralisé selon la dose létale d'UVB employée ou la durée du traitement CLUV. Premièrement, une autre dose aigüe de 10 000 J/m² a été employée suivant ou non un pré-traitement CLUV. La mortalité cellulaire a été mesurée en

FACS à 6h post-irradiation. Aucune différence significative dans le marquage PI et Annexine V n'est visible suite à une pré-stimulation CLUV (CLUV+A) comparé au cellules NoUV+A (Figure 3, a). Comme attendu, la mortalité est plus faible suite à une dose létale de 10 000 J/m² (environ 20% de mort totale) comparée à une dose de 20 000 J/m² (environ 45% de mort totale) pour un même temps post-irradiation. Cette expérience confirme le résultat précédent obtenu avec une dose létale de 20 000 J/m². Par la suite, un régime chronique plus court a été testé, soit 5 irradiations de 75 J/m² (CLUV₅) au lieu des 15 irradiations constituant la CLUV. Le traitement a duré 2,5 jours au lieu de 7,5 jours, et a été suivi d'une dose létale de 20 000 J/m². Le résultat présenté en Figure 3, b est similaire aux résultats précédents. La CLUV₅, tout comme la CLUV, ne sensibilise pas les cellules à la mort induite par une irradiation létale d'UVB avec 37% de mortalité dans la condition CLUV+A et 32% dans celle NoUV+A. Ainsi, le pré-traitement des cellules NHDF par des irradiations chroniques n'a pas d'effet sur la sensibilité des NHDF à la mort précoce (Figure 2 et 3) et à la mort tardive [282].

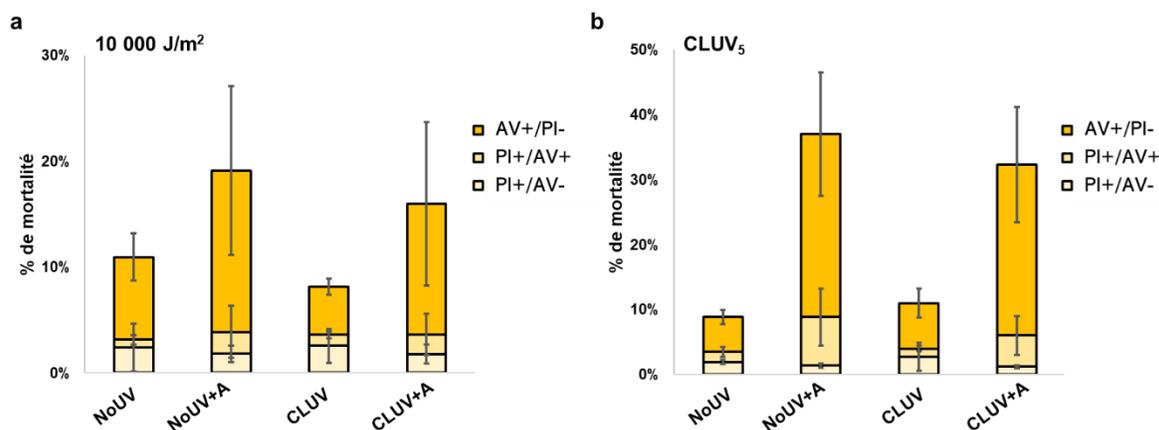


Figure 3 Mort cellulaire mesurée en FACS suivant de nouvelles conditions d'irradiation.

Les NHDF ont été prétraitées par des irradiations chroniques CLUV ou non (NoUV), une partie des cellules a été exposée à une dose létale aigüe d'UVB, soit les NoUV+A et les CLUV+A. Les contrôles NoUV et CLUV n'ont pas été exposés à cette dose létale. Les cellules ont été récoltées à 6h post irradiation aigüe et analysées par FACS par des marquages à l'iodure de propidium (PI) et Annexine V-FITC (AV). Les cellules vivantes sont doubles négatives, les cellules en voie de mort sont simples (PI+/AV- et AV+/PI-) ou doubles positives (PI+/AV+). (a) La CLUV utilisée est une CLUV standard de 15 irradiations chroniques de 75 J/m², tandis que la dose létale appliquée a été diminuée à 10 000 J/m². (b) La CLUV employée est une CLUV₅, soit de 5 irradiations chroniques au lieu des 15 standards, la dose létale appliquée est de 20 000 J/m². La proportion de cellules en voie de mort est la même avec ou sans prétraitement CLUV à 6h post-irradiation aigüe létale malgré une dose létale ou une durée du traitement CLUV diminuées. N=4.

3- Le pré-traitement CLUV n'induit pas de nécroptose suite à une dose létale d'UVB

Les NHDF exposées à des irradiations chroniques d'UVB ne sont pas moins, ni plus sensibles à la mort cellulaire induite par une dose létale d'UVB. Ce résultat est confirmé pour un régime chronique plus ou moins long (5 à 15 irradiations de 75 J/m^2), et pour une dose létale plus ou moins forte ($10\ 000$ et $20\ 000 \text{ J/m}^2$). Néanmoins, même si la sensibilité des cellules à la mort n'est pas modifiée par le régime d'irradiation, la voie de mort activée pourrait être différente selon le régime d'irradiation appliqué. Le transcrite de RIPK3 a été retrouvé augmenté après une stimulation CLUV [282]. RIPK3 est une protéine clé de la nécroptose, qui nécessite sa phosphorylation et celle de la protéine effectrice MLKL. De ce fait, la proportion de RIPK3 phosphorylé (RIPK3-P) et de MLKL phosphorylé (MLKL-P) ont été évaluées par Western Blot (Figure 4, a). Le résultat pour le contrôle sans pré-traitement CLUV, soit NoUV+A, a été présenté au chapitre 2 et sera ici comparé au traitement CLUV+A. Les proportions de MLKL-P sur MLKL totale (MLKL-P/MLKL) et de RIPK3-P sur RIPK3 totale (RIPK3-P/RIPK3) des conditions NoUV+A et CLUV+A ont été normalisées sur celles des cellules non-irradiées (NoUV) et traitées par la CLUV (CLUV) respectivement (Figure 4, b, c). Les résultats de MLKL-P / MLKL et de RIPK3-P / RIPK3 ont aussi été normalisés sur le contrôle NoUV pour les deux conditions NoUV+A et CLUV+A afin de s'assurer que la normalisation des résultats n'induit pas un biais dans la quantification (Figure 4, d, e). Dans tous les cas, la proportion de RIPK3 phosphorylée et de MLKL phosphorylée des cellules irradiées par une dose létale est similaire, avec ou sans pré-traitement CLUV, peu importe la normalisation effectuée. Ainsi la pré-stimulation CLUV ne semble pas sensibiliser les cellules à la nécroptose.

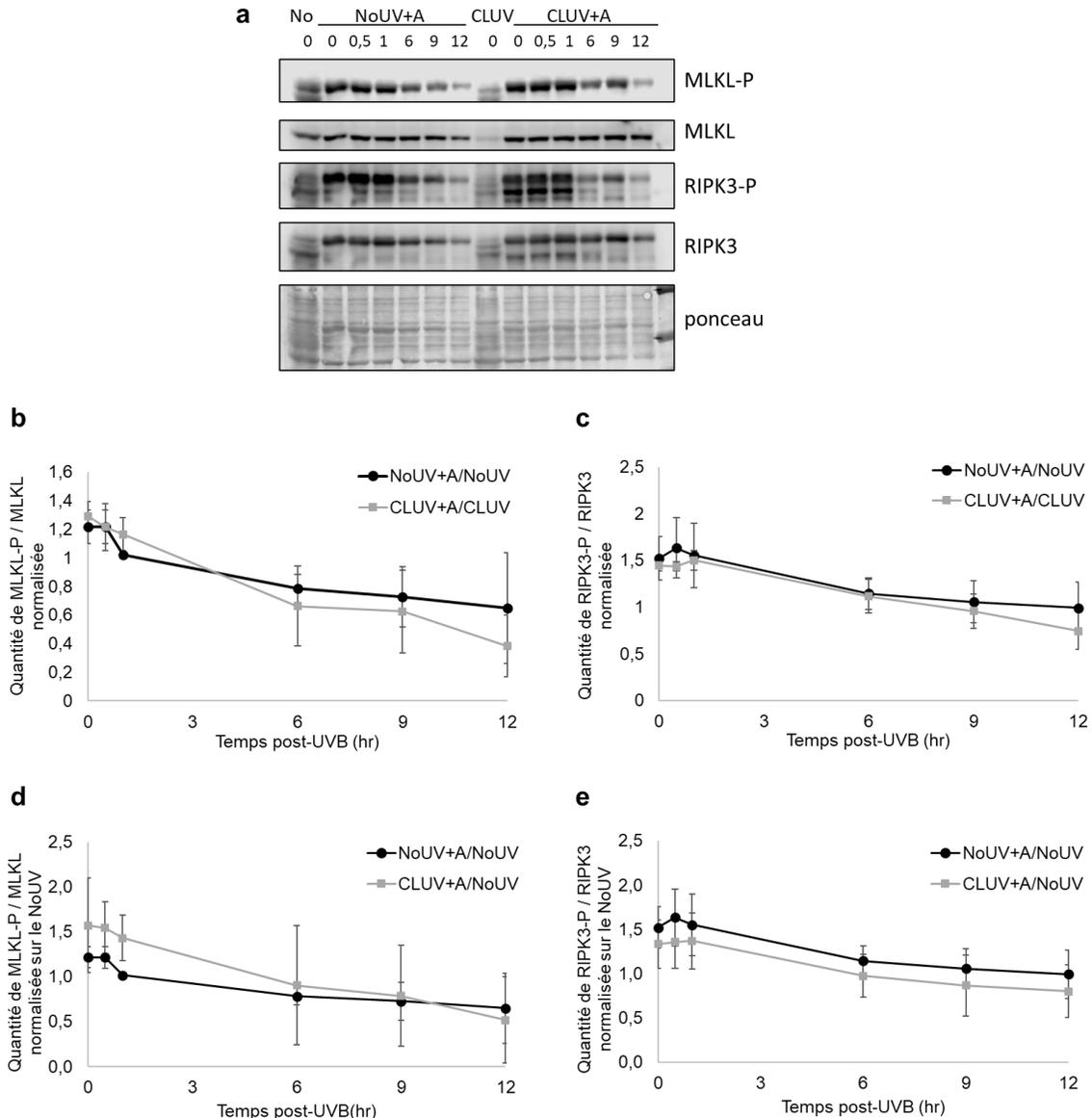


Figure 4 Analyse des niveaux de phosphorylation de MLKL et RIPK3 suite à un prétraitement CLUV.

Les NHDF ont été prétraitées par des irradiations chroniques CLUV ou non (NoUV). Une partie des cellules a été exposée à une dose létale aiguë d'UVB de 20 000 J/m², soit les NoUV+A et les CLUV+A, puis récoltées à différents temps post-irradiation (0, 0,5, 1, 6, 9 et 12h). Les contrôles NoUV (No) et CLUV n'ont pas été exposés à cette dose létale et ont été récoltés au temps 0h. (a) Les protéines cellulaires ont été analysées par Western Blot. MLKL-P, MLKL, RIPK3-P et RIPK3 ont été analysés. Le ponceau sert de contrôle de dépôt. Les quantifications de MLKL-P / MLKL (b) et de RIPK3-P / RIPK3 (c) sont présentées pour la condition NoUV+A normalisée sur la condition NoUV et pour la condition CLUV+A normalisée sur la condition CLUV. Les quantifications de MLKL-P / MLKL (d) et de RIPK3-P / RIPK3 (e) sont présentées pour la condition NoUV+A et la condition CLUV+A normalisées sur la condition NoUV. Peu importe la normalisation effectuée, les proportions de RIPK3-P et de MLKL-P sont similaires avec ou sans pré-traitement CLUV. N=4.

4- Les cellules meurent par apoptose suite à une dose létale d'UVB, avec ou sans pré-traitement CLUV.

Les cellules prétraitées ou non par des irradiations chroniques CLUV, ne meurent pas par nécroptose suite à une dose létale d'UVB. Nous avons vérifié que seule l'apoptose est activée dans les cellules prétraitées par la CLUV (CLUV+A) et les cellules non prétraitées (NoUV+A). Premièrement, le clivage de PARP1, une mesure de l'activation des caspases, a été comparé par Western Blot pour la condition NoUV+A et CLUV+A (Figure 5, a). Le clivage de PARP1 (89 kD) est rapporté sur PARP1 totale, correspondant à la somme de PARP1 non-clivé (116 kD) et clivé (89 kD). Aucune différence significative n'est mesurable entre les conditions CLUV+A et NoUV+A en ce qui concerne le clivage de PARP1 (Figure 5, b), bien qu'une tendance soit visible, avec une plus grande proportion de PARP1 clivé / PARP1 totale dans les cellules pré-stimulées par la CLUV. En effet, la proportion de PARP1 clivé est de 92 % dans la condition CLUV+A et de 73 % dans celle NoUV+A, 12h suivant l'irradiation létale (Figure 5, b). PARP1 clivé étant un produit des caspases lors de l'apoptose, l'activation des caspases semble donc être similaire dans les deux conditions d'irradiations. Par la suite, un inhibiteur d'apoptose, soit l'inhibiteur de caspases Q-VD-OPh, a été utilisé sur des cellules pré-stimulées ou non par la CLUV et exposées à une dose létale d'UVB. La mort cellulaire précoce a été évaluée en FACS, ainsi que la viabilité cellulaire par mesure de l'activité métabolique par essai MTS (Figure 5, c, d). Un résultat préliminaire obtenu dans une culture de NHDF montre que l'inhibiteur Q-VD-OPh empêche la mort des cellules prétraitées par la CLUV (CLUV+A) et des cellules non prétraitées (NoUV+A) en FACS (Figure 5, c). Ce résultat est confirmé par mesure de la viabilité cellulaire. Dans les quatre cultures de NHDF, Q-VD-OPh réduit la perte d'activité métabolique induite par une dose létale d'UVB, de façon similaire dans les cellules prétraitées ou non par la CLUV (Figure 5, d). L'inhibiteur Q-VD-OPh réduit de 10% et 15% la perte d'activité métabolique 6h post-UVB dans les NoUV+A et CLUV+A respectivement, et de 20% et 21 % à 24h post-UVB (Figure 5, d).

Ces résultats montrent que seule l'apoptose est induite par une irradiation létale d'UVB peu importe le régime d'irradiation antécédent. Ainsi, la voie apoptotique est la voie de mort prédominante dans les NHDF.

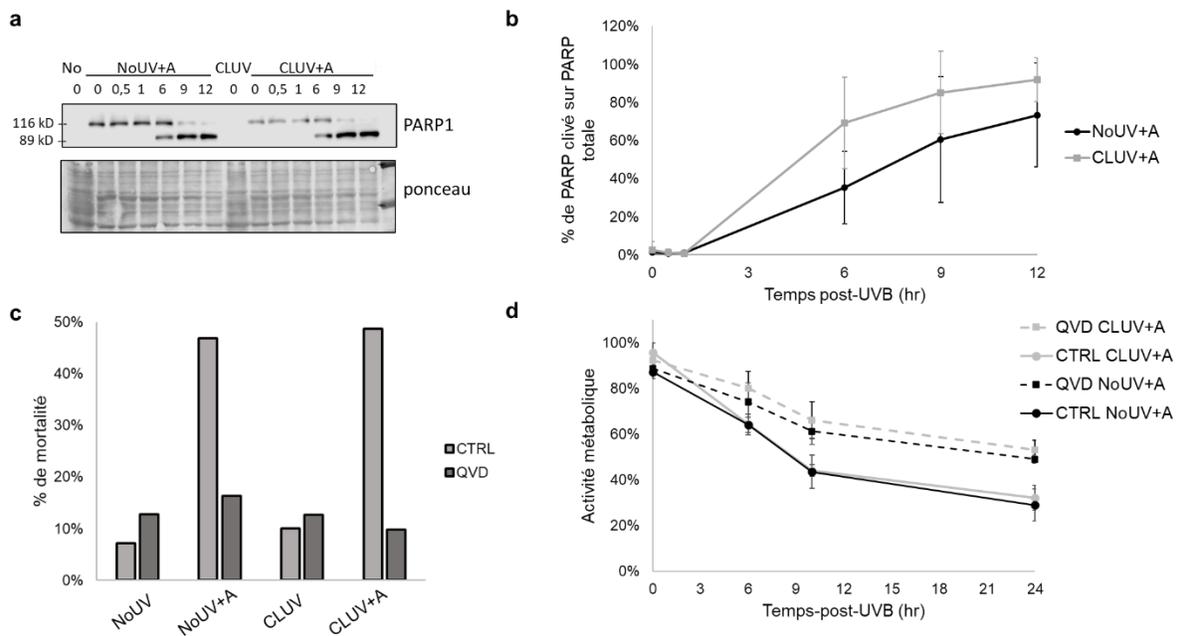


Figure 5 Activation des caspases par une irradiation létale d'UVB

Les NHDF ont été prétraitées par des irradiations chroniques CLUV ou non (NoUV). Une partie des cellules ont été exposées à une dose létale aiguë d'UVB de 20 000 J/m² en (a, b, c) et de 30 000 J/m² en (d), soit les NoUV+A et les CLUV+A. Les contrôles NoUV (No) et CLUV n'ont pas été exposés à cette dose létale. (a, b) Les cellules ont été récoltées à différents temps post-irradiation (0, 0,5, 1, 6, 9 et 12h) pour les conditions NoUV+A et CLUV+A, et à 0h pour les conditions contrôles (NoUV et CLUV). PARP1 a été analysés par Western Blot en (a). Le ponceau sert de contrôle de dépôt. La quantification de PARP1 clivé (89kD) sur PARP1 totale (bande à 116kD + bande à 89kD) est présentée pour la condition NoUV+A et la condition CLUV+A en (b), N=4. (c, d) Les cellules ont été traitées par l'inhibiteur de caspases Q-VD-OPh (QVD, 20 μM) ou par du milieu contrôle (CTRL) avant et après l'irradiation létale pour les quatre conditions (NoUV, NoUV+A, CLUV et CLUV+A). La mort cellulaire a été analysée 6h post-irradiation par FACS en (c). La mortalité correspond à la somme des marquages PI positifs et Annexine V positifs (simple et doubles positifs), N=1. L'activité métabolique a été mesurée à 0, 6, 12 et 24h post-irradiation en (d), N=4. Une irradiation létale d'UVB induit l'activation des caspases, soit l'apoptose dans des NHDF pré-stimulés ou non par la CLUV.

3.4 Conclusions

Le pré-traitement CLUV ne sensibilise, ni ne protège les NHDF de la mort induite par une dose aigue d'UVB

Des irradiations chroniques d'UVB (CLUV) sur les NHDF induisent une réponse adaptative pour la vitesse de réparation des dommages et l'avancement du cycle cellulaire comparé à des cellules non-stimulées par le traitement CLUV [282]. En revanche, la mort cellulaire tardive mesurée 24h post-irradiation létale en FACS n'était pas modifiée par un pré-traitement CLUV [282,283]. Ici, nous nous sommes intéressés à la mort cellulaire précoce (3-6h post-UVB) suivant une stimulation CLUV. Les résultats montrent que le pourcentage de cellules en voie de mort, marquées PI et/ou Annexine V positives, n'est pas modifiée par des irradiations chroniques. Une dose létale d'UVB déclenche la mort cellulaire en même proportion dans des cellules pré-stimulées ou non par la CLUV (Figure 2 et 3).

Le pré-traitement CLUV ne modifie pas la voie de mort cellulaire induite par une dose létale d'UVB

La proportion de mortalité n'étant pas changée par un pré-traitement d'irradiations chroniques, nous nous sommes intéressés aux voies de mort activées par une dose létale d'UVB suite à un traitement CLUV. En effet, le pourcentage de mort totale peut être identique, mais la ou les voie(s) de mort activée(s) différentes en fonction du régime d'irradiation. Les résultats des figures 4 et 5, mettent en évidence que le pré-traitement des NHDF par la CLUV n'a pas d'impact sur la voie de mort activée par une dose létale d'UVB. Notamment, les marqueurs de nécroptose (RIPK3-P/ RIPK3 et MLKL-P/ MLKL) ne sont pas augmentés par la pré-stimulation CLUV. La mesure indirecte de l'activité des caspases par le clivage de PARP1 et l'utilisation de l'inhibiteur de caspases Q-VD-OPh, indiquent que la mort induite par une dose létale d'UVB passe par l'activation des caspases et donc l'apoptose. Ainsi, seul l'apoptose semble être activée dans les NHDF par une irradiation aigüe d'UVB, et ce avec ou sans pré-traitement par des irradiations chroniques.

Les cellules n'ont pas de réponse de mort cellulaire adaptative suite à des irradiations chroniques non-létales d'UVB

Des irradiations chroniques des NHDF induisent la formation de dommages à l'ADN de type CPD résiduels. Le pré-traitement CLUV entraîne aussi une amélioration de la réparation des dommages induits par une dose non-létale d'UVB. De plus, le traitement CLUV entraîne un délai dans l'avancement du cycle cellulaire, ainsi qu'une augmentation du niveau protéique de p53 [282,283]. Ces résultats démontrent que les NHDF ont une réponse adaptative selon le régime d'irradiation UVB, en ce qui concerne la réparation des dommages et l'avancement du cycle cellulaire. La CLUV induisant des dommages résiduels et une augmentation protéique de p53, nous avons posé l'hypothèse d'une sensibilisation des cellules à la mort cellulaire par la CLUV. Or, les résultats obtenus dans le chapitre 3 démontre clairement que le régime d'irradiation chronique n'a pas d'impact sur la réponse de mort cellulaire suivant une dose létale d'UVB. Une explication possible est que les dommages résiduels induits par la CLUV sont non seulement tolérés, mais n'influent pas sur la balance mort-survie. En revanche, il n'est pas exclu qu'une exposition chronique plus longue puisse influencer la mort cellulaire des NHDF exposés à une dose létale d'UVB.

Pour conclure, le prétraitement CLUV ne sensibilise pas les cellules à la mort UV-induite et ne change pas la voie de mort empruntée par les NHDF suite à une dose létale d'UVB. Cette étude indique que la réponse cellulaire des NHDF à une dose létale d'UVB est l'apoptose, et ce malgré l'exposition préalable à un régime d'irradiation chronique. Les NHDF ne semblent donc pas avoir de réponse adaptative suite à des irradiations chroniques non-létales d'UVB, au regard de la mort induite par les rayons UVB.

Discussion

Les rayons UVB peuvent endommager les cellules, en particulier au niveau de l'ADN, en formant des dommages de types dimères de pyrimidines. Ces dommages activent des voies de signalisation menant à des réponses cellulaires, dont la réparation des dommages, l'arrêt du cycle cellulaire ou encore la mort cellulaire [205]. Les rayons UVB, comme les rayons lumineux au sens large, atteignent notre peau et nos yeux. Dans la peau, l'épiderme et le derme subissent des dommages induits par les UVR. Les fibroblastes sont la population cellulaire produisant la matrice extracellulaire caractéristique du derme, qui confère à la peau sa résistance mécanique et élastique. L'objectif de cette thèse était de mieux comprendre la réponse au stress génotoxique UVB des fibroblastes dermiques humains (NHDF) au regard de la mort cellulaire.

1. Résultats obtenus : un résumé

Ces travaux se sont intéressés à la caractérisation des voies de mort cellulaire induites par les rayons UVB dans les NHDF et à la découverte de nouveaux intervenants de la mort UV-induite. Enfin, la réponse des cellules à un régime d'irradiation chronique a été évaluée.

Cette étude permet d'affirmer qu'une dose létale d'UVB active la voie de mort cellulaire apoptotique dans les NHDF (Chapitre 1, 2, 3). Les travaux montrent que seule l'apoptose est mesurable suite à un stress UVB, tandis que les voies de nécroptose, ferroptose et parthanatos ne sont pas activées par les rayons UVB (Chapitre 1).

De plus, les rayons UVB induisent des changements métaboliques qui sont liés à la déplétion du pool de NAD⁺ cellulaire. L'activation de PARP1 (production de PAR) par les UVR est en partie responsable de la déplétion drastique du NAD⁺. Néanmoins l'activation de PARP n'est pas directement responsable de la mort des NHDF irradiés (Chapitre 1) [285].

Les publications concernant la mort cellulaire induite par les UVB dans les NHDF ont mis en évidence différents protagonistes, notamment les caspases, le facteur de transcription p53 et les protéines de la famille BCL2 (Introduction, section 5-2-2). Les travaux présentés ici révèlent deux nouveaux acteurs de la mort UV-induite, jusqu'à ce jour inconnus, soit la protéine kinase RIPK3 et la pseudo-kinase MLKL. Ces deux protéines ont des rôles opposés

dans la mort induite par les rayons UVB. RIPK3 protège les cellules de la mort UV-induite, tandis que MLKL sensibilise les NHDF à l'apoptose UV-induite. RIPK3 a principalement été étudiée dans la voie nécroptotique [289]. Néanmoins, la déplétion partielle de RIPK3 entraîne une augmentation de la mort UV-induite, mettant en évidence un nouveau rôle pour RIPK3 dans la survie cellulaire. De même, MLKL est principalement connue comme la protéine effectrice de la nécroptose. Cette étude montre que MLKL est impliquée dans la mort UV-induite, plus précisément dans l'apoptose, indépendamment de son activité nécroptotique. Ainsi, le chapitre 2 révèle des rôles singuliers pour RIPK3 et MLKL dans la mort cellulaire, qui ne sont pas reliés à la nécroptose, et dévoile aussi pour la première fois, la participation de RIPK3 et MLKL dans la mort induite par les rayons UVB.

Enfin, l'adaptabilité des cellules à un régime d'irradiation chroniques d'UVB (CLUV) a été évaluée dans le chapitre 3, toujours en lien avec la mort cellulaire. Les travaux précédents au sein du laboratoire ont démontré que les NHDF ont des réponses cellulaires différentes en fonction du régime d'irradiation employé, soit chronique vs unique, pour la réparation des dommages et l'avancement dans le cycle cellulaire [282]. Ces travaux indiquaient, en revanche, que la proportion de cellules mortes suite à une dose létale d'UVB, n'était pas modifiée par un pré-traitement CLUV, à 24h post-irradiation. Ici, ces résultats sont confirmés à des temps courts post-UVB, soit 3h et 6h suivant l'irradiation. En plus de montrer que la proportion de cellules en voie de mort est similaire avec ou sans pré-traitement chronique, l'étude révèle que la voie de mort cellulaire n'est pas modifiée par le pré-traitement d'irradiation chronique. Ainsi, les NHDF n'ont pas de réponse adaptative de mort cellulaire lorsqu'exposés à un régime d'irradiation chronique CLUV.

2. Caractérisation des voies de mort

La mort cellulaire étant le sujet central de cette thèse, il convient de discuter des différentes techniques de mesures disponibles.

a. Mesure de la viabilité cellulaire

La première façon de mesurer la mortalité est en fait la mesure de la viabilité cellulaire. Les deux paramètres sont inversement proportionnels, ainsi, la mesure de l'un est le reflet de l'autre.

Dans les chapitres précédents, nous avons utilisé le test MTS, un essai similaire au test MTT, qui permet de mesurer l'activité métabolique cellulaire. Plus précisément, les cellules viables transforment le MTT ou les composés de tetrazolium dans le cas du MTS, en formazan coloré dont l'absorbance est mesurée. Cette technique, qui mesure l'activité métabolique, comprenant l'activité mitochondriale, est généralement corrélée à la viabilité cellulaire [290]. Dans le cas des NHDF irradiés, l'activité métabolique diminue post-UVB, ce qui corrèle avec la perte de viabilité attendue. Néanmoins, l'utilisation d'inhibiteurs de PARP a mis en évidence que le lien de corrélation entre l'activité métabolique et la viabilité n'est pas toujours applicable (Chapitre 1). Il est important de garder à l'esprit qu'un traitement, ou un composé, peut affecter l'activité métabolique sans affecter la viabilité cellulaire, d'où l'utilité d'utiliser d'autres tests de viabilité ou mortalité.

Il existe d'autres tests de viabilité cellulaire, des essais s'appuyant sur la mesure de l'activité protéase des cellules viables, ou des essais mesurant la quantité d'ATP par la luciférase. Ces mesures sont aussi considérées proportionnelles à la viabilité cellulaire [290].

Ces techniques présentent l'avantage de pouvoir être utilisées en plaque 96 puits, permettant l'analyse de nombreuses conditions simultanément à coût relativement faible, et d'être reproductibles. Néanmoins, elles restent des mesures indirectes de la viabilité cellulaire.

La viabilité cellulaire peut aussi être quantifiée par proportion inverse de la mortalité cellulaire. Par exemple, la cytométrie en flux (FACS) et le marquage des cellules en voie de mort, permet de différencier la population viable de celle non-viable directement.

b. Mesure de la mortalité

La mort cellulaire peut être mesurée par différents marqueurs et différentes techniques. Les marqueurs qui pénètrent sélectivement les cellules perméables sont fréquemment utilisés. En effet, les cellules en voie de mort cellulaire sont connues pour avoir une plus grande perméabilité membranaire que les cellules viables.

Par exemple, le bleu de Trypan est très utilisé lors de comptage cellulaire à l'hémacytomètre pour marquer les cellules mortes. Le désavantage de cette technique est qu'elle ne permet ni de compter rapidement un grand nombre de cellules, ni un grand nombre de conditions et

qu'elle reste subjective à l'utilisateur (comptabilisation de débris vs cellules mortes) donc peu reproductible.

Il existe des techniques plus fiables et reproductibles, comme les agents fluorescents qui marquent l'ADN des cellules perméables et donc des cellules en voie de mort. Le test CellTOX utilisé au chapitre 1 et 2 en est un exemple. La fluorescence mesurée est proportionnelle aux nombres de cellules mortes. Bien entendu, il est important de vérifier ce lien de proportionnalité dans les conditions de l'expérience, et de vérifier que le marqueur est non-toxique pour les cellules. L'avantage d'utiliser les marqueurs d'ADN fluorescents est qu'ils peuvent être mesurés par fluorimétrie ou en cytométrie de flux (FACS). Le fluorimètre permet de réaliser des essais en plaques 96 puits et de mesurer de nombreuses conditions simultanément. Le CellTOX est un essai de choix, car non-toxique pour les cellules. Il peut donc être utilisé pour des mesures à différents temps ou pour une mesure unique. Il peut aussi être combiné à des marqueurs de viabilité cellulaire, comme le MTS qui se mesure par absorbance, mais qui ne peut être utilisé que pour la mesure à un point (endpoint). Il existent d'autres marqueurs commerciaux revus en [291].

Pour finir, le FACS est aussi un instrument souvent employé car il permet la mesure de différents marqueurs fluorescents, pouvant être des anticorps. Pour mesurer la mort cellulaire, l'iodure de propidium (PI) et l'annexine-V couplée au FITC sont des marqueurs fréquemment utilisés. Le PI est un agent intercalant qui se fixe à l'ADN des cellules perméables et qui émet une fluorescence augmentée lorsqu'il s'intercale dans l'ADN (Ex/Em : 535/617). Le 7-Aminoactinomycine D (7-AAD) peut remplacer le PI. L'annexine V est une molécule qui se lie aux phosphatidylsérines. Les phospholipides phosphatidylsérines se trouvent dans la membrane plasmique, côté interne des cellules viables, et sont exposés à l'extérieur des cellules en voie de mort (selon la voie de mort). L'annexine-V est conjuguée au FITC pour la mesure de la fluorescence (Ex/Em : 494/518) [292,293]. Le FACS permet donc de mesurer simultanément deux marqueurs de mort cellulaire ou plus. Néanmoins, il est nécessaire d'avoir de bons contrôles pour évaluer correctement les compensations nécessaires (corrections) car les spectres de fluorescence des marqueurs peuvent se superposer. La technique nécessite donc de l'optimisation et la connaissance de l'appareil.

c. Différencier les voies de mort programmée

Différentes techniques permettant de mesurer la viabilité ou la mortalité cellulaire ont été présentées. Le test MTS, l'essai CellTOX et le FACS combiné au marquage annexine V / PI ont été utilisés dans cette thèse. Néanmoins, ces techniques ne permettent pas seules de distinguer directement les voies de mort cellulaire activées.

En effet, si le FACS avec le marquage PI/Annexine V est largement utilisé pour observer l'apoptose, cette utilisation est remise en question car d'autres voies que l'apoptose induisent le déplacement (switch) de la phosphatidylsérine vers l'extérieur de la cellule, notamment la nécroptose [294]. Il semble donc nécessaire d'utiliser d'autres marqueurs pour discriminer l'apoptose des voies non-apoptotiques.

L'utilisation d'inhibiteurs est une technique rapide, facile et qui semble efficace pour discriminer les voies de mort. Il faut tout de même considérer que les inhibiteurs pharmacologiques peuvent être plus ou moins efficaces, toxiques et peuvent avoir des effets « off-target », soit sur des cibles non-voulues. Les nouvelles générations d'inhibiteurs sont généralement plus spécifiques. Il existe de nombreux inhibiteurs de PARP, plus ou moins spécifique à PARP1. Le 3-aminobenzamine (3-ABA) est, par exemple, un inhibiteur général de première génération qui, pour être efficace, est utilisé en plus grande quantité comparé à l'inhibiteur ABT-888 (veliparib), de troisième génération et reconnu comme plus spécifique [295]. De même, l'inhibiteur de RIPK1 Necrostatin-1s est un dérivé plus spécifique de la génération précédente Necrostatin-1 [288,296]. Malheureusement, nous ne connaissons pas toujours le mécanisme d'action de certains inhibiteurs, qui restent donc à caractériser.

La déplétion partielle ou totale des protéines clés pour une voie spécifique peut aussi être envisagée. L'utilisation de petits ARN interférents (siARN, shARN) ou l'édition du génome (CRISPR) permettent de bloquer une voie particulière par déplétion d'une ou plusieurs protéines. Néanmoins, la mise au point de la transfection, la cytotoxicité de la déplétion et les potentiels effets off-target doivent être pris en compte. Évidemment, il est d'abord nécessaire de connaître les protéines ou gènes spécifiques de la voie ciblée. Dans les travaux présentés au chapitre 2, RIPK3 et MLKL ont été partiellement déplétées afin d'évaluer leur rôle dans la mort UV-induite. Par la suite, l'utilisation d'inhibiteurs de nécroptose ont permis

de démontrer que la nécroptose n'est pas activée par les UVB et que la fonction de RIPK3 et MLKL dans la mort UV-induite est indépendante de leur activité nécroptotique.

L'observation des modifications protéiques par les techniques d'immunomarquages de types Western Blot ou immunofluorescence permet aussi de distinguer différentes voies de mort cellulaire [139]. Par exemple la parthanatos est souvent liée à la translocation d'AIF de la mitochondrie au noyau, qui peut être mesurée par Western Blot ou par immunofluorescence en microscopie. La nécroptose se caractérise par la phosphorylation de RIPK3 et de MLKL et la formation du nécrosome, mesurable en Western Blot. De même, l'apoptose qui se caractérise par l'activation des caspases et le clivage de leurs cibles, comme PARP1, est observable par ces techniques. Au sein des trois chapitres présentés, les Western Blot sont utilisés pour infirmer l'activation de la nécroptose et de la parthanatos suite à une exposition UVB dans les NHDF. Le clivage de PARP1 par les caspases a aussi été observé dans le chapitre 2 et 3. L'analyse de protéines spécifiques et de leurs modifications permet de vérifier la présence de changements liés à l'activation des voies de mort cellulaire, mais peut être difficile à mettre en place. Notamment, les anticorps ne sont pas toujours disponibles ou efficaces. Ici, plusieurs anticorps liant RIPK3 ont été testés mais aucun n'a été totalement convaincant, d'ailleurs plusieurs bandes apparaissent autour du poids moléculaire attendu (57kD), laissant planer le doute sur l'origine de ces bandes (bandes aspécifiques, modifications post-traductionnelles, différents transcrits...). En revanche, les autres anticorps évalués en Western Blot étaient assez spécifiques. La disponibilité des outils pour observer les protéines impliquées dans la mort cellulaire est donc un enjeu majeur à l'étude des voies impliquées.

Enfin, il existe des marquages spécifiques à l'apoptose, car elle est la voie de signalisation la plus étudiée et bénéficie donc d'un plus grand nombre d'outils disponibles. L'activation des caspases peut être mesurée de différentes façons, dont par Western Blot, mais aussi avec des marqueurs fluorescents.

Pour conclure, il est utile d'utiliser différentes techniques pour confirmer la voie de mort cellulaire activée par un traitement, tout en gardant à l'esprit que les voies de signalisations partagent des effecteurs et des connections moléculaires.

Ainsi, suite à cette thèse, et avec les connaissances actuelles [139], nous considérons que :

- l'apoptose se caractérise par l'activation des caspases et peut être quantifiée par la mesure de cette activation, directe ou indirecte, et confirmée par l'utilisation d'inhibiteurs de caspases tels que Q-VD-OPh.

- la nécroptose se caractérise par les niveaux de phosphorylation de RIPK1 et/ou RIPK3 et de MLKL et peut être caractérisée à l'aide des inhibiteurs Necrostatins et Necrosulfonamide.

- la parthanatos correspond à la suractivation de PARP1, la surproduction de PAR, et dans certains cas, la translocation de AIF de la mitochondrie vers le noyau. La parthanatos peut être évaluée par utilisation d'inhibiteurs de PARP, en conjonction avec un test de mortalité/viabilité non lié au test d'activité métabolique.

d. Une définition de la mort cellulaire régulée

Chaque test, que ce soit de viabilité ou mortalité, s'appuie sur la quantification d'un paramètre (activité métabolique, quantité d'ATP) ou d'une caractéristique (perméabilité membranaire, externalisation de la phosphatidylsérine). Mais comment savoir quel paramètre est le plus représentatif de la vie ou de la mort cellulaire, ou encore si ces marqueurs sont vraiment représentatifs de la viabilité ou de la mortalité ?

En effet, si ces paramètres corréleraient généralement avec la viabilité/mortalité cellulaire, ce n'est pas toujours le cas, comme nous l'avons vu avec l'inhibiteur de PARP combiné au test MTS (Chapitre 1). De plus, de nouvelles publications montrent que le processus de mort cellulaire peut être arrêté et que des cellules en voie de mort cellulaire peuvent finalement survivre [297]. Les voies de signalisation, particulièrement de mort, sont donc bien plus modulables qu'initialement pensé.

La mort cellulaire régulée pourrait être définie comme un processus flexible caractérisé par un ensemble d'événements intra ou extra-cellulaires menant à la perte des fonctionnalités cellulaires, pouvant conduire à la dégradation des composants cellulaires.

Étant donné qu'il n'existe pas de mesure parfaite, ni unique de la viabilité ou de la mortalité cellulaire, il semble judicieux d'utiliser plusieurs marqueurs et techniques pour s'assurer du résultat.

3. Mort des NHDF par apoptose UV-induite et temporalité

L'apoptose est la voie de mort cellulaire dépendante des caspases, qui conduit à la dégradation de différents composés cellulaires, dont l'ADN [148]. Il est connu que les UVR, notamment les UVB, induisent l'activation des caspases et donc la mort apoptotique. De plus, les UVR induisent l'activation des protéines de la famille BCL-2, responsables de l'ouverture du pore externe mitochondriale et du relargage de différentes molécules qui mènent à l'activation des caspases (Introduction, section 5-2).

a. Mort précoce et mort tardive

Dans cette étude, seule l'apoptose est mesurable suivant une dose létale d'UVB dans les NHDF, avec ou sans pré-traitement chronique. Aucune voie de compensation parmi celles analysées n'a pu être mesurée malgré l'inhibition de l'apoptose. La nécroptose, la parthanatos et la ferroptose ont été exclues dans notre modèle.

Pourtant, des cellules marquées par PI et/ou Annexine V sont mesurées dès 3-6h post-irradiation en FACS, tandis que l'apoptose est généralement mesurée par ces marqueurs à 16-24h suivant le traitement [93,191,198,227]. Une perte d'activité métabolique (test MTS) est observée dès 3-6h post-exposition UVB, ainsi qu'une augmentation du marquage en CellTOX, ce qui concorde avec une augmentation de la mort cellulaire.

On retrouve donc *in vitro*, une portion de la population cellulaire qui subit une mort « précoce », avec un marquage rapide des cellules, et une population cellulaire qui subit une mort « tardive » avec un marquage qui apparaît plus tard suivant l'irradiation. Pourtant, l'ensemble de ces cellules meurent par apoptose. On peut donc se demander pourquoi la mort UV-induite est rapide dans une partie de la population cellulaire et lente dans l'autre.

b. Hypothèses

Tout d'abord, dans les différents chapitres, les cellules ont été irradiées avec une dose létale allant de 5 000 J/m² à 30 000 J/m². Des essais d'activité métabolique (test MTS) à 5 000, 15 000 et 30 000 J/m² ont été effectués dans le chapitre 1 (données supplémentaires, Figure S1), montrant que la perte de viabilité est proportionnelle à la dose d'UVB employée pour

un même temps. Ainsi, soit une plus grande proportion de cellules meurt avec une dose croissante, et/ou la mort cellulaire est plus rapide avec une dose croissante d'UVB.

Au cours des expériences, nous avons pu observer qu'une dose minimale (au-dessus de 5 000 J/m² pour des cellules confluentes) est nécessaire pour déclencher la mort des NHDF. De plus, par observation au microscope, il semble que les cellules meurent plus rapidement avec une dose létale plus haute et plus lentement avec une dose létale plus faible. Néanmoins, ces observations préliminaires devront être confirmées afin de valider l'hypothèse que la vitesse de mort est proportionnelle à la dose d'UVB.

Une explication au fait que l'on observe de la mort précoce et tardive apoptotique, pourrait être que toutes les cellules, dans un même pétri, ne reçoivent pas exactement la même dose d'UVB. Par exemple, les cellules peuvent se chevaucher, ou encore se trouvent à différentes positions dans le puit, ce qui pourrait influencer la dose reçue.

De même, bien que les cellules soient placées à confluence lors des expériences, leur état d'avancement dans le cycle cellulaire (phase G1, S ou G2/M) pourrait entraîner une différence dans la vitesse d'activation de l'apoptose. Tout comme le rôle d'ATR est dépendant du stade des cellules dans le cycle cellulaire [179], l'activation de l'apoptose pourrait s'en trouver affectée.

Une autre hypothèse est que la disponibilité des protéines impliquées dans l'apoptose varie d'une cellule à l'autre, pouvant ainsi jouer sur la vitesse à laquelle la cellule active les différents effecteurs de mort cellulaire. Les cellules communiquent aussi entre elles et l'échange de signaux pourrait, soit déclencher l'apoptose plus rapidement dans certaines cellules, ou encore activer l'apoptose des cellules adjacentes aux cellules mourantes [298].

Enfin, la différence dans la vitesse de mort pourrait être liée à l'hétérogénéité des fibroblastes provenant d'un individu. En effet, il existe des fibroblastes dermiques provenant de la couche papillaire et des fibroblastes réticulaires. Certaines caractéristiques pourraient être conservées en culture et induire une différence dans l'activation de l'apoptose.

Il est probable que plusieurs de ces paramètres interviennent et jouent sur la vitesse à laquelle les marqueurs de mort sont visibles.

c. Modèle cellulaire : les NHDF et les UVB

Dans ces travaux, des cultures primaires de NHDF ont été utilisées et choisies pour différentes raisons. Premièrement, pour des considérations techniques, puisque les NHDF constituent un modèle simple à utiliser qui peut être gardé à confluence durant plusieurs jours, voire semaines et donc, qui est utilisable pour l'étude des irradiations chroniques. De plus, les NHDF sont la population majeure du derme. L'étude de leur réponse face à un stress génotoxique est primordiale dans la compréhension de la réponse globale de la peau. En effet, les NHDF ont un rôle dans l'homéostasie de la peau mais aussi dans la communication entre le derme et l'épiderme de manière directe (production de cytokines et de facteurs de croissance...) et indirecte (par des changements dans la matrice extracellulaire) [17,23]. Ce modèle, utilisé auparavant dans le laboratoire, permet aussi de comparer les résultats précédemment obtenus. Enfin, l'utilisation de cellules primaires non-transformées a été privilégiée car la réponse cellulaire à la mort pourrait être proche de la réponse physiologique. En comparaison, les cellules kératinocytes HaCaT peuvent être utilisées pour des études chroniques, mais contiennent des mutations du gène p53 [213], un gène très important dans la réponse au stress cellulaire et notamment dans l'apoptose. Il y a donc un avantage à utiliser des cultures primaires comparativement aux cellules transformées qui pourraient avoir une réponse plus proche de cellules-précancéreuses en termes de mort cellulaire.

Enfin, les UVB ont été utilisés lors de cette thèse, puisque contrairement aux UVC, une portion des UVB pénètre dans l'atmosphère [299]. Afin de mimer les UVR se rendant à la surface terrestre, un filtre est utilisé dans nos expériences afin de filtrer toutes les longueurs d'onde sous 290 nm. Ce filtre élimine la composante UVC et une partie des UVB. Il est à noter que les lampes UVB utilisées présentent un pic d'émission à 300 nm et possèdent donc une composante UVA. Comparativement aux UVA, les UVB induisent majoritairement des dommages à l'ADN et peu de dommages oxydatifs [38,56]. Ainsi, dans le modèle des NHDF irradiés par UVB, on suppose que la majorité du signal de mort provient des dommages à l'ADN, bien que l'hypothèse reste à vérifier.

4. MLKL et RIPK3, nouveaux acteurs, nouvelles avenues

L'apoptose est la seule voie activée mesurable dans les NHDF exposés aux UVB (Chapitre 1). Néanmoins, à l'exception des caspases, de p53 et de certains membres de la famille BCL-2, peu d'acteurs de l'apoptose UV-induite sont connus. Dans le chapitre 2, les résultats mettent en évidence deux nouveaux intervenants dans la mort induite par les UVB, soit RIPK3 et MLKL.

Bien que ces deux protéines soient connues pour participer à la nécroptose, les travaux des trois chapitres démontrent que la nécroptose n'est pas activée par les UVB dans les NHDF *in-vitro*. Ainsi, RIPK3 et MLKL pourraient réguler la mort cellulaire induite par les rayons UVB, indépendamment de leur activité nécroptotique (Chapitre 2).

Plus étonnant encore, l'inhibition de RIPK3 entraîne une augmentation de la mort cellulaire post-UVB, suggérant un rôle protecteur de RIPK3. RIPK3 a déjà été associée aux voies d'apoptose ou de nécroptose, mais n'est généralement pas accolée à la survie cellulaire. De récentes publications s'intéressent aux rôles non-nécroptotiques de la kinase RIPK3. Cette kinase module la réponse inflammatoire, notamment la production de cytokines impliquées dans la réparation des tissus dans des cellules immunitaires [300,301]. RIPK3 interagit aussi avec la voie NFκB-AKT dans la fibrose rénale [302]. L'interaction de RIPK3 avec la voie de signalisation NFκB-AKT est une piste à envisager pour expliquer la mécanistique derrière le rôle protecteur de RIPK3 post-UVB. RIPK3 pourrait interagir via son domaine RHIM, soit le domaine d'homologie entre les protéines de la famille RIPK, ou via son activité kinase. RIPK3 est capable d'interagir avec RIPK1 par le domaine RHIM [151]. Ainsi l'interaction de RIPK1 et RIPK3 pourrait aussi être évaluée dans les NHDF irradiées. Notamment, les résultats du chapitre 2 démontrent que RIPK3 n'est pas directement impliquée dans l'apoptose UV-induite et ne modifie pas l'activité des caspases. Son rôle dans la survie cellulaire passe donc par un mécanisme indépendant des caspases. RIPK3 pourrait ainsi jouer sur les voies de survie cellulaire directement (par la voie NFκB-AKT par exemple, ou via RIPK1), ou indirectement, en jouant sur la réparation des dommages ou l'avancement des cellules dans le cycle cellulaire. Néanmoins, le traitement des NHDF par les siRIPK3 (#1 et #3) dans le chapitre 2, semble indiquer que RIPK3 ne serait pas impliquée dans le cycle

cellulaire (Figure S1, chapitre 2). Ces résultats n'excluent pas une fonction possible de RIPK3 dans l'arrêt du cycle cellulaire post-UVB. Enfin, RIPK3 pourrait influencer la réparation des dommages à l'ADN induits par les UVB. Cependant, l'utilisation d'une dose létale laisse potentiellement peu de temps à la réparation des dommages. Le mécanisme par lequel RIPK3 influence la survie cellulaire reste donc à décrypter.

La participation de MLKL dans la mort UV-induite est étudiée au chapitre 2. L'inhibition de MLKL entraîne une diminution de la mort induite par les UVB et une diminution de l'activité des caspases (clivage de PARP1). Ainsi, la pseudo-kinase MLKL sensibilise les NHDF à l'apoptose UV-induite. À notre connaissance, une seule publication de 2018 relie directement MLKL à l'apoptose. Leur étude démontre une activation de MLKL et de la voie PERK-eIF2 α suite à un stress causé par un agent pharmacologique appelé Chelerythrine (CHE) dans des cellules tumorales de poumons. Dans leur modèle, la molécule CHE induit la production de ROS, puis la translocation de MLKL au noyau et l'activation de la réponse au stress du réticulum endoplasmique (PERK- eIF2 α), menant à l'apoptose. Dans cette étude MLKL et PERK- eIF2 α se régulent mutuellement et sont activées par les ROS [303]. Même si les ROS ne semblent pas avoir d'influence sur la viabilité cellulaire post-UVB (mesuré par MTS au chapitre 1) dans les NHDF, le lien entre MLKL et le stress oxydatif est une avenue à explorer pour découvrir la mécanistique liant MLKL à la mort apoptotique UV-induite. MLKL serait aussi un acteur du trafic vésiculaire endosomal et de la génération de vésicules extracellulaires [304,305]. Plusieurs avenues sont envisageables, soit l'étude du lien entre MLKL et le stress oxydatif, ou bien le rôle de MLKL dans la signalisation extracellulaire liée à la production de vésicules. Dans le second cas, la première étape serait l'analyse des vésicules extracellulaires produites par les NHDF post-UVB, puis le rôle de ces vésicules sur la réponse cellulaire au stress UVB.

Pour finir, il sera intéressant d'étudier le rôle de RIPK3 et de MLKL dans les autres cellules de la peau, notamment les cellules impliquées dans les cancers de peau, soit les kératinocytes et les mélanocytes (Introduction, section 6-3). La question demeure à savoir si ces deux protéines sont impliquées dans la mort UV-induite d'autres types cellulaires, et si elles ont un rôle dans la nécroptose, l'apoptose ou la survie post-irradiation UVB dans les kératinocytes et les mélanocytes.

5. Choix des doses UVB employées sur les NHDF

a. Considérations techniques

Les NHDF sont irradiés par différentes doses létales d'UVB. En effet, afin d'observer l'apoptose induite par les UVR dans le chapitre 2, une dose de 10 000 J/m² a été employée, tandis que 20 000 ou 30 000 J/m² ont été utilisés pour l'observation d'autres voies potentielles (nécroptose, ferroptose et parthanatos) dans le chapitre 1, le chapitre 2 partie 3-4 et le chapitre 3. Ces doses ont été choisies selon plusieurs paramètres. Premièrement, l'apoptose est un processus considéré comme long, et qui est généralement observé à 16h ou 24h post-irradiation. Au contraire, nous avons posé l'hypothèse qu'une voie supplémentaire, non-apoptotique, pouvait être activée à des temps courts. C'est pourquoi des doses fortes de 20 000 et 30 000 J/m² ont été employées pour observer une potentielle activation de la nécroptose, ferroptose ou parthanatos à courts termes. Ces doses relativement élevées permettent d'obtenir une proportion de cellules mortes suffisante pour être mesurable à 3 et 6h post-irradiation. Dans ce contexte, l'apoptose était attendue après 12h post-irradiation et est finalement visible dès 3-6h post-UVB puisque seule l'apoptose est mesurable (Chapitre 1).

De plus, l'utilisation de 10 000 J/m² d'UVB était suffisante pour observer la mort cellulaire apoptotique, dans le chapitre 2, que ce soit à 16h ou 24h post-UVB. En fait, la transfection de siARN se fait sur des NHDF non-confluents lors de l'ensemencement (jour 1), soit une transfection appelée reverse, une seconde transfection est effectuée pour les siRIPK3 le jour suivant sur cellules adhérentes, cette transfection est dite forward. Les cellules sont irradiées au jour 4 et au jour 6 pour les siMLKL et les siRIPK3 respectivement. Ainsi les cellules se trouvent juste à confluence lors de l'irradiation UVB. Une dose plus forte d'UVB, aurait pu induire une trop grande mortalité dans les cellules transfectées et être non-mesurable à 16h ou 24h post-UVB. En comparaison, les essais utilisant des inhibiteurs peuvent se faire sur cellules confluentes. Ainsi dans le chapitre 1, le chapitre 2 partie 3-4, et le chapitre 3, les cellules ont été ensemencées et cultivées pendant 9 à 13 jours, soit 7 à 9 jours de confluence. Une dose plus importante a pu être employée, tout en ayant suffisamment de cellules pour mesurer la mort cellulaire à 3h, 6h, 12h et 24h post-irradiation.

Enfin les cellules placées en plaques 6 puits ou 12 puits reçoivent potentiellement plus d'UVB que les cellules en 96 puits car la hauteur des puits est différente. Les plaques sont conçues en plastique, qui empêche les UVR de passer. La circonférence du puits peut donc jouer sur la dose d'UVB finale pouvant atteindre les cellules en moyenne. Ainsi dans le chapitre 1 et 3, nous avons choisi d'irradier les cellules cultivées en plaques 6 et 12 puits à $20\ 000\ \text{J/m}^2$, tandis que les cellules cultivées en plaques 96 puits ont été exposées à $30\ 000\ \text{J/m}^2$.

Pour résumer, lors de l'utilisation de siARN, les cellules sont irradiées à $10\ 000\ \text{J/m}^2$ d'UVB et l'apoptose est observée à 16h et 24h post-UVB. Lors de l'utilisation d'inhibiteurs ou plus largement lorsque les cellules sont restées plus de 7 jours à confluence une dose de $20\ 000\ \text{J/m}^2$ est utilisée sur les cellules en plaques 6 ou 12 puits, tandis qu'une dose de $30\ 000\ \text{J/m}^2$ est employée pour les cellules en plaque 96 puits. La mort cellulaire a alors été mesurée entre 0 et 24h post-UVB.

Au vu des résultats obtenus et comme discuté précédemment, nous pouvons supposer que la dose d'UVB joue sur la vitesse à laquelle les cellules meurent, et non le type de mort cellulaire activé. Cela reste à confirmer par une étude comparative de différentes doses d'UVB et la mesure de la mort à court et long terme.

b. Doses physiologiques ?

In vitro, les cellules NHDF sont irradiées à différentes doses d'UVB selon la réponse étudiée, soit une dose létale pour l'étude de la mort cellulaire (au-dessus de $5\ 000\ \text{J/m}^2$ ici), une dose sub-létale pour l'étude des mécanismes de réparation ($400\ \text{J/m}^2$ d'UVB au sein du laboratoire [282,283,306,307]), ou encore l'application de doses chroniques faibles comme avec la CLUV.

Néanmoins, à quoi correspondent ces doses en termes d'irradiation solaire ? Il est en fait difficile de mesurer la dose solaire d'UVB que reçoit une personne, car cela dépend de la météo, de la couverture nuageuse, de l'altitude, de la latitude, des habitudes de vie, etc. Diffey a développé un modèle de prédiction de l'irradiance solaire en fonction de la latitude, du jour

et du mois de l'année, et de l'heure [4], qui permet de se rapprocher de la quantité d'UVB reçu selon la période de l'année et le lieu de vie.

Par exemple, à Bordeaux (France) qui est à une latitude de 44.8° N, le 1^{er} juillet à midi, le modèle prédit une irradiance UVB de 2.94 W/m² (avec 1W = 1J/s), soit 0.3% de l'irradiance solaire totale et 5.1% des UVR. Ainsi, à midi à Bordeaux le 1^{er} juillet, une personne est irradiée par 2,94 J/m² chaque seconde. La dose de 10 000 J/m² utilisé en laboratoire, correspond donc à 3 401,4 s, soit 56.7 minutes d'exposition solaire le 1^{er} juillet à Bordeaux à midi. En revanche, l'irradiance le 1^{er} janvier à midi à Bordeaux est de 0,34 W/m² d'UVB, il faudra plus de 8h pour atteindre l'équivalent des 10 000 J/m² à cette irradiance.

Équivalence	Dose (J/m ²)	Temps d'irradiation			Commentaires
		Seconde (s)	Minute (min)	Heure (h)	
Rayons solaires	2,94	1			Lieu = Bordeaux 1er juillet à midi
Lampes UVB	10 000	3401,36	56,7	0,95	10 000 J/m ² équivaut à 0.95 h au soleil le 1 ^{er} juillet à midi
	20 000	6802,72	113,4	1,89	20 000 J/m ² équivaut à 1.89 h au soleil le 1 ^{er} juillet à midi
	30 000	10204,08	170,1	2,83	30 000 J/m ² équivaut à 2.83 h au soleil le 1 ^{er} juillet à midi
	75	25,51	0,4	0,01	75 J/m ² équivaut à 25 s au soleil le 1 ^{er} juillet à midi
	400	136,05	2,3	0,04	400 J/m ² équivaut à 2.3 min au soleil le 1 ^{er} juillet à midi
Rayons solaires	0,34	1			1er janvier à midi
Lampes UVB	10 000	29411,76	490,2	8,17	10 000 J/m ² équivaut à 8.17 h au soleil le 1 ^{er} janvier à midi
	20 000	58823,53	980,4	16,34	20 000 J/m ² équivaut à 16.3 h au soleil le 1 ^{er} janvier à midi
	30 000	88235,29	1470,6	24,51	30 000 J/m ² équivaut à 24.5 h au soleil le 1 ^{er} janvier à midi
	75	220,59	3,7	0,06	75 J/m ² équivaut à 3.7 min au soleil le 1 ^{er} janvier à midi
	400	1176,47	19,6	0,33	400 J/m ² équivaut à 19.6 min au soleil le 1 ^{er} janvier à midi

Tableau 2 Équivalence entre l'irradiance solaire et les doses utilisées en laboratoire.

Le modèle de Diffey prévoit une irradiance de 2.94 W/m² d'UVB le 1^{er} juillet à midi (rose) et une irradiance de 0.34 W/m² d'UVB le 1^{er} janvier à midi (vert) à Bordeaux, France. La durée d'exposition théorique solaire correspondante aux doses utilisées en laboratoire de 10 000, 20 000, 30 000, 75 et 400 J/m² est calculée en fonction des deux irradiances et est exprimée en seconde, minute et heure.

Ainsi la dose d'UVB reçue dépendra de nombreux facteurs, néanmoins il est peu probable de recevoir une dose aussi élevée que $10\,000\text{ J/m}^2$ (ou plus) en une exposition en considérant que la peau est généralement protégée par des vêtements et/ou de la crème solaire, mais aussi que cette dose sera largement bloquée par l'épiderme. Le derme ne devrait recevoir qu'une fraction d'UVB lors d'exposition modérée au soleil. En effet, moins de 10% des UVB atteignant la peau sont transmis au derme [204]. Pour une épaisseur de peau (épiderme-derme) de $300\ \mu\text{m}$, moins d'1% des UVB sont transmis [308]. Ainsi, considérons une transmission des UVB de 2% dans le derme : afin d'obtenir une dose transmise de $10\,000\text{ J/m}^2$ d'UVB dans le derme, il faudrait une exposition de la peau de $500\,000\text{ J/m}^2$ d'UVB. Autrement dit, pour une irradiance UVB de $2,94\text{ W/m}^2$, la dose de $500\,000\text{ J/m}^2$ correspond à 47 h d'exposition (équivalent à Bordeaux, le 1^{er} juillet à midi). Pour une irradiance plus faible de $0,34\text{ W/m}^2$, l'exposition nécessaire serait de plus de 400 h (équivalent à Bordeaux, le 1^{er} janvier à midi). Ainsi, les doses létales utilisées en laboratoire sur les NHDF sont bien plus élevées que les doses physiologiques reçues effectivement dans le derme.

Les dangers pour la peau sont l'exposition prolongée au soleil sans protection aux UVR (mauvaise application ou pas d'application de crème solaire, port de chapeau et de lunette négligé...), comme cela peut être le cas à la plage, ou encore l'exposition de plaies qui pourraient réduire l'épaisseur de l'épiderme. Les personnes à la peau blanche sont les plus à risques de subir des coups de soleil et brûlures liées au soleil [276]. Cependant, l'exposition du derme à des doses létales d'UVB, tel que celles utilisées en laboratoire, devrait être un évènement rare. Il est tout de même possible que des doses moins importantes soient suffisantes pour entraîner la mort des fibroblastes dermiques chez un individu. En effet, la peau est plus complexe qu'un modèle de monocouche de NHDF et d'autres facteurs entrent en jeu dans la signalisation cellulaire.

La CLUV, qui correspond à des doses faibles d'UVB, représente un modèle plus physiologique où chaque irradiation équivaut à quelques minutes d'irradiation solaire par jours pour la peau (Tableau 1). En prenant une transmission de 2% des UVB au derme, il faudrait 3750 J/m^2 d'UVB sur la peau pour recevoir 75 J/m^2 d'UVB dans le derme. Avec une irradiance de $2,94\text{ W/m}^2$, cela correspond à 20 minutes d'exposition au soleil, ce qui reste physiologique. Ce modèle est toutefois difficile à mettre en place et nécessite l'utilisation de

cellules pouvant supporter d'être maintenues à confluence au minimum 8 jours. La dose de 75 J/m² par irradiation chronique a été choisie afin que leur accumulation n'induisse pas de mortalité. Ce modèle a permis de mettre en évidence que les NHDF accumulent et réparent les dommages différemment selon le régime d'irradiation [282]. Nous avons ainsi posé l'hypothèse qu'un pré-traitement CLUV modifierais la réponse des NHDF à la mort cellulaire, soit en augmentant ou diminuant la sensibilité des NHDF à la mort, ou en modifiant la voie de mort activée par une dose létale d'UVB. Comme le montre les résultats du chapitre 3, cela n'est pas le cas. Le pré-traitement CLUV n'influence ni la proportion de cellules en voie de mort, ni la voie de mort cellulaire activée. Ces résultats semblent indiquer que les modifications amenées par la CLUV n'ont pas de rôle à jouer dans la mort cellulaire induite par une dose létale d'UVB. L'induction de dommages CPD résiduels, ou encore l'augmentation protéique de p53, ne sont pas suffisant pour modifier la réponse de mort cellulaire des NHDF.

c. UVA, un autre sujet d'étude possible

Nous avons choisi d'utiliser les UVB pour l'exposition des NHDF. Néanmoins, les UVA pénètrent la peau avec une transmission supérieure et plus en profondeur [204,308]. De plus, les UVA induisent, non seulement des dommages à l'ADN de types CPD, mais aussi des dommages oxydatifs [56]. Notamment, le profil des sites dipyrimidines endommagés par dimérisation est différent entre les UVA et les UVB, la majorité des CPD étant à des sites TT post-UVA avec très peu de CPD induits dans des sites CT et TC, alors que les UVB induisent des CPD aux sites TT, CT et TC en plus grande proportion [37]. Il serait donc intéressant d'étudier l'activation des voies de mort par les UVA et de vérifier si seule l'apoptose est activée par les UVA, ou d'autres voies non-apoptotiques dans les NHDF. Étant donné que plus de dommages oxydatifs sont générés par les UVA, on peut s'attendre à l'activation de voies de mort en lien avec l'oxydation comme la ferroptose par exemple.

Enfin, l'exposition des cellules aux UVR comprenant les UVA et les UVB en même proportion que le spectre solaire, permettrait d'étudier l'effet des UVR solaire atteignant la surface terrestre sur la mort des cellules de peau.

6. Réponse cellulaire et environnement

a. La signalisation cellules-matrice et cellule-cellule

Comme toute voie de signalisation, les voies de mort cellulaire régulées peuvent être affectées par l'environnement des cellules, soit les cellules adjacentes, la matrice extracellulaire ou encore les signaux endocrines.

Les fibroblastes de peau se trouvent imbriqués dans la matrice extracellulaire (MEC) du derme et produisent la majorité de ses composants. Des modifications au niveau de la matrice extracellulaire, comme un changement de rigidité, peuvent activer des voies de signalisation par mécano-transduction [309]. La modification de la MEC peut aussi libérer ou séquestrer des facteurs et cytokines, changeant la signalisation cellulaire, voir induire la mort cellulaire [310,311]. Les UVB sont capables de modifier la MEC du derme (Introduction, section 6-4). La présence de MEC et/ou son irradiation par les UVB pourrait exercer un impact sur les voies de mort activées par les UVB dans les fibroblastes de peau.

La présence d'un ou plusieurs types cellulaires pourrait aussi jouer sur les voies de mort activées par les UVB. Les cellules signalent aux cellules voisines du même type cellulaire et de types cellulaires différents. L'ajout de cellules immunitaires (macrophages, mastocytes) présentes dans le derme pourraient aussi influencer la mort des fibroblastes, tout comme l'ajout d'un système vasculaire, nerveux et lymphatique. De même, le derme communique avec l'épiderme et inversement, par des signaux mécaniques ou chimiques [312]. Il semble donc possible que la présence d'un épiderme puisse modifier la réponse du derme aux rayons UVB et inversement.

b. Le modèle de peau reconstruite

Afin d'étudier les voies de mort cellulaire activées par les UVB dans un modèle plus complexe, le modèle de peau reconstruite mis au point par le LOEX pourrait être une représentation 3D intéressante à utiliser. Il s'appuie sur la technique d'auto-assemblage. La MEC est produite par les fibroblastes dermiques, et le modèle est constitué de ce derme et d'un épiderme de kératinocytes. Les fibroblastes sont cultivés 21 à 30 jours avec de l'acide

ascorbique afin de favoriser la production de MEC par les fibroblastes, ce qui permet d'obtenir un feuillet dermique suffisamment épais et solide pour être manipulable. La peau reconstruite est constituée de trois feuillets de fibroblastes de peau superposés, et d'une couche de kératinocytes déposée au sommet. Le tout est mis en culture air-liquide afin de conserver les fibroblastes dans du milieu et de permettre la différenciation de la couche de kératinocyte [313,314]. Le modèle 3D est semblable à l'assemblage du derme et de l'épiderme et est utilisé pour les greffes de peau des grands brûlés au Québec.

Ce modèle a été précédemment utilisé au sein du laboratoire par l'étudiante et maintenant Dr. Marie Dorr, afin d'étudier l'impact du derme sur la réparation des dommages induits par les UVB dans les kératinocytes épidermiques [307].

Le modèle de peau reconstruite, et les contrôles associés (kératinocytes seuls non-différenciés et fibroblastes imbriqués dans la MEC seuls), permettraient de connaître les voies de mort UV-induites et d'évaluer la participation de MLKL et RIPK3 à ce processus dans les différents types cellulaires ainsi que dans un modèle 3D. La présence d'une MEC autour des fibroblastes de peau pourrait avoir un impact sur les voies de mort activées et la comparaison avec les résultats présentés dans cette thèse répondrait à cette question. L'activation d'autres voies potentielles dans les kératinocytes de peau n'est pas encore connue et pourra être étudiée avec le modèle de kératinocytes seuls. Enfin le modèle 3D de peau reconstruite permettrait de vérifier si la signalisation entre le derme et l'épiderme modifie la réponse des cellules les constituants.

Plusieurs difficultés se présentent pour la réalisation de ce modèle. Tout d'abord la production du modèle en lui-même est longue (plus de 45 jours), ensuite la dose d'UVB atteignant les différentes couches ne sera pas connue et pourra varier selon le degré de différenciation des kératinocytes. Néanmoins, ce modèle est une représentation 3D de la peau et permettrait à la fois d'étudier les fibroblastes imbriqués dans leur matrice, les kératinocytes non-différenciés et l'impact du derme sur l'épiderme et de l'épiderme sur le derme.

Enfin, Dr. Dorr a aussi mis au point le traitement CLUV sur un modèle de HaCaT en monocouche (en cours de publication). Les cellules HaCaT exposées à des irradiations chroniques pourraient être utilisées afin d'étudier l'effet du régime d'irradiation sur la mort

des kératinocytes. Notamment les HaCaT ont une réponse différente comparé aux NHDF prétraités par la CLUV, et réparent moins efficacement les dommages à l'ADN de type CPD. La réponse de mort cellulaire des kératinocytes pourrait dépendre du régime d'irradiation UVB, à l'opposé des NHDF.

c. La signalisation par les vésicules extracellulaires

Au sein du corps humain, chaque cellule peut communiquer non seulement avec les cellules voisines mais aussi avec les organes éloignés par le biais de la circulation sanguine (communication paracrine et endocrine). Les vésicules extracellulaires sont retrouvées dans tout l'organisme et sont un moyen de communication inter-cellules et inter-organes puissant. Elles contiennent différents composants cellulaires, dont des protéines (cytokines, facteurs de croissances), lipides, matériel génétique (miARN, ADN) ou des organelles (mitochondries) et sont impliquées dans différents processus (inflammation, différenciation, croissance, régulation métabolique, cancérogénèse...) et maladies [315,316]. Les cellules apoptotiques sont connues pour relâcher des corps apoptotiques qui sont en fait des vésicules extracellulaires de tailles hétérogènes (jusqu'à 5µm de diamètre) et qui régulent notamment la réponse immunitaire [317]. Des études s'intéressant à la production de vésicules extracellulaires dans des cellules exposées aux UVR ont récemment été publiées. Par exemple, les UVB induisent la production de vésicules extracellulaires contenant de la fibronectine par les mélanocytes et celles-ci participent à la survie des mélanocytes [318]. La même année une autre étude a montré que les UVA, et non les UVB, pouvaient induire la production de vésicules extracellulaires par les mélanocytes et les kératinocytes [319]. L'étude des vésicules extracellulaires produites par les fibroblastes exposés aux UVB, et leur caractérisation, permettrait d'évaluer leur contribution dans la réponse cellulaire au stress génotoxique UVB, notamment dans la mort cellulaire, que ce soit au sein du derme ou dans la communication derme-épiderme.

7. Lien entre dommages à l'ADN, métabolisme, réparation et mort cellulaire

Au sein du laboratoire, différents aspects de la réponse au stress UVB sont à l'étude ou ont été étudiés. Un de ces projets s'intéresse aux rôles du métabolisme dans la mort induite par les UVR. En effet, les cellules intègrent différents signaux, dont les dommages à l'ADN induits par les UVB, et déclenchent diverses voies de réponse dont l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation des dommages, des changements métaboliques ou encore la mort cellulaire. Les différentes voies de signalisation ne sont pas linéaires mais peuvent se recouper afin que la réponse cellulaire finale soit coordonnée.

a. PARP1 : une protéine multitâche

Certains facteurs se trouvent à la croisée des différentes voies de signalisation (Introduction, section 5-3). Dans le chapitre 1, l'inhibition de PARP1 modifie l'activité métabolique des cellules en réponse aux UVB. Initialement, la parthanatos a été suspectée mais son activation par les UVB a été infirmée. La protéine de parylation PARP1 est activée par les UVB et est connue pour interagir avec les protéines de réparation de l'ADN [111,112,320]. Dans notre étude, l'irradiation UVB des NHDF entraîne l'activation de PARP1, qui déplete en partie le pool de NAD⁺ cellulaire, ce qui s'explique par l'utilisation du NAD⁺ lors de la parylation. Il existe probablement une association entre la réparation de l'ADN et les modifications de l'activité métabolique observées en réponse au stress UV. Il reste à vérifier si la diminution drastique du pool de NAD⁺ suite à une dose létale d'UVB joue dans l'activation de l'apoptose ou dans la mort cellulaire plus généralement.

b. La mitochondrie

Un des projets du laboratoire, effectué par Sébastien Méthot, se concentre sur l'analyse de l'implication des mitochondries dans la mort UV-induite. En effet, la voie apoptotique intrinsèque passe par la formation de pores mitochondriaux régulés par les protéines de la famille Bcl-2 qui relarguent des molécules activant les caspases (Introduction, section 5-1). Les mitochondries possèdent des génomes et des systèmes de réparation. Néanmoins, la

réparation NER qui s'occupe des dommages de types dimères de pyrimidines n'est pas présente dans la mitochondrie [81,82]. Ainsi, la caractérisation de l'implication des mitochondries dans la mort-UV induite est à l'étude.

8. L'œil, l'autre organe exposé aux rayons UVB

Les rayons solaires qui atteignent la surface terrestre, touchent les organes externes, soit la peau et les yeux. L'œil est un organe complexe qui filtre les UVR avant qu'ils n'atteignent la partie la plus postérieure, la rétine (Introduction, section 2-1). L'œil est sujet à une exposition constante de lumière, exceptée lors du sommeil, et donc à une accumulation de l'exposition solaire. Comme pour la peau, l'effet de l'exposition chronique est difficilement mesurable, d'autant qu'elle varie pour chaque individu. Une des façons de mesurer cette accumulation est de trouver des biomarqueurs du photo-vieillessement. Les mutations et délétions retrouvées dans l'ADN mitochondrial sont de bons candidats. En effet, les cellules possèdent de nombreuses copies d'ADN mitochondrial et tolèrent les mutations et délétions dans une partie de ces copies. Chaque cellule possède un mélange de génomes mitochondriaux sains et mutés (délétions et mutation ponctuelles). En ce qui concerne l'œil, certaines délétions mitochondriales ont été retrouvées dans les tissus antérieurs, donc dans des zones irradiées par les UVR, et s'accumulent avec l'âge. La délétion commune de 4977 pb et la délétion de 3895 pb sont ainsi considérées comme des biomarqueurs du photo-vieillessement dans le stroma cornéen [85,86]. Dans l'annexe 1, la mutation ponctuelle de transversion T vers G en position 414 (T414G) a été étudiée de la même façon que les délétions 4977 pb et 3895 pb, notamment car cette mutation est un marqueur du photo-vieillessement de la peau [87,88]. Nous avons observé que la mutation T414G s'accumule avec l'âge dans l'iris et le stroma cornéen, deux couches antérieures de l'œil, soit des tissus exposés aux UVR. Ainsi nous proposons T414G comme nouveau marqueur du photo-vieillessement dans l'iris et le stroma cornéen [321]. La découverte de nouveaux marqueurs permettra d'étudier l'effet de l'exposition solaire chronique dans des maladies de l'œil pour lesquelles il est difficile de le vérifier [271], comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge [269], la dystrophie endothélial de Fuchs [268], le mélanome uvéal [270] et le glaucome [322].

9. La mort cellulaire et les cancers de peau

Les rayons UVB sont un initiateur et promoteur puissant de la carcinogénèse. En effet, ils entraînent la formation de dommages mutagènes dans les cellules exposées, module la réponse immunitaire de la peau et par le biais de la mort UV-induite peuvent supprimer ou promouvoir les cancers de peau non-mélanocytaires (Introduction, section 6-3). De plus les cellules cancéreuses sont capables d'éviter la mort cellulaire, notamment l'apoptose [323].

Dans nos travaux, les NHDF irradiés par une dose létale d'UVB ne meurent que par apoptose. Ni la nécroptose, ni la parthanatos, ni la ferroptose n'ont pu être observées dans les NHDF. De plus, malgré l'inhibition de l'apoptose, aucune voie de compensation n'est visible dans ces cellules irradiées. Cela signifie que les cellules n'ont pas de réponse « backup » ou de « plan B » face aux rayons UVB létaux si l'apoptose est inhibée. Il pourrait en être de même pour les cellules de l'épiderme pouvant dériver en cellules tumorales, soit les kératinocytes et les mélanocytes. Des études sur ces types cellulaires permettront de vérifier cette hypothèse. Néanmoins, si celle-ci est confirmée, la présence d'une seule voie de mort cellulaire pourrait être un facteur pro-tumoral dans les cellules de peau.

La résistance à l'apoptose est une caractéristique des cancers. Déclencher les voies de mort, apoptotiques et non apoptotiques dans ces cellules, est donc une stratégie utilisée pour supprimer les cellules tumorales. Cette stratégie est déjà étudiée pour les cancers de peau [323], mais peut s'avérer à double tranchant. En effet, si l'induction de la mort dans les cellules tumorales peut les supprimer, les tumeurs forment des environnements hétérogènes et les molécules relarguées durant la mort d'une partie des cellules peut promouvoir la migration et l'invasion d'autres cellules [324].

Une étude sur les carcinomes (squameux) de peau et de cou démontre que de la nécroptose est activée au sein des tumeurs des patients. L'activation de la nécroptose dans ces cellules entraîne le relargage de molécules qui augmentent le potentiel invasif des cellules alentours. Dans ce cas, la nécroptose semble être un facteur promoteur de tumeur [325]. En revanche, dans des cellules de mélanomes, la perte de RIPK3 entraîne la résistance à la nécroptose. En effet, les mélanocytes expriment RIPK3 tandis que certains mélanomes perdent son expression. Dans ces circonstances, combiner l'ajout de RIPK3 et l'inhibiteur de BRAF

Vemurafenib pourrait vaincre les résistances des mélanomes à l'apoptose et à la nécroptose [326].

Deux points de vue se font donc face. Premièrement, les voies non-apoptotiques peuvent être considérées comme des processus antitumoraux capables de supprimer les cellules cancéreuses et de contourner la résistance à l'apoptose de ces cellules. Deuxièmement, les voies de mort peuvent être vues comme des promoteurs tumoraux, notamment par le relargage de molécules pro-invasion, pro-migration, et inflammatoires. Dans le cas des carcinomes, l'apoptose a ce double effet [220] : la mort cellulaire permet de supprimer les cellules endommagées et permet aussi l'expansion clonale des cellules résistantes à la mort (théorie du double punch solaire, Introduction section 5-2-4). Il est donc nécessaire de moduler l'activation des voies de mort avec précision pour que cela ait un effet thérapeutique bénéfique.

Décrypter les voies de mort activées dans les cellules de peau par les UVB s'inscrit dans la recherche d'une meilleure compréhension des mécanismes de la progression tumorale, tandis que les connaissances sur les voies de mort activées ou activables dans les cellules tumorales permettront de créer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Conclusion

De nombreuses questions et hypothèses restent à étudier en ce qui concerne la réponse au stress par les UVR dans les cellules de peau et des yeux. Cette thèse participe à la construction des connaissances entourant la réponse au stress génotoxique UVB dans les cellules du derme. Les travaux présentés portent sur la mort induite par les rayons UVB et sa caractérisation dans les NHDF.

Ainsi, ces travaux présentent pour la première fois l'étude des voies non-apoptotiques dans les NHDF et mettent en évidence l'importance de l'apoptose comme voie unique de réponse à une dose létale d'UVB *in-vitro*. Les données démontrent que le régime d'irradiation chronique ne module pas cette réponse. De plus, cette thèse introduit la découverte de deux nouveaux acteurs dans la mort UV-induite, soit la kinase RIPK3 et la pseudo-kinase MLKL. L'originalité de ces travaux est accentuée par la découverte du rôle inattendu de RIPK3 comme protecteur de la mort UV-induite, tandis que la protéine MLKL contribue à l'apoptose des cellules irradiées.

Ces travaux représentent les fondations d'études ultérieures portant sur les voies de mort cellulaire et leur caractérisation dans les cellules humaines de peau en réponse aux UVR.

Bibliographie

1. Sliney, D.H. (2016) What is light? the visible spectrum and beyond. *Eye*, **30**,222–229.
2. Forbes, M.D.E. (2015) What we talk about when we talk about light. *ACS Cent. Sci.*, **1**,354–363. doi:10.1021/acscentsci.5b00261.
3. Yagura, T., Makita, K., Yamamoto, H., Menck, C.F.M., and Schuch, A.P. (2011) Biological sensors for solar ultraviolet radiation. *Sensors (Switzerland)*, **11**,4277–4294. doi:10.3390/s110404277.
4. Diffey, B. (2015) Solar spectral irradiance and summary outputs using excel. *Photochem. Photobiol.*, **91**,553–557. doi:10.1111/php.12422.
5. Schuch, A.P., Moreno, N.C., Schuch, N.J., Menck, C.F.M., and Garcia, C.C.M. (2017) Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. *Free Radic. Biol. Med.*, **107**,110–124.
6. Felder-Schmittbuhl, M.-P., Buhr, E.D., Dkhissi-Benyahya, O., et al. (2018) Ocular Clocks: Adapting Mechanisms for Eye Functions and Health. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **59**,4856–4870.
7. Kolb, H. (2005) Gross Anatomy of the Eye. *Kolb H, Fernandez E, Nelson R, Ed. Webvision Organ. Retin. Vis. Syst. [Internet]*,1–8. Accessed 1 May 2005.
8. Kels, B.D., Grzybowski, A., and Grant-Kels, J.M. (2015) Human ocular anatomy. *Clin. Dermatol.*, **33**,140–146.
9. Meek, K.M. and Knupp, C. (2015) Corneal structure and transparency. *Prog. Retin. Eye Res.*, **49**,1–16.
10. Sridhar, M.S. (2018) Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J. Ophthalmol.*, **66**,190–194.
11. Hejtmancik, J.F. and Shiels, A. (2015) Overview of the Lens. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **134**,119–127. doi:10.1016/bs.pmbts.2015.04.006.
12. Kolb, H. (2005) Simple Anatomy of the Retina. *Kolb H, Fernandez E, Nelson R, Ed. Webvision Organ. Retin. Vis. Syst. [Internet]*,,1–24. Accessed 1 May 2005.
13. Walsh, K. (2009) UV radiation and the Eye. *Jonhson&Jonhson Vis. CARE Inst. [Originally Publ. Opt. 2009 237; 6204 26-33.]*,.
14. Delic, N.C., Lyons, J.G., Di Girolamo, N., and Halliday, G.M. (2017) Damaging Effects of Ultraviolet Radiation on the Cornea. *Photochem. Photobiol.*, **93**,920–929. doi:10.1111/php.12686.
15. Yam, J.C.S. and Kwok, A.K.H. (2014) Ultraviolet light and ocular diseases. *Int. Ophthalmol.*, **34**,383–400. doi:10.1007/s10792-013-9791-x.
16. Kamari, F., Hallaj, S., Dorosti, F., Alinezhad, F., Taleschian-Tabrizi, N., Farhadi, F., and Aslani, H. (2019) Phototoxicity of environmental radiations in human lens: revisiting the pathogenesis of UV-induced cataract. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **257**,2065–2077. doi:10.1007/s00417-019-04390-3.
17. Tobin, D.J. (2006) Biochemistry of human skin - Our brain on the outside. *Chem. Soc. Rev.*, **35**,52–67. doi:10.1039/b505793k.

18. Prost-Squarcioni, C. (2006) Histologie de la peau et des follicules pileux. *Medecine/Sciences*, **22**,131–137. doi:10.1051/medsci/2006222131.
19. Breitzkreutz, D., Mirancea, N., and Nischt, R. (2009) Basement membranes in skin: Unique matrix structures with diverse functions? *Histochem. Cell Biol.*, **132**,1–10. doi:10.1007/s00418-009-0586-0.
20. Boer, M., Duchnik, E., Maleszka, R., and Marchlewicz, M. (2016) Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. *Postep. Dermatologii i Alergol.*, **33**,1–5. doi:10.5114/pdia.2015.48037.
21. Milstone, L.M. (2004) Epidermal desquamation. *J. Dermatol. Sci.*, **36**,131–140. doi:10.1016/j.jdermsci.2004.05.004.
22. Has, C. (2018) Peeling Skin Disorders: A Paradigm for Skin Desquamation. *J. Invest. Dermatol.*, **138**,1689–1691.
23. Krieg, T. and Aumailley, M. (2011) The extracellular matrix of the dermis: Flexible structures with dynamic functions. *Exp. Dermatol.*, **20**,689–695. doi:10.1111/j.1600-0625.2011.01313.x.
24. Debroas, G., Hoeffel, G., Reynders, A., and Ugolini, S. (2018) Interactions neuro-immunes dans la peau: un lien entre douleur et immunité. *Médecine/Sciences*, **34**,432–438.
25. Theocharidis, G. and Connelly, J.T. (2019) Minor collagens of the skin with not so minor functions. *J. Anat.*, **235**,418–429. doi:10.1111/joa.12584.
26. Sorrell, J.M. (2004) Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J. Cell Sci.*, **117**,667–675.
27. Uitto, J., Li, Q., and Urban, Z. (2013) The complexity of elastic fibre biogenesis in the skin--a perspective to the clinical heterogeneity of cutis laxa. *Exp. Dermatol.*, **22**,88–92.
28. Bosman, F.T. and Stamenkovic, I. (2003) Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J. Pathol.*, **200**,423–428. doi:10.1002/path.1437.
29. Tandara, A.A. and Mustoe, T.A. (2011) MMP- and TIMP-secretion by human cutaneous keratinocytes and fibroblasts - Impact of coculture and hydration. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.*, **64**,108–116. doi:10.1016/j.bjps.2010.03.051.
30. Tracy, L.E., Minasian, R.A., and Caterson, E.J. (2016) Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Adv. Wound Care*, **5**,119–136. doi:10.1089/wound.2014.0561.
31. Driskell, R.R., Lichtenberger, B.M., Hoste, E., et al. (2013) Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature*, **504**,277–281.
32. Bahar, M.A., Bauer, B., Tredget, E.E., and Ghahary, A. (2004) Dermal fibroblasts from different layers of human skin are heterogeneous in expression of collagenase and types I and III procollagen mRNA. *Wound Repair Regen.*, **12**,175–182. doi:10.1111/j.1067-1927.2004.012110.x.
33. Losquadro, W.D. (2017) Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plast. Surg. Clin. North Am.*, **25**,283–289. doi:10.1016/j.fsc.2017.03.001.
34. Timares, L., Katiyar, S.K., and Elmetts, C.A. (2008) DNA damage, apoptosis and langerhans cells--Activators of UV-induced immune tolerance. *Photochem. Photobiol.*, **84**,422–436.
35. Rochette, P.J., Therrien, J.-P., Drouin, R., Perdiz, D., Bastien, N., Drobetsky, E.A., and Sage, E. (2003) UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine

- dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells. *Nucleic Acids Res.*, **31**,2786–2794.
36. Burren, R., Scaletta, C., Frenk, E., Panizzon, R.G., and Applegate, L.A. (1998) SUNLIGHT AND CARCINOGENESIS : EXPRESSION OF p53 AND PYRIMIDINE DIMERS IN HUMAN SKIN FOLLOWING UVA I , UVA I ? II AND SOLAR SIMULATING RADIATIONS. *Intern. J. Cancer*, **76**,201–206.
 37. Douki, T., Reynaud-Angelin, A., Cadet, J., and Sage, E. (2003) Bipyrimidine Photoproducts Rather than Oxidative Lesions Are the Main Type of DNA Damage Involved in the Genotoxic Effect of Solar UVA Radiation †. *Am. Chem. Soc.*, **42**,9221–9226. doi:10.1021/bi034593c.
 38. Kuluncsics, Z., Perdiz, D., Brulay, E., Muel, B., and Sage, E. (1999) Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: Involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **49**,71–80. doi:10.1016/S1011-1344(99)00034-2.
 39. Rastogi, R.P., Richa., Kumar, A., Tyagi, M.B., and Sinha, R.P. (2010) Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids*, **2010**,592980.
 40. Douki, T. and Sage, E. (2016) Dewar valence isomers, the third type of environmentally relevant DNA photoproducts induced by solar radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.*,24–30. doi:10.1039/c5pp00382b.
 41. Kim, J.-K., Patel, D., and Choi, B.-S. (1995) CONTRASTING STRUCTURAL IMPACTS INDUCED BY cis-syn CYCLOBUTANE DIMER AND (6–4) ADDUCT IN DNA DUPLEX DECAMERS: IMPLICATION IN MUTAGENESIS AND REPAIR ACTIVITY. *Photochem. Photobiol.*, **62**,44–50.
 42. Park, H., Zhang, K., Ren, Y., Nadji, S., Sinha, N., Taylor, J., and Kang, C. (2002) Crystal structure of a DNA decamer containing a cis-syn thymine dimer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**,15965–15970.
 43. Dehez, F., Gattuso, H., Bignon, E., Morell, C., Dumont, E., and Monari, A. (2017) Conformational polymorphism or structural invariance in DNA photoinduced lesions : implications for repair rates. **45**,3654–3662. doi:10.1093/nar/gkx148.
 44. Courdavault, S., Baudouin, C., Charveron, M., Canguilhem, B., Favier, A., Cadet, J., and Douki, T. (2005) Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations. *DNA Repair (Amst.)*, **4**,836–844. doi:10.1016/j.dnarep.2005.05.001.
 45. Sugasawa, K., Okamoto, T., Shimizu, Y., Masutani, C., Iwai, S., and Hanaoka, F. (2001) A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes Dev.*,507–521. doi:10.1101/gad.866301.coupled.
 46. Buschta - Hedayat, N., Buterin, T., Hess, M.T., Missura, M., and Naegeli, H. (1999) Recognition of nonhybridizing base pairs during nucleotide excision repair of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**,6090–6095.
 47. Premi, S., Wallisch, S., Manu, C.M., et al. (2015) Chemexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure.pdf. *Science (80-.)*, **347**,842–847.
 48. Lawrence, K.P., Douki, T., Sarkany, R.P.E., Acker, S., Herzog, B., and Young, A.R. (2018) The UV/Visible Radiation Boundary Region (385–405 nm) Damages Skin Cells and Induces “dark” Cyclobutane Pyrimidine Dimers in Human Skin in vivo. *Sci. Rep.*, **8**,1–12.

49. Delinasios, G.J., Karbaschi, M., Cooke, M.S., and Young, A.R. (2018) Vitamin E inhibits the UVAI induction of “light” and “dark” cyclobutane pyrimidine dimers, and oxidatively generated DNA damage, in keratinocytes. *Sci. Rep.*, **8**,1–12.
50. Lamola, A.A. (1971) Production of Pyrimidine dimers in DNA in the dark. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**,893–898.
51. Brash, D.E. (2016) UV-induced Melanin Chemiexcitation: A New Mode of Melanoma Pathogenesis. *Toxicol. Pathol.*, **44**,552–554. doi:10.1177/0192623316632072.
52. Hakozaki, T., Date, A., and Yoshii, T. (2008) Visualization and characterization of UVB-induced reactive oxygen species in a human skin equivalent model. *Arch. Dermatol. Res.*, **300**,51–56. doi:10.1007/s00403-007-0804-3.
53. Zhang, X., Rosenstein, B.S., Wang, Y., Lebwohl, M., and Wei, H. (1997) Identification of possible reactive oxygen species involved in ultraviolet radiation-induced oxidative DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.*, **23**,980–985. doi:10.1016/S0891-5849(97)00126-3.
54. Liu, W. and Wu, S. (2010) Differential Roles of Nitric Oxide Synthases in Regulation of Ultraviolet B Light-induced Apoptosis. *Nitric Oxide*, **23**,199–205. doi:10.1016/j.niox.2010.06.003.Differential.
55. Glady, A., Tanaka, M., Sagita Moniaga, C., Yasui, M., and Hara-Chikuma, M. (2018) Involvement of NADPH oxidase 1 in UVB-induced cell signaling and cytotoxicity in human keratinocytes. *Biochem. Biophys. Reports*, **14**,7–15.
56. Cadet, J., Douki, T., and Ravanat, J.L. (2015) Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation. *Photochem. Photobiol.*, **91**,140–155. doi:10.1111/php.12368.
57. Benjamin, C.L. and Ananthaswamy, H.N. (2007) p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **224**,241–248.
58. Krauthammer, M., Kong, Y., Ha, B.H., et al. (2012) Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat. Genet.*, **44**,1006–1014.
59. Brash, D.E. (2015) Invited Review UV Signature Mutations †,15–26. doi:10.1111/php.12377.
60. Mitchell, D.L., Jen, J., and Cleaver, J.E. (1992) Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation. *Nucleic Acids Res.*, **20**,225–229. doi:10.1093/nar/20.2.225.
61. Tu, Y., Dammann, R., and Pfeifer, G.P. (1998) Sequence and time-dependent deamination of cytosine bases in UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers in vivo. *J. Mol. Biol.*, **284**,297–311. doi:10.1006/jmbi.1998.2176.
62. Yoon, J.H., Prakash, L., and Prakash, S. (2009) Highly error-free role of DNA polymerase η in the replicative bypass of UV-induced pyrimidine dimers in mouse and human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**,18219–18224. doi:10.1073/pnas.0910121106.
63. Tommasi, S. and Pfeifer, G.P. (1997) Sunlight Induces Pyrimidine Dimers Preferentially at 5-Methylcytosine Bases. *Plasmid*, **57**,4727–4730.
64. Martinez-Fernandez, L., Banyasz, A., Esposito, L., Markovitsi, D., and Improta, R. (2017) UV-induced damage to DNA: Effect of cytosine methylation on pyrimidine dimerization. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **2**,1–7. doi:10.1038/sigtrans.2017.21.

65. Lee, D.H. and Pfeifer, G.P. (2003) Deamination of 5-methylcytosines within cyclobutane pyrimidine dimers is an important component of UVB mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **278**,10314–10321. doi:10.1074/jbc.M212696200.
66. IKEHATA, H. and ONO, T. (2011) The Mechanisms of UV Mutagenesis. *J. Radiat. Res.*, **52**,115–125. doi:10.1269/jrr.10175.
67. Davies, M.J. (2003) Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**,761–770. doi:10.1016/S0006-291X(03)00817-9.
68. Creed, D. (1984) THE PHOTOPHYSICS AND PHOTOCHEMISTRY OF THE NEAR-UV ABSORBING AMINO ACIDS - I. TRYPTOPHAN AND ITS SIMPLE DERIVATIVES. *Photochemistry*, **39**,537–562.
69. Sherratt, M.J., Bayley, C.P., Reilly, S.M., Gibbs, N.K., Griffiths, C.E.M., and Watson, R.E.B. (2010) Low-dose ultraviolet radiation selectively degrades chromophore-rich extracellular matrix components,32–40.
70. Quan, T., Qin, Z., Xia, W., Shao, Y., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J. (2009) Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **14**,20–24.
71. Berneburg, M., Plettenberg, H., and Krutmann, J. (2000) Photoaging of human skin. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **16**,239–244. doi:10.1034/j.1600-0781.2000.160601.x.
72. Kundu, L.M., Linne, U., Marahiel, M., and Carell, T. (2004) RNA is more UV resistant than DNA: The formation of UV-induced DNA lesions is strongly sequence and conformation dependent. *Chem. - A Eur. J.*, **10**,5697–5705. doi:10.1002/chem.200305731.
73. Wamer, W.G. and Wei, R.R. (1997) In vitro Photooxidation of Nucleic Acids by Ultraviolet A Radiation. *Photochem. Photobiol.*, **65**,560–563. doi:10.1080/02673843.1989.9747652.
74. Bernard, J.J., Cowing-Zitron, C., Nakatsuji, T., et al. (2012) Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat. Med.*, **18**,1286–1290. doi:10.1038/nm.2861.
75. Wurtmann, E. and Wolin, S.L. (2013) RNA under attack: Cellular handling of RNA damage Elisabeth. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, **31**,34–49. doi:10.1109/TMI.2012.2196707.Separate.
76. Morliere, P., Moysan, A., and Tirache, I. (1995) ACTION SPECTRUM FOR UV-INDUCED LIPID PEROXIDATION IN CULTURED HUMAN SKIN FIBROBLASTS. *Free Radic. Biol. Med.*, **19**,365–371.
77. Cejas, P., Casado, E., Belda-Iniesta, C., et al. (2004) Implications of Oxidative Stress and Cell Membrane Lipid Peroxidation in Human Cancer (Spain). *Cancer Causes Control*, **15**,707–719.
78. Gruber, F., Oskolkova, O., Leitner, A., et al. (2007) Photooxidation generates biologically active phospholipids that induce heme oxygenase-1 in skin cells. *J. Biol. Chem.*, **282**,16934–16941. doi:10.1074/jbc.M702523200.
79. Kostyuk, V., Potapovich, A., Stancato, A., de Luca, C., Lulli, D., Pastore, S., and Korkina, L. (2012) Photo-Oxidation Products of Skin Surface Squalene Mediate Metabolic and Inflammatory Responses to Solar UV in Human Keratinocytes. *PLoS One*, **7**,1–11. doi:10.1371/journal.pone.0044472.
80. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002) The Mitochondrion. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science.

81. Pascucci, B., Versteegh, A., Van Hoffen, A., Van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H.F., and Dogliotti, E. (1997) DNA repair of UV photoproducts and mutagenesis in human mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.*, **273**,417–427. doi:10.1006/jmbi.1997.1268.
82. Ledoux, S.P., Wilson, G.L., Beecham, E.J., Stevnsner, T., Wassermann, K., and Bohr, V.A. (1992) Repair of mitochondrial DNA after various types of DNA damage in chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis*, **13**,1967–1973. doi:10.1093/carcin/13.11.1967.
83. Gniadecki, R., Thorn, T., Vicanova, J., Petersen, A., and Wulf, H.C. (2000) Role of mitochondria in ultraviolet-induced oxidative stress. *J. Cell. Biochem.*, **80**,216–222. doi:10.1002/1097-4644(20010201)80:2<216::aid-jcb100>3.0.co;2-h.
84. Birch-Machin, M.A. and Swalwell, H. (2010) How mitochondria record the effects of UV exposure and oxidative stress using human skin as a model tissue. *Mutagenesis*, **25**,101–107. doi:10.1093/mutage/geb061.
85. Gendron, S.P., Mallet, J.D., Bastien, N., and Rochette, P.J. (2012) Mitochondrial DNA common deletion in the human eye: A relation with corneal aging. *Mech. Ageing Dev.*, **133**,68–74. doi:10.1016/j.mad.2012.01.002.
86. Gendron, S.P., Bastien, N., Mallet, J.D., and Rochette, P.J. (2013) The 3895-bp mitochondrial DNA deletion in the human eye: A potential involvement in corneal ageing and macular degeneration. *Mutagenesis*, **28**,197–204. doi:10.1093/mutage/ges071.
87. Birket, M.J. and Birch-Machin, M.A. (2007) Ultraviolet radiation exposure accelerates the accumulation of the aging-dependent T414G mitochondrial DNA mutation in human skin. *Aging Cell*, **6**,557–564. doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00310.x.
88. Birket, M.J., Passos, J.F., Von Zglinicki, T., and Birch-Machin, M.A. (2009) The relationship between the aging- and photo-dependent T414G mitochondrial DNA mutation with cellular senescence and reactive oxygen species production in cultured skin fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.*, **129**,1361–1366. doi:10.1038/jid.2008.373.
89. Füllsack, S., Rosenthal, A., Wajant, H., and Siegmund, D. (2019) Redundant and receptor-specific activities of TRADD, RIPK1 and FADD in death receptor signaling. *Cell Death Dis.*, **10**.
90. Guicciardi, M.E. and Gores, G.J. (2009) Life and death by death receptors. *FASEB J.*, **23**,1625–1637.
91. Pasparakis, M. and Vandenabeele, P. (2015) Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, **517**,311–320.
92. Rosette, C. and Karin, M. (1996) Ultraviolet light and osmotic stress: Activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science (80-.)*, **274**,1194–1197. doi:10.1126/science.274.5290.1194.
93. Bang, B., Gniadecki, R., Larsen, J.K., Baadsgaard, O., and Skov, L. (2003) In vivo UVB irradiation induces clustering of Fas (CD95) on human epidermal cells. *Exp. Dermatol.*, **12**,791–798. doi:10.1111/j.0906-6705.2003.00091.x.
94. Aragane, Y., Kulms, D., Metzke, D., Wilkes, G., Pöppelmann, B., Luger, T.A., and Schwarz, T. (1998) Ultraviolet Light Induces Apoptosis via Direct Activation of CD95 (Fas/APO-1) Independently of Its Ligand CD95L. *J. Cell Biol.*, **140**,171–182. doi:10.1083/jcb.140.1.171.
95. Sheikh, M.S., Antinore, M.J., Huang, Y., and Fornace, A.J. (1998) Ultraviolet-irradiation-induced apoptosis is mediated via ligand independent activation of tumor necrosis factor receptor 1.

Oncogene, **17**,2555–2563. doi:10.1038/sj.onc.1202292.

96. George, K.S., Elyassaki, W., Wu, Q., and Wu, S. (2012) The Role of Cholesterol In Ultraviolet Light B-Induced Apoptosis. *Photochem. Photobiol.*, **88**,1191–1197.
97. Cooper, G. (2000) *The Eukaryotic Cell Cycle. The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. p. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>.
98. Kono, T., Tanii, T., Furukawa, M., Mizuno, N., Kitajima, J., Ishii, M., Hamada, T., and Yoshizato, K. (1990) Cell cycle analysis of human dermal fibroblasts cultured on or in hydrated type I collagen lattices. *Arch. Dermatol. Res.*, **282**,258–262.
99. Pollina, E.A., Legesse-Miller, A., Haley, E.M., Goodpaster, T., Randolph-Habecker, J., and Coller, H.A. (2008) Regulating the angiogenic balance in tissues: A potential role for the proliferative state of fibroblasts. *Cell Cycle*, **7**,2056–2070. doi:10.4161/cc.7.13.6240.
100. Barnum, K.J. and O’Connell, M.J. (2014) Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods Mol. Biol.*, **1170**,539–547. doi:10.1007/978-1-4939-0888-2.
101. Sertic, S., Pizzi, S., Lazzaro, F., Plevani, P., and Muzi-Falconi, M. (2012) NER and DDR: Classical music with new instruments. *Cell Cycle*, **11**,668–674. doi:10.4161/cc.11.4.19117.
102. Ray, A., Milum, K., Battu, A., Wani, G., and Wani, A.A. (2013) NER initiation factors, DDB2 and XPC, regulate UV radiation response by recruiting ATR and ATM kinases to DNA damage sites. *DNA Repair (Amst.)*, **12**,273–283. doi:10.1016/j.dnarep.2013.01.003.
103. Ray, A., Blevins, C., Wani, G., and Wani, A.A. (2016) ATR- and ATM-Mediated DNA damage response is dependent on excision repair assembly during G1 but not in S phase of cell cycle. *PLoS One*, **11**,1–20. doi:10.1371/journal.pone.0159344.
104. Geyer, R.K., Nagasawa, H., Little, J.B., and Maki, C.G. (2000) Role and regulation of p53 during an ultraviolet radiation-induced G1 cell cycle arrest. *Cell Growth Differ.*, **11**,149–156.
105. Al-Mohanna, M.A., Al-Khodairy, F.M., Krezolek, Z., Bertilsson, P.A., Al-Houssein, A., and Aboussekhra, A. (2001) P53 is dispensable for UV-induced cell cycle arrest at late G1 in mammalian cells. *Carcinogenesis*, **22**,573–578. doi:10.1093/carcin/22.4.573.
106. Fotedar, R., Bendjennat, M., and Fotedar, A. (2004) Role of p21WAF1 in the Cellular Response to UV. *Cell Cycle*, **3**,132–135.
107. Pavey, S., Russell, T., and Gabrielli, B. (2001) G2 phase cell cycle arrest in human skin following UV irradiation. *Oncogene*, **20**,6103–6110. doi:10.1038/sj.onc.1204707.
108. Marteijn, J. a., Lans, H., Vermeulen, W., and Hoeijmakers, J.H.J. (2014) Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**,465–481.
109. Kobaisi, F., Fayyad, N., Rezvani, H.R., et al. (2019) Signaling Pathways, Chemical and Biological Modulators of Nucleotide Excision Repair: The Faithful Shield against UV Genotoxicity. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**,4654206. doi:10.1155/2019/4654206.
110. Bai, P. (2015) Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance. *Mol. Cell*, **58**,947–958.
111. King, B.S., Cooper, K.L., Liu, K.J., and Hudson, L.G. (2012) Poly(ADP-ribose) contributes to an association between Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and xeroderma pigmentosum complementation

- group A in nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.*, **287**,39824–39833. doi:10.1074/jbc.M112.393504.
112. Purohit, N.K., Robu, M., Shah, R.G., Geacintov, N.E., and Shah, G.M. (2016) Characterization of the interactions of PARP-1 with UV-damaged DNA in vivo and in vitro. *Sci. Rep.*, **6**,19020.
 113. Pines, A., Vrouwe, M.G., Martejijn, J.A., et al. (2012) PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1. *J. Cell Biol.*, **199**,235–249. doi:10.1083/jcb.201112132.
 114. Livneh, Z., Ziv, O., and Shachar, S. (2010) Multiple two-polymerase mechanisms in mammalian translesion DNA synthesis. *Cell Cycle*, **9**,729–735. doi:10.4161/cc.9.4.10727.
 115. Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., et al. (1999) The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η . *Nature*, **399**.
 116. Black, J.O. (2016) Xeroderma Pigmentosum. *Head Neck Pathol.*, **10**,139–144. doi:10.1007/s12105-016-0707-8.
 117. Inui, H., Oh, K., Nadem, C., et al. (2008) Xeroderma Pigmentosum-Variant Patients from America, Europe, and Asia. *J. Invest. Dermatol.*, **128**,2055–2068. doi:10.1038/jid.2008.48.Xeroderma.
 118. Zhang, Y., Yuan, F., Wu, X., Rechkoblit, O., Taylor, J., Geacintov, N.E., and Wang, Z. (2000) Error-prone lesion bypass by human DNA polymerase η . **28**,4717–4724.
 119. Boehm, E.M., Gildenberg, M.S., and Washington, M.T. (2016) The Many Roles of PCNA in Eukaryotic DNA Replication. *Enzym.*, **39**,231–254.
 120. Quinet, A., Martins, D.J., Vessoni, A.T., Biard, D., Sarasin, A., Sary, A., and Menck, F.C.M. (2016) Translesion synthesis mechanisms depend on the nature of DNA damage in UV-irradiated human cells. *Nucleic Acids Res.*, **44**,5717–5731. doi:10.1093/nar/gkw280.
 121. Ziv, O., Geacintov, N., Nakajima, S., Yasui, A., and Livneh, Z. (2009) DNA polymerase ζ cooperates with polymerases κ and ι in translesion DNA synthesis across pyrimidine photodimers in cells from XPV patients. *PNAS*, **106**,11552–11557.
 122. López-Camarillo, C., Ocampo, E.A., Casamichana, M.L., Pérez-Plasencia, C., Álvarez-Sánchez, E., and Marchat, L.A. (2012) Protein kinases and transcription factors activation in response to UV-radiation of skin: Implications for carcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.*, **13**,142–172. doi:10.3390/ijms13010142.
 123. Muthusamy, V. and Piva, T.J. (2010) The UV response of the skin : a review of the MAPK , NF κ B and TNF α signal transduction pathways. *Arch Dermatol Res*, **302**,5–17. doi:10.1007/s00403-009-0994-y.
 124. Ibuki, Y. and Goto, R. (2000) Suppression of apoptosis by UVB irradiation: Survival signaling via PI3-kinase/Akt pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **279**,872–878. doi:10.1006/bbrc.2000.4018.
 125. Lewis, D.A. and Spandau, D.F. (2007) UVB activation of NF- κ B in normal human keratinocytes occurs via a unique mechanism. *Arch. Dermatol. Res.*, **299**,93–101. doi:10.1007/s00403-006-0729-2.
 126. Lee, Y.R., Noh, E.M., Jeong, E.Y., et al. (2009) Cordycepin inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase expression by suppressing the NF- κ B pathway in human dermal fibroblasts. *Exp. Mol. Med.*, **41**,548–554. doi:10.3858/emm.2009.41.8.060.

127. Anerillas, C., Abdelmohsen, K., and Gorospe, M. (2020) Regulation of senescence traits by MAPKs. *GeroScience*, **42**,397–408. doi:10.1007/s11357-020-00183-3.
128. Wei, Z. and Liu, H.T. (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.*, **12**,9–18. doi:10.1038/sj.cr.7290105.
129. Sato, M., Shegogue, D., Gore, E.A., Smith, E.A., McDermott, P.J., and Trojanowska, M. (2002) Role of p38 MAPK in transforming growth factor β stimulation of collagen production by scleroderma and healthy dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.*, **118**,704–711.
130. Angel, P., Szabowski, A., and Schorpp-Kistner, M. (2001) Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene*, **20**,2413–2423. doi:10.1038/sj.onc.1204380.
131. Lu, J., Guo, J.H., Tu, X.L., Zhang, C., Zhao, M., Zhang, Q.W., and Gao, F.H. (2016) Tiron inhibits UVB-induced AP-1 binding sites transcriptional activation on MMP-1 and MMP-3 promoters by MAPK signaling pathway in human dermal fibroblasts. *PLoS One*, **11**,1–14. doi:10.1371/journal.pone.0159998.
132. Huang, K.F., Ma, K.H., Jhap, T.Y., Liu, P.S., and Chueh, S.H. (2019) Ultraviolet B irradiation induced Nrf2 degradation occurs via activation of TRPV1 channels in human dermal fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.*, **141**,220–232.
133. Spinelli, J.B. and Haigis, M.C. (2018) The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat. Cell Biol.*, **20**,745–754.
134. Vakifahmetoglu-Norberg, H., Ouchida, A.T., and Norberg, E. (2017) The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **482**,426–431.
135. Hegedus, C., Boros, G., Fidrus, E., et al. (2019) PARP1 Inhibition Augments UVB-Mediated Mitochondrial Changes-Implications for UV-Induced DNA Repair and Photocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*, **12**. doi:10.3390/cancers12010005.
136. Surjana, D., Halliday, G.M., and Damian, D.L. (2013) Nicotinamide enhances repair of ultraviolet radiation-induced DNA damage in human keratinocytes and ex vivo skin. *Carcinogenesis*, **34**,1144–1149. doi:10.1093/carcin/bgt017.
137. Park, J., Halliday, G.M., Surjana, D., and Damian, D.L. (2010) Nicotinamide prevents ultraviolet radiation-induced cellular energy loss. *Photochem. Photobiol.*, **86**,942–948. doi:10.1111/j.1751-1097.2010.00746.x.
138. Schniertshauer, D., Müller, S., Mayr, T., Sonntag, T., Gebhard, D., and Bergemann, J. (2016) Accelerated Regeneration of ATP Level after Irradiation in Human Skin Fibroblasts by Coenzyme Q10. *Photochem. Photobiol.*, **92**,488–494. doi:10.1111/php.12583.
139. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., et al. (2018) Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.*, **25**,486–541. doi:10.1038/s41418-017-0012-4.
140. Julien, O. and Wells, J.A. (2017) Caspases and their substrates. *Cell Death Differ.*, 1380–1389. doi:10.1038/cdd.2017.44.
141. Fuentes-Prior, P. and Salvesen, G.S. (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.*, **384**,201–232.
142. Elmore, S. (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.*, **35**,495–516.

doi:10.1080/01926230701320337.

143. Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B., and Andrews, D.W. (2013) Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**,1–21. doi:10.1101/cshperspect.a008714.
144. Kale, J., Osterlund, E.J., and Andrews, D.W. (2018) BCL-2 family proteins: Changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ.*, **25**,65–80.
145. Aubrey, B.J., Kelly, G.L., Janic, A., Herold, M.J., and Strasser, A. (2018) How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.*, **25**,104–113.
146. Kocab, A.J. and Duckett, C.S. (2016) Inhibitor of apoptosis proteins as intracellular signaling intermediates. *FEBS J.*, **283**,221–231. doi:10.1111/febs.13554.
147. Dorstyn, L., Akey, C.W., and Kumar, S. (2018) New insights into apoptosome structure and function. *Cell Death Differ.*, **25**,1194–1208.
148. He, B., Lu, N., and Zhou, Z. (2009) Cellular and nuclear degradation during apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **21**,900–912.
149. Delcros, J.G. and Mehlen, P. (2013) Dependence receptors: Life or death choices. *Bull. Cancer*, **100**,1261–1274.
150. Dickens, L.S., Powley, I.R., Hughes, M.A., and MacFarlane, M. (2012) The “complexities” of life and death: Death receptor signalling platforms. *Exp. Cell Res.*, **318**,1269–1277.
151. Mompeán, M., Li, W., Li, J., Laage, S., Siemer, A.B., Bozkurt, G., Wu, H., and Mcdermott, A.E. (2018) The Structure of the Necrosome RIPK1-RIPK3 Core, a Human Hetero-Amyloid Signaling Complex. *Cell*, **173**,1244–1253. doi:10.1016/j.cell.2018.03.032.
152. Grootjans, S., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2017) Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. *Cell Death Differ.*, **24**,1184–1195.
153. Dondelinger, Y., Declercq, W., Montessuit, S., et al. (2014) MLKL Compromises Plasma Membrane Integrity by Binding to Phosphatidylinositol Phosphates. *Cell Rep.*, **7**,971–981.
154. Petrie, E.J., Sandow, J.J., Jacobsen, A. V., et al. (2018) Conformational switching of the pseudokinase domain promotes human MLKL tetramerization and cell death by necroptosis. *Nat. Commun.*, **9**. doi:10.1038/s41467-018-04714-7.
155. Kassab, M.A. and Yu, X. (2019) The role of dePARylation in DNA damage repair and cancer suppression. *DNA Repair (Amst.)*, **76**,20–29. doi:10.1016/j.dnarep.2019.02.002.
156. Fatokun, A.A., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2014) Parthanatos: Mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br. J. Pharmacol.*, **171**,2000–2016. doi:10.1111/bph.12416.
157. Sevrioukova, I.F. (2011) Apoptosis-inducing factor: Structure, function, and redox regulation. *Antioxidants Redox Signal.*, **14**,2545–2579. doi:10.1089/ars.2010.3445.
158. Yingfei, W., No Soo, K., Jean-Francois, H., et al. (2011) Poly (ADP-ribose) (PAR) Binding to Apoptosis-Inducing Factor Is Critical For PAR Polymerase-1-Dependent Cell Death (Parthanatos). *Sci. Signal.*, **4**,ra20. doi:10.1371/journal.pone.0178059.

159. Bano, D. and Prehn, J.H.M. (2018) Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer. *EBioMedicine*, **30**,29–37.
160. Jang, K.H., Do, Y.J., Son, D., Son, E., Choi, J.S., and Kim, E. (2017) AIF-independent parthanatos in the pathogenesis of dry age-related macular degeneration. *Cell Death Dis.*, **8**. doi:10.1038/cddis.2016.437.
161. Lachaier, E., Louandre, C., Ezzoukhry, Z., Godin, C., Mazière, J.C., Chauffert, B., and Galmiche, A. (2014) La ferroptose, une nouvelle forme de mort cellulaire applicable au traitement médical des cancers. *Medecine/Sciences*, **30**,779–783. doi:10.1051/medsci/20143008016.
162. Lei, P., Bai, T., and Sun, Y. (2019) Mechanisms of ferroptosis and relations with regulated cell death: A review. *Front. Physiol.*, **10**,1–13. doi:10.3389/fphys.2019.00139.
163. Shi, J., Gao, W., and Shao, F. (2017) Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. *Trends Biochem. Sci.*, **42**,245–254.
164. Wang, Y.Y., Liu, X.L., and Zhao, R. (2019) Induction of pyroptosis and its implications in cancer management. *Front. Oncol.*, **9**,1–10. doi:10.3389/fonc.2019.00971.
165. Izzo, V., Bravo-San Pedro, J.M., Sica, V., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2016) Mitochondrial Permeability Transition: New Findings and Persisting Uncertainties. *Trends Cell Biol.*, **26**,655–667.
166. Aits, S. and Jäättelä, M. (2013) Lysosomal cell death at a glance. *J. Cell Sci.*, **126**,1905–1912. doi:10.1242/jcs.091181.
167. Wang, F., Gómez-Sintes, R., and Boya, P. (2018) Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic*, **19**,918–931. doi:10.1111/tra.12613.
168. Denton, D. and Kumar, S. (2019) Autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ.*, **26**,605–616.
169. Martins, I., Raza, S.Q., Voisin, L., et al. (2017) Entosis: The emerging face of non-cell-autonomous type IV programmed death. *Biomed. J.*, **40**,133–140. doi:10.1016/j.bj.2017.05.001.
170. Krishna, S. and Overholtzer, M. (2016) Mechanisms and consequences of entosis. *Cell. Mol. Life Sci.*, **73**,2379–2386.
171. Vaux, D.L. and Korsmeyer, S.J. (1999) Cell Death in Development. *Cell*, **96**,245–254.
172. Gudipaty, S.A., Conner, C.M., Rosenblatt, J., and Montell, D.J. (2018) Unconventional Ways to Live and Die: Cell Death and Survival in Development, Homeostasis, and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **34**,311–332. doi:10.1146/annurev-cellbio-100616-060748.
173. LEVERKUS, M., YAAR, M., and GILCHREST, B.A. (1997) Fas / Fas Ligand Interaction Contributes to UV-Induced Apoptosis in Human Keratinocytes. *Exp. Cell Res.*, **232**,255–262.
174. Qin, J., Bacon, P., Panella, J., Sitailo, L.A., Denning, M.F., and Nickoloff, B.J. (2004) Low-Dose UV-Radiation Sensitizes Keratinocytes to TRAIL-Induced Apoptosis. *J. Cell. Physiol.*, **166**,155–166. doi:10.1002/jcp.20017.
175. Qin, J., Chaturvedi, V., Denning, M.F., Bacon, P., Panella, J., Choubey, D., and Nickoloff, B.J. (2002) Regulation of apoptosis by p53 in UV-irradiated human epidermis, psoriatic plaques and senescent keratinocytes. *Oncogene*, **21**,2991–3002. doi:10.1038/sj/onc/1205404.
176. Salucci, S., Burattini, S., Buontempo, F., Martelli, A.M., Falcieri, E., and Battistelli, M. (2017)

- Protective effect of different antioxidant agents in UVB-irradiated keratinocytes. *Eur. J. Histochem.*, **61**,215–221. doi:10.4081/ejh.2017.2784.
177. Sitailo, L.A., Tibudan, S.S., and Denning, M.F. (2002) Activation of Caspase-9 Is Required for UV-induced Apoptosis of Human Keratinocytes. *J. Biol. Chem.*, **277**,19346–19352. doi:10.1074/jbc.M200401200.
178. Heffernan, T.P., Kawasumi, M., Blasina, A., Conney, A.H., and Nghiem, P. (2009) ATR-Chk1 pathway inhibition promotes apoptosis after UV in primary human keratinocytes: potential basis for caffeine's UV protective effects. *J Invest Dermatol*, **129**,1805–1815. doi:10.1038/jid.2008.435.ATR-Chk1.
179. Kemp, M.G. and Sancar, A. (2016) ATR kinase inhibition protects non-cycling cells from the lethal effects of DNA damage and transcription stress. *J. Biol. Chem.*, **291**,9330–9342. doi:10.1074/jbc.M116.719740.
180. Assefa, Z., Laethem, A. Van., Garmyn, M., and Agostinis, P. (2005) Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes : On the role of cytosolic factors. *Biochim. Biophys. Acta*, **1755**,90–106. doi:10.1016/j.bbcan.2005.04.001.
181. Henseleit, U., Zhang, J., Reinhard, W., Haase, I., Kolde, G., and Roosenbach, T. (1997) Role of p53 in UVB-Induced Apoptosis in Human HaCaT Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, **109**,722–727. doi:10.1111/1523-1747.ep12340708.
182. Chaturvedi, V., Sitailo, L.A., Qin, J., et al. (2005) Knockdown of p53 levels in human keratinocytes accelerates Mcl-1 and Bcl-x L reduction thereby enhancing UV-light induced apoptosis. *Oncogene*, **24**,5299–5312. doi:10.1038/sj.onc.1208650.
183. Li, K., Zhang, M., Chen, H., et al. (2019) Anthocyanins from black peanut skin protect against UV-B induced keratinocyte cell and skin oxidative damage through activating Nrf 2 signaling. *Food Funct.*, **10**,6815–6828. doi:10.1039/c9fo00706g.
184. Lehman, T.A., Modali, R., Boukamp, P., et al. (1993) p53 Mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis*, **14**,833–839.
185. Schäfer, M., Dütsch, S., Auf Dem Keller, U., Navid, F., Schwarz, A., Johnson, D.A., Johnson, J.A., and Werner, S. (2010) Nrf2 establishes a glutathione-mediated gradient of UVB cytoprotection in the epidermis. *Genes Dev.*, **24**,1045–1058. doi:10.1101/gad.568810.
186. Ryu, H., Kim, C., Kim, J., Chung, J., and Kim, J. (2010) UVB Radiation Induces Apoptosis in Keratinocytes by Activating a Pathway Linked to ““ BLT2-Reactive Oxygen Species .”” *J. Invest. Dermatol.*, **130**,1095–1106.
187. Siegenthaler, B., Defila, C., Muzumdar, S., et al. (2018) Nrf3 promotes UV-induced keratinocyte apoptosis through suppression of cell adhesion. *Cell Death Differ.*, **25**,1749–1765. doi:10.1038/s41418-018-0074-y.
188. Naik, E., Michalak, E.M., Villunger, A., Adams, J.M., and Strasser, A. (2007) Ultraviolet radiation triggers apoptosis of fibroblasts and skin keratinocytes mainly via the BH3-only protein Noxa. *J. Cell Biol.*, **176**,415–424. doi:10.1083/jcb.200608070.
189. Feng, R., Han, J., Ziegler, J., Yang, M., and Castranova, V. (2012) Apaf-1 deficiency confers resistance to ultraviolet-induced apoptosis in mouse embryonic fibroblasts by disrupting reactive oxygen species amplification production and mitochondrial pathway. *Free Radic. Biol. Med.*, **52**,889–897.

190. Tomicic, M.T., Christmann, M., and Kaina, B. (2005) Apoptosis in UV-C light irradiated p53 wild-type, apaf-1 and p53 knockout mouse embryonic fibroblasts: Interplay of receptor and mitochondrial pathway. *Apoptosis*, **10**,1295–1304. doi:10.1007/s10495-005-1392-3.
191. Knezevic, D., Zhang, W., Rochette, P.J., and Brash, D.E. (2007) Bcl-2 is the target of a UV-inducible apoptosis switch and a node for UV signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**,11286–11291.
192. Lima-Bessa, K.M. de., Armelini, M.G., Chiganças, V., Jacysyn, J.F., Amarante-Mendes, G.P., Sarasin, A., and Menck, C.F.M. (2008) CPDs and 6-4PPs play different roles in UV-induced cell death in normal and NER-deficient human cells. *DNA Repair (Amst.)*, **7**,303–312. doi:10.1016/j.dnarep.2007.11.003.
193. Washio, F., Ueda, M., Ito, A., and Ichihashi, M. (1999) Higher susceptibility to apoptosis following ultraviolet B irradiation of xeroderma pigmentosum fibroblasts is accompanied by upregulation of p53 and downregulation of Bcl-2. *Br. J. Dermatol.*, **140**,1031–1037.
194. Imoto, K., Kobayashi, N., Katsumi, S., et al. (2002) The total amount of DNA damage determines ultraviolet-radiation-induced cytotoxicity after uniform or localized irradiation of human cells. *J. Invest. Dermatol.*, **119**,1177–1182.
195. Queille, S., Drougard, C., Sarasin, A., and Daya-Grosjean, L. (2001) Effects of XPD mutations on ultraviolet-induced apoptosis in relation to skin cancer-proneness in repair-deficient syndromes. *J. Invest. Dermatol.*, **117**,1162–1170.
196. Andrade-Lima, L.C., Andrade, L.N., and Menck, C.F.M. (2015) ATR suppresses apoptosis after UVB irradiation by controlling both translesion synthesis and alternative tolerance pathways. *J. Cell Sci.*, **128**,150–159. doi:10.1242/jcs.161596.
197. Hannan, M.A., Hellani, A., Al-Khodairy, F.M., et al. (2002) Deficiency in the repair of UV-induced DNA damage in human skin fibroblasts compromised for the ATM gene. *Carcinogenesis*, **23**,1617–1624. doi:10.1093/carcin/23.10.1617.
198. Xu, H., Yan, Y., Li, L., Peng, S., Qu, T., and Wang, B. (2010) Ultraviolet B-induced apoptosis of human skin fibroblasts involves activation of caspase-8 and -3 with increased expression of vimentin. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **26**,198–204.
199. Frank, S., Oliver, L., Lebreton-de Coster, C., et al. (2004) Infrared Radiation Affects the Mitochondrial Pathway of Apoptosis in Human Fibroblasts. *J Invest Dermatol*, **123**,823–831. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23472.x.
200. Lone A., N., Malik A., T., Naikoo H., S., Raghu R., S., and A. Tasduq, S. (2020) Trigonelline, a naturally occurring alkaloidal agent protects ultraviolet-B (UV-B) irradiation induced apoptotic cell death in human skin fibroblasts via attenuation of oxidative stress, restoration of cellular calcium homeostasis and prevention of endopl. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **202**,111720.
201. Hirota, A., Kawachi, Y., Itoh, K., et al. (2005) Ultraviolet A irradiation induces NF-E2-related factor 2 activation in dermal fibroblasts: Protective role in UVA-induced apoptosis. *J. Invest. Dermatol.*, **124**,825–832.
202. Huang, K.-F., Ma, K.-H., Hung, Y.-C., Lo, L.-C., Lin, K.C., Liu, P.-S., Hu, M.-K., and Chueh, S.-H. (2018) A new copper ionophore DPMQ protects cells against ultraviolet B irradiation by inhibiting the TRPV1 channel. *J Cell Physiol*,1–17. doi:10.1002/jcp.26861.
203. Kulms, D. and Schwarz, T. (2002) Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis. *Biochem. Pharmacol.*, **64**,837–841.

204. Lee, C.H., Wu, S.B., Hong, C.H., Yu, H.S., and Wei, Y.H. (2013) Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis and its effects on skin residential cells: The implication in UV-based phototherapy. *Int. J. Mol. Sci.*, **14**,6414–6435. doi:10.3390/ijms14036414.
205. Batista, L.F.Z., Kaina, B., Meneghini, R., and Menck, C.F.M. (2009) How DNA lesions are turned into powerful killing structures: Insights from UV-induced apoptosis. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.*, **681**,197–208. doi:10.1016/j.mrrev.2008.09.001.
206. Chiganças, V., Batista, L.F.Z., Brumatti, G., Amarante-Mendes, G.P., Yasui, a., and Menck, C.F.M. (2002) Photorepair of RNA polymerase arrest and apoptosis after ultraviolet irradiation in normal and XPB deficient rodent cells. *Cell Death Differ.*, **9**,1099–1107.
207. Azzouz, D., Khan, M.A., Swezey, N., and Palaniyar, N. (2018) Two-in-one: UV radiation simultaneously induces apoptosis and NETosis. *Cell Death Discov.*, **4**.
208. Harberts, E., Fischelevich, R., Liu, J., Atamas, S.P., and Gaspari, A.A. (2014) MyD88 mediates the decision to die by apoptosis or necroptosis after UV irradiation. *Innate Immun.*, **20**,529–539.
209. Cencer, C.S., Chintala, S.K., Townsend, T.J., et al. (2018) PARP-1/PAR Activity in Cultured Human Lens Epithelial Cells Exposed to Two Levels of UVB Light. *Photochem. Photobiol.*, **94**,126–138. doi:10.1111/php.12814.
210. Qin, X.J., Liu, W., Li, Y.N., Sun, X., Hai, C.X., Hudson, L.G., and Liu, K.J. (2012) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition by arsenite promotes the survival of cells with unrepaired DNA lesions induced by UV exposure. *Toxicol. Sci.*, **127**,120–129. doi:10.1093/toxsci/kfs099.
211. Murahashi, H., Azuma, H., Zamzami, N., Furuya, K., and Ikebuchi, K. (2003) Possible contribution of apoptosis-inducing factor (AIF) and reactive oxygen species (ROS) to UVB-induced caspase-independent cell death in the T cell line Jurkat Abstract : We analyzed the mechanism of UVB-induced cell death using the Jurkat T cell. **73**,399–406. doi:10.1189/jlb.0702335.Journal.
212. Zhou, Y., Feng, X., and Koh, D.W. (2011) Activation of cell death mediated by apoptosis-inducing factor due to the absence of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Biochemistry*, **50**,2850–2859. doi:10.1021/bi101829r.
213. Lehman, T.A., Modali, R., Boukamp, P., et al. (1993) p53 Mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis*, **14**,833–839.
214. Vodenicharov, M.D. (2005) Mechanism of early biphasic activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in response to ultraviolet B radiation. *J. Cell Sci.*, **118**,589–599.
215. Feller, L., Khammissa, R.A.G., Kramer, B., Altini, M., and Lemmer, J. (2016) Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the head and face. *Head Face Med.*, **12**,11.
216. Melnikova, V.O. and Ananthaswamy, H.N. (2005) Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, **571**,91–106. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.11.015.
217. Cao, K. and Tait, S.W.G. (2018) Apoptosis and Cancer: Force Awakens, Phantom Menace, or Both? 1st ed. Elsevier Inc. 135–152 p.
218. Zhang, W., Remenyik, E., Zelterman, D., Brash, D.E., and Wikonkal, N.M. (2001) Escaping the stem cell compartment : Sustained UVB exposure allows p53-mutant keratinocytes to colonize adjacent epidermal proliferating units without incurring additional mutations. *PNAS*, **98**,13948–13953.

219. Brash, D.E., Zhang, W., Grossman, D., and Takeuchi, S. (2005) Colonization of adjacent stem cell compartments by mutant keratinocytes. *Semin. Cancer Biol.*, **15**,97–102. doi:10.1016/j.semcancer.2004.08.006.
220. Zhang, W., Hanks, A.N., Boucher, K., Florell, S.R., Allen, S.M., Alexander, A., Brash, D.E., and Grossman, D. (2005) UVB-induced apoptosis drives clonal expansion during skin tumor development. *Carcinogenesis*, **26**,249–257. doi:10.1093/carcin/bgh300.
221. Huang, A., Garraway, L.A., Ashworth, A., and Weber, B. (2020) Synthetic lethality as an engine for cancer drug target discovery. *Nat Rev Drug Discov*, **19**,23–38.
222. Sepand, M.R., Ranjbar, S., Kempson, I.M., Akbariani, M., Muganda, W.C.A., Müller, M., Ghahremani, M.H., and Raoufi, M. (2020) Targeting non-apoptotic cell death in cancer treatment by nanomaterials: Recent advances and future outlook. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, **29**,102243.
223. Wang, P.-W., Hung, Y.-C., Lin, T.-Y., Fang, J.-Y., Yang, P.-M., Chen, M.-H., and Pan, T.-L. (2019) Comparison of the Biological Impact of UVA and UVB upon the Skin with Functional Proteomics and Immunohistochemistry. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, **8**,569.
224. Sasai, K., Yajima, H., and Suzuki, F. (2002) Suppression of postmitochondrial signaling and delayed response to UV-induced nuclear apoptosis in HeLa cells. *Japanese J. Cancer Res.*, **93**,275–283. doi:10.1111/j.1349-7006.2002.tb02169.x.
225. Zhong, J.L., Yiakouvaki, A., Holley, P., Tyrrell, R.M., and Pourzand, C. (2004) Susceptibility of skin cells to UVA-induced necrotic cell death reflects the intracellular level of labile iron. *J. Invest. Dermatol.*, **123**,771–780.
226. Appelqvist, H., Wäster, P., Eriksson, I., Rosdahl, I., and Öllinger, K. (2013) Lysosomal exocytosis and caspase-8-mediated apoptosis in UVA-irradiated keratinocytes. *J. Cell Sci.*, **126**,5578–5584. doi:10.1242/jcs.130633.
227. Takasawa, R., Nakamura, H., Mori, T., and Tanuma, S. (2005) Differential apoptotic pathways in human keratinocyte HaCaT cells exposed to UVB and UVC. *Apoptosis*, **10**,1121–1130.
228. Riedl, T., Hanaoka, F., and Egly, J.-M. (2003) The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *EMBO J.*, **22**,5293–5303.
229. Czaja, W., Mao, P., and Smerdon, M.J. (2012) The Emerging Roles of ATP-Dependent Chromatin Remodeling Enzymes in Nucleotide Excision Repair. *Int. J. Mol. Sci.*, **13**,11954–11973. doi:10.3390/ijms130911954.
230. Ray Chaudhuri, A. and Nussenzweig, A. (2017) The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**,610–621.
231. Wang, Y.H., Hariharan, A., Bastianello, G., Toyama, Y., Shivashankar, G. V., Foiani, M., and Sheetz, M.P. (2017) DNA damage causes rapid accumulation of phosphoinositides for ATR signaling. *Nat. Commun.*, **8**.
232. Hilton, B.A., Li, Z., Musich, P.R., et al. (2015) ATR Plays a Direct Antiapoptotic Role at Mitochondria, which Is Regulated by Prolyl Isomerase Pin1. *Mol. Cell*, **60**,35–46.
233. Shell, S.M., Li, Z., Shkriabai, N., et al. (2009) Checkpoint kinase ATR promotes nucleotide excision repair of UV-induced DNA damage via physical interaction with xeroderma pigmentosum group A. *J. Biol. Chem.*, **284**,24213–24222. doi:10.1074/jbc.M109.000745.

234. Lee, T.H., Park, J.M., Leem, S.H., and Kang, T.H. (2014) Coordinated regulation of XPA stability by ATR and HERC2 during nucleotide excision repair. *Oncogene*, **33**,19–25. doi:10.1038/onc.2012.539.
235. Debacq-chainiaux, F., Leduc, C., Verbeke, A., and Toussaint, O. (2012) UV , stress and aging. *Dermatoendocrinol.*, **4**,236–240.
236. Cavinato, M., Koziel, R., Romani, N., et al. (2017) UVB-induced senescence of human dermal fibroblasts involves impairment of proteasome and enhanced autophagic activity. *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **72**,632–639. doi:10.1093/gerona/glw150.
237. Debacq-Chainiaux, F., Borlon, C., Pascal, T., et al. (2005) Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF- β 1 signaling pathway. *J. Cell Sci.*, **118**,743–758. doi:10.1242/jcs.01651.
238. Cavinato, M. and Jansen-Dürr, P. (2017) Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin. *Exp. Gerontol.*, **94**,78–82.
239. Bernard, J.J., Gallo, R.L., and Krutmann, J. (2019) Photoimmunology : how ultraviolet radiation affects the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, **19**,688–701.
240. Schwarz, T. (2005) Mechanisms of UV-induced immunosuppression. *Keio J. Med.*, **54**,165–171. doi:10.2302/kjm.54.165.
241. Laikova, K. V., Oberemok, V. V., Krasnodubets, A.M., et al. (2019) Advances in the understanding of skin cancer: Ultraviolet radiation, mutations, and antisense oligonucleotides as anticancer drugs. *Molecules*, **24**. doi:10.3390/molecules24081516.
242. Sun, X., Zhang, N., Yin, C., Zhu, B., and Li, X. (2020) Ultraviolet Radiation and Melanomagenesis: From Mechanism to Immunotherapy. *Front. Oncol.*, **10**. doi:10.3389/fonc.2020.00951.
243. Thomas, N.E., Berwick, M., and Cordeiro-Stone, M. (2006) Could BRAF mutations in melanocytic lesions arise from DNA damage induced by ultraviolet radiation? *J. Invest. Dermatol.*, **126**,1693–1696.
244. Black, A.P.B. and Ogg, G.S. (2003) The role of p53 in the immunobiology of cutaneous squamous cell carcinoma. *Clin. Exp. Immunol.*, **132**,379–384. doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02159.x.
245. Shea, C.R., McNutt, N.S., Volkenandt, M., Lugo, J., Prioleau, P.G., and Albino, A.P. (1992) Overexpression of p53 protein in basal cell carcinomas of human skin. *Am. J. Pathol.*, **141**,25–29.
246. Pellegrini, C., Maturo, M.G., Di Nardo, L., Ciciarelli, V., Gutiérrez García-Rodrigo, C., and Fagnoli, M.C. (2017) Understanding the molecular genetics of basal cell carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.*, **18**. doi:10.3390/ijms18112485.
247. Bradford, P.T., Goldstein, A.M., Tamura, D., et al. (2011) Cancer and neurologic degeneration in xeroderma pigmentosum: long term follow-up characterises the role of DNA repair. *J. Med. Genet.*, **48**,168–176. doi:10.1136/jmg.2010.083022.
248. Sahai, E., Astsaturon, I., Cukierman, E., et al. (2020) A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Rev. Cancer*, **20**,174–186.
249. Lee, M. and Lee, J.S. (2014) Exploiting tumor cell senescence in anticancer therapy. *BMB Rep.*, **47**,51–59. doi:10.5483/BMBRep.2014.47.2.005.
250. He, S. and Sharpless, N.E. (2017) Senescence in Health and Disease. *Cell*, **169**,1000–1011.

doi:10.1016/j.cell.2017.05.015.

251. Callaghan, T.M. and Wilhelm, K.-P. (2008) A review of ageing and an examination of clinical methods in the assessment of ageing skin. Part I: Cellular and molecular perspectives of skin ageing. *Int. J. Cosmet. Sci.*, **30**,313–322. doi:10.1111/j.1468-2494.2008.00454.x.
252. Watson, R.E.B., Gibbs, N.K., Griffiths, C.E.M., and Sherratt, M.J. (2014) Damage to skin extracellular matrix induced by UV exposure. *Antioxidants Redox Signal.*, **21**,1063–1077. doi:10.1089/ars.2013.5653.
253. Scharffetter-Kochanek, K., Brenneisen, P., Wenk, J., Herrmann, G., Ma, W., Kuhr, L., Meewes, C., and Wlaschek, M. (2000) Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp. Gerontol.*, **35**,307–316. doi:10.1016/S0531-5565(00)00098-X.
254. Bosch, R., Philips, N., Suárez-Pérez, J., Juarranz, A., Devmurari, A., Chalensouk-Khaosaat, J., and González, S. (2015) Mechanisms of Photoaging and Cutaneous Photocarcinogenesis, and Photoprotective Strategies with Phytochemicals. *Antioxidants*, **4**,248–268.
255. Xu, Y. and Fisher, G.J. (2005) Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. *J. Dermatol. Sci.*, **1**,1–8. doi:10.1016/j.descs.2005.06.002.
256. Quan, T., He, T., Kang, S., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J. (2002) Ultraviolet Irradiation Alters Transforming Growth Factor β /Smad Pathway in Human Skin In Vivo. *J. Invest. Dermatol.*, **119**,499–506.
257. Quan, T., He, T., Kang, S., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J. (2004) Solar Ultraviolet Irradiation Reduces Collagen in Photoaged Human Skin by Blocking Transforming Growth Factor- β Type II Receptor / Smad Signaling. *Am. J. Pathol.*, **165**,741–751.
258. Sakura, M., Chiba, Y., Kamiya, E., et al. (2014) Differences in the Histopathology and Cytokine Expression Pattern between Chronological Aging and Photoaging of Hairless Mice Skin. *Mod. Res. Inflamm.*, **3**,82–89.
259. Yoshizumi, M., Nakamura, T., Kato, M., Ishioka, T., Kozawa, K., Wakamatsu, K., and Kimura, H. (2008) Release of cytokines / chemokines and cell death in UVB-irradiated human keratinocytes , HaCaT. *Cell Biol. Int.*, **32**,1405–1411. doi:10.1016/j.cellbi.2008.08.011.
260. Dzemaili, E. and Bolzinger, M.A. (2016) Le photovieillissement: aspects cliniques, mécanismes biologiques mis en jeu et transmission du message scientifique à travers la construction d'un outil pédagogique : le poster scientifique UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1.
261. Wang, Y., Michikawa, Y., Mallidis, C., et al. (2001) Muscle-specific mutations accumulate with aging in critical human mtDNA control sites for replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**,4022–4027.
262. Michikawa, Y., Mazzucchelli, F., Bresolin, N., Scarlato, G., and Attardi, G. (1999) Aging-Dependent Large Accumulation of Point Mutations in the Human mtDNA Control Region for Replication. *Am. Assoc. Adv. Sci.*, **286**,774–779.
263. Kujoth, G.C., Bradshaw, P.C., Haroon, S., and Prolla, T.A. (2007) The role of mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *PLoS Genet.*, **3**,0161–0173. doi:10.1371/journal.pgen.0030024.
264. Meissner, C., Bruse, P., Mohamed, S.A., Schulz, A., Warnk, H., Storm, T., and Oehmichen, M. (2008) The 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in human skeletal muscle, heart and different areas of the brain: A useful biomarker or more? *Exp. Gerontol.*, **43**,645–652. doi:10.1016/j.exger.2008.03.004.

265. Zsurka, G., Peeva, V., Kotlyar, A., and Kunz, W.S. (2018) Is there still any role for oxidative stress in mitochondrial DNA-dependent aging? *Genes (Basel)*, **9**. doi:10.3390/genes9040175.
266. Krishnan, K.J., Harbottle, A., and Birch-Machin, M.A. (2004) The use of a 3895 bp mitochondrial DNA deletion as a marker for sunlight exposure in human skin. *J. Invest. Dermatol.*, **123**,1020–1024.
267. Eshaghian, A., Vleugels, R.A., Canter, J.A., McDonald, M.A., Stasko, T., and Sligh, J.E. (2006) Mitochondrial DNA deletions serve as biomarkers of aging in the skin, but are typically absent in nonmelanoma skin cancers. *J. Invest. Dermatol.*, **126**,336–344.
268. Nanda, G.G. and Alone, D.P. (2019) Review: Current understanding of the pathogenesis of fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Mol. Vis.*, **25**,295–310.
269. Zhou, H., Zhang, H., Yu, A., and Xie, J. (2018) Association between sunlight exposure and risk of age-related macular degeneration: A meta-analysis. *BMC Ophthalmol.*, **18**,1–8. doi:10.1186/s12886-018-1004-y.
270. Gendron, P., Desgarnier, M.D., Mallet, J.D., and Rochette, P.J. (2014) Invited Review Implication of ultraviolet light in the etiology of uveal melanoma : A review,15–21. doi:10.1111/php.12161.
271. Ivanov, I. V., Mappes, T., Schaupp, P., Lappe, C., and Wahl, S. (2018) Ultraviolet radiation oxidative stress affects eye health. *J. Biophotonics*, **11**,1–13. doi:10.1002/jbio.201700377.
272. Kimlin, M.G. (2008) Geographic location and vitamin D synthesis. *Mol. Aspects Med.*, **29**,453–461.
273. Passeron, T., Bouillon, R., Callender, V., et al. (2019) Sunscreen photoprotection and vitamin D status. *Br. J. Dermatol.*, **181**,916–931. doi:10.1111/bjd.17992.
274. Nair, R. and Maseeh, A. (2012) Vitamin D: The sunshine vitamin. *J. Pharmacol. Pharmacother.*, **3**,118–126. doi:10.4103/0976-500X.95506.
275. Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A., and Tymińska, A. (2013) Skin melanocytes: Biology and development. *Postep. Dermatologii i Alergol.*, **30**,30–41. doi:10.5114/pdia.2013.33376.
276. Fitzpatrick, T.B. (1988) The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I Through VI. *Arch. Dermatol.*, **124**,869–871.
277. Nasti, T.H. and Timares, L. (2015) MC1R, eumelanin and pheomelanin: their role in determining the susceptibility to skin cancer. *Photochem. Photobiol.*, **91**,188–200.
278. Fajuyigbe, D. and Young, A.R. (2016) The impact of skin colour on human photobiological responses. *Pigment Cell Melanoma Res.*, **29**,607–618. doi:10.1111/pcmr.12511.
279. Napolitano, A., Panzella, L., Monfrecola, G., and d'Ischia, M. (2014) Pheomelanin-induced oxidative stress: Bright and dark chemistry bridging red hair phenotype and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.*, **27**,721–733. doi:10.1111/pcmr.12262.
280. Yamaguchi, Y., Takahashi, K., Zmudzka, B.Z., et al. (2006) Human skin responses to UV radiation: pigment in the upper epidermis protects against DNA damage in the lower epidermis and facilitates apoptosis. *FASEB J.*, **20**,1486–1488. doi:10.1096/fj.06-5725fje.
281. Fajuyigbe, D., Lwin, S.M., Diffey, B.L., Baker, R., Tobin, D.J., Sarkany, R.P.E., and Young, A.R. (2018) Melanin distribution in human epidermis affords localized protection against DNA photodamage and concurs with skin cancer incidence difference in extreme phototypes. *FASEB J.*, **32**,3700–3706. doi:10.1096/fj.201701472R.

282. Drigeard Desgarnier, M.-C., Fournier, F., Droit, A., and Rochette, P.J. (2017) Influence of a pre-stimulation with chronic low-dose UVB on stress response mechanisms in human skin fibroblasts. *PLoS One*, **12**,e0173740.
283. Desgarnier, M.D. and Rochette, P.J. (2018) Enhancement of UVB-induced DNA damage repair after a chronic low-dose UVB pre-stimulation. *DNA Repair (Amst)*, **63**,56–62.
284. Droit, A., Desgarnier, M.D., and Rochette, J. (2017) Influence of a pre-stimulation with chronic low-dose UVB on stress response mechanisms in human skin fibroblasts,1–20.
285. Gary, A.S. and Rochette, P.J. (2020) Apoptosis, the only cell death pathway that can be measured in human diploid dermal fibroblasts following lethal UVB irradiation. *Sci. Rep.*, **10**,1–11.
286. Liao, D., Sun, L., Liu, W., He, S., Wang, X., and Lei, X. (2014) Necrosulfonamide inhibits necroptosis by selectively targeting the mixed lineage kinase domain-like protein. *Medchemcomm*, **5**,333–337. doi:10.1039/c3md00278k.
287. Bansal, N., Sciabola, S., and Bhisetti, G. (2019) Understanding allosteric interactions in hMLKL protein that modulate necroptosis and its inhibition. *Sci. Rep.*, **9**,1–11. doi:10.1038/s41598-019-53078-5.
288. Degtarev, A., Ofengeim, D., and Yuan, J. (2019) Targeting RIPK1 for the treatment of human diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **116**,9714–9722. doi:10.1073/pnas.1901179116.
289. Pasparakis, M. and Vandenabeele, P. (2015) Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, **517**,311–320. doi:10.1038/nature14191.
290. Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Duellman, S., Benink, H.A., Worzella, T.J., and Minor, L. (2004) Cell Viability Assays. In: Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>, editor. Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual. pp. 1–25.
291. Riss, T., Niles, A., Moravec, R., Karassina, N., and Vidugiriene, J. (2019) Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells. Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. pp. 1–15.
292. Jiang, L., Tixeira, R., Caruso, S., Atkin-Smith, G.K., Baxter, A.A., Paone, S., Hulett, M.D., and Poon, I.K.H. (2016) Monitoring the progression of cell death and the disassembly of dying cells by flow cytometry. *Nat. Protoc.*, **11**,655–663.
293. Wallberg, F., Tenev, T., and Meier, P. (2016) Analysis of apoptosis and necroptosis by fluorescence-activated cell sorting. *Cold Spring Harb. Protoc.*, **2016**,347–352. doi:10.1101/pdb.prot087387.
294. Shlomovitz, I., Speir, M., and Gerlic, M. (2019) Flipping the dogma – phosphatidylserine in non-apoptotic cell death. *Cell Commun. Signal.*, **17**,139.
295. Malyuchenko, N. V., Kotova, E.Y., Kulaeva, O.I., Kirpichnikov, M.P., and Studitskiy, V.M. (2015) PARP1 Inhibitors: antitumor drug design. *Acta Naturae*, **7**,27–37.
296. Vandenabeele, P., Grootjans, S., Callewaert, N., and Takahashi, N. (2013) Necrostatin-1 blocks both RIPK1 and IDO: consequences for the study of cell death in experimental disease models. *Cell Death Differ.*, **20**,185–187.

297. Tang, H.M. and Tang, H.L. (2018) Anastasis: recovery from the brink of cell death. *R. Soc. open Sci.*, **5**,180442.
298. Eroglu, M. and Derry, W.B. (2016) Your neighbours matter-non-autonomous control of apoptosis in development and disease. *Cell Death Differ.*, **23**,1110–1118.
299. Kerr, J.B. and Fioletov, V.E. (2008) Surface ultraviolet radiation. *Atmos. - Ocean*, **46**,159–184. doi:10.3137/ao.460108.
300. Moriwaki, K., Balaji, S., McQuade, T., Malhotra, N., Kang, J., and Chan, F.K.M. (2014) The Necroptosis Adaptor RIPK3 Promotes Injury-Induced Cytokine Expression and Tissue Repair. *Immunity*, **41**,567–578.
301. Moriwaki, K., Balaji, S., Bertin, J., Gough, P.J., and Chan, F.K.M. (2017) Distinct Kinase-Independent Role of RIPK3 in CD11c+ Mononuclear Phagocytes in Cytokine-Induced Tissue Repair. *Cell Rep.*, **18**,2441–2451.
302. Imamura, M., Moon, J.S., Chung, K.P., et al. (2018) RIPK3 promotes kidney fibrosis via AKT-dependent ATP citrate lyase. *JCI insight*, **3**,1–14. doi:10.1172/jci.insight.94979.
303. Cao, W.X., Li, T., Tang, Z.H., et al. (2018) MLKL mediates apoptosis via a mutual regulation with PERK/eIF2 α pathway in response to reactive oxygen species generation. *Apoptosis*, **23**,521–531.
304. Yoon, S., Kovalenko, A., Bogdanov, K., and Wallach, D. (2017) MLKL, the Protein that Mediates Necroptosis, Also Regulates Endosomal Trafficking and Extracellular Vesicle Generation. *Immunity*, **47**,51-65.e7.
305. Peng, L., Wang, Y., Yang, B., Qin, Q., Song, E., and Song, Y. (2020) Polychlorinated biphenyl quinone regulates MLKL phosphorylation that stimulates exosome biogenesis and secretion via a short negative feedback loop. *Environ. Pollut.*,115606.
306. Mallet, J.D., Dorr, M.M., and Desgarnier, M.D. (2016) Faster DNA Repair of Ultraviolet-Induced Cyclobutane Pyrimidine Dimers and Lower Sensitivity to Apoptosis in Human Corneal Epithelial Cells than in Epidermal Keratinocytes,1–22. doi:10.1371/journal.pone.0162212.
307. Dorr, M.M., Guignard, R., Auger, F.A., and Rochette, P.J. (2020) The use of tissue-engineered skin to demonstrate the negative effect of CXCL5 on epidermal ultraviolet radiation-induced cyclobutane pyrimidine dimer repair efficiency. *Br. J. Dermatol.*,123–132. doi:10.1111/bjd.19117.
308. Hoffmann, K., Kaspar, K., Von Kobyletzki, G., Stücker, M., and Altmeyer, P. (1999) UV transmission and UV protection factor (UPF) measured on split skin following exposure to UVB radiation - Correlation with the minimal erythema dose (MED). *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **15**,133–139. doi:10.1111/j.1600-0781.1999.tb00073.x.
309. Chiquet, M., Gelman, L., Lutz, R., and Maier, S. (2009) From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, **1793**,911–920.
310. Marastoni, S., Ligresti, G., Lorenzon, E., Colombatti, A., and Mongiat, M. (2008) Extracellular matrix: A matter of life and death. *Connect. Tissue Res.*, **49**,203–206. doi:10.1080/03008200802143190.
311. Clause, K.C. and Barker, T.H. (2013) Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **24**,830–833.
312. Rognoni, E. and Watt, F.M. (2018) Skin Cell Heterogeneity in Development, Wound Healing, and

Cancer. Trends Cell Biol., **28**,709–722.

313. Larouche, D., Paquet, C., Fradette, J., Carrier, P., Auger, F.A., and Germain, L. (2009) Regeneration of skin and cornea by tissue engineering. *Methods Mol. Biol.*, **482**,233–256. doi:10.1007/978-1-59745-060-7_15.
314. Michel, M., L'Heureux, N., Pouliot, R., Xu, W., Auger, F.A., and Germain, L. (1999) Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.*, **35**,318–326. doi:10.1007/s11626-999-0081-x.
315. Kalluri, R. and LeBleu, V.S. (2020) The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science (80-.)*, **367**. doi:10.1126/science.aau6977.
316. Simeone, P., Bologna, G., Lanuti, P., et al. (2020) Extracellular vesicles as signaling mediators and disease biomarkers across biological barriers. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**,1–27. doi:10.3390/ijms21072514.
317. Caruso, S. and Poon, I.K.H. (2018) Apoptotic cell-derived extracellular vesicles: More than just debris. *Front. Immunol.*, **9**. doi:10.3389/fimmu.2018.01486.
318. Bin, B.H., Kim, D.K., Kim, N.H., et al. (2016) Fibronectin-Containing Extracellular Vesicles Protect Melanocytes against Ultraviolet Radiation-Induced Cytotoxicity. *J. Invest. Dermatol.*, **136**,957–966.
319. Wäster, P., Eriksson, I., Vainikka, L., Rosdahl, I., and Öllinger, K. (2016) Extracellular vesicles are transferred from melanocytes to keratinocytes after UVA irradiation. *Sci. Rep.*, **6**,1–13.
320. Robu, M., Shah, R.G., Petitclerc, N., Brind'amour, J., Kandan-Kulangara, F., and Shah, G.M. (2013) Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the removal of UV-induced DNA lesions by nucleotide excision repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **110**,1658–1663. doi:10.1073/pnas.1209507110.
321. Gary, A.-S., Dorr, M.M., and Rochette, P.J. (2021) The T414G mitochondrial DNA mutation: a biomarker of aging in human eye. *Mutagenesis*,. doi:10.1093/mutage/geab003.
322. Osborne, N.N., Lascaratos, G., Bron, A.J., Chidlow, G., and Wood, J.P.M. (2006) A hypothesis to suggest that light is a risk factor in glaucoma and the mitochondrial optic neuropathies. *Br. J. Ophthalmol.*, **90**,237–241. doi:10.1136/bjo.2005.082230.
323. Feoktistova, M. and Panayotova-Dimitrova, D. (2017) Overcoming cell death resistance in skin cancer therapy: Novel translational perspectives. *Exp. Dermatol.*, **26**,854–857. doi:10.1111/exd.13309.
324. Hartman, M.L. (2020) Non-apoptotic cell death signaling pathways in melanoma. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**,1–29. doi:10.3390/ijms21082980.
325. Li, J., Huang, S., Zeng, L., et al. (2020) Necroptosis in head and neck squamous cell carcinoma: characterization of clinicopathological relevance and in vitro cell model. *Cell Death Dis.*, **11**.
326. Geserick, P., Wang, J., Schilling, R., et al. (2015) Absence of RIPK3 predicts necroptosis resistance in malignant melanoma. *Cell Death Dis.*, **6**,e1884-12.

Annexe 1 : The T414G mitochondrial DNA mutation: a biomarker of aging in human eye

Mutagenesis, PMID: 33453104, DOI: 10.1093/mutage/geab003

Anne-Sophie Gary ^{1,2,#}, Marie M Dorr ^{1,2,#} and Patrick J. Rochette ^{1,2,3,*}

1. Centre de Recherche du CHU de Québec – Université Laval, Axe Médecine Régénératrice, Hôpital du Saint-Sacrement, Québec, Canada
2. Centre LOEX de l'Université Laval, Québec, Canada
3. Université Laval, Faculté de Médecine, Département d'Ophtalmologie, Université Laval, Québec, Canada.

These authors contributed equally to this work

* Corresponding author:

Dr. Patrick J. Rochette

Centre de recherche du CHU de Québec – Université Laval

Axe médecine Régénératrice

Hôpital du Saint-Sacrement, Bureau H2-10

1050 Chemin Sainte-Foy, Québec, Qc, Canada, G1S 4L8

Phone: (418) 682-7568

E-mail: Patrick-J.Rochette@crchudequebec.ulaval.ca

Nous remercions Oxford University Press de laisser le droit aux auteurs d'inclure l'article dans une thèse.

We are are grateful to Oxford University Press for allowing authors the right to include the article in a thesis.

A1- 1 Résumé en français

La mutation mitochondriale T414G s'accumule dans la peau exposée au soleil en fonction de l'âge. L'œil humain est également exposé aux rayons nocifs du soleil. Plus précisément, les structures antérieures de l'œil (cornée, iris) filtrent les rayons UV et la partie postérieure de l'œil (rétine) est exposée à la lumière visible. Ces rayons peuvent promouvoir des mutations dans l'ADN mitochondrial comme la mutation T414G, mais celle-ci n'a jamais été étudiée dans les structures oculaires humaines. Dans cette étude, nous avons développé une technique pour évaluer précisément l'occurrence de la mutation T414G et l'avons quantifié dans différentes structures oculaires humaines. Nous avons trouvé une accumulation de cette mutation dépendante de l'âge dans le stroma cornéen et dans l'iris. Ces deux structures oculaires antérieures sont exposées aux rayons UV solaires, suggérant que la mutation T414G est le résultat d'une exposition solaire cumulative. Ainsi, la mutation T414G pourrait être un marqueur du photo-vieillessement.

A1- 2 Résumé en anglais

The mitochondrial mutation T414G (mtDNA^{T414G}) has been shown to accumulate in aged and sun-exposed skin. The human eye is also exposed to solar harmful rays. More precisely, the anterior structures of the eye (cornea, iris) filter UV rays and the posterior portion of the eye (retina) is exposed to visible light. These rays can catalyze mutations in mitochondrial DNA such as the mtDNA^{T414G}, but the latter has never been investigated in the human ocular structures. In this study, we have developed a technique to precisely assess the occurrence of mtDNA^{T414G}. Using this technique, we have quantified mtDNA^{T414G} in different human ocular structures. We found an age-dependent accumulation of mtDNA^{T414G} in the corneal stroma, the cellular layer conferring transparency and rigidity to the human cornea, and in the iris. Since cornea and iris are 2 anterior ocular structures exposed to solar UV rays, this suggest that the mtDNA^{T414G} mutation is resulting from cumulative solar exposure and this could make the mtDNA^{T414G} a good marker of solar exposure. We have previously shown that the mtDNA^{CD4977} and mtDNA³⁸⁹⁵ deletions accumulate over time in photo-exposed ocular structures. With the addition of mtDNA^{T414G} mutation, it becomes feasible to combine the levels of these different mtDNA mutations to obtain an accurate assessment of the solar exposure that an individual has accumulated during his/her lifetime.

A1- 3 Introduction

The human mitochondrial DNA (mtDNA), a double-stranded 16 569 bp circular DNA, can be found in up to 100 000 copies in each human cell [1–3]. Compared to genomic DNA, mitochondrial DNA (mtDNA) is highly susceptible to various mutations such as deletions and point mutations [4–7]. The lack of histones and the absence of nucleotide excision repair system explain, at least in part, this sensitivity to mutations [8–10]. MtDNA mutations can be induced by exogenous or endogenous factors. Endogenously, ATP production by mitochondrial oxidative phosphorylation generates reactive oxygen species (ROS) [11–14]. Exogenously, ROS can be induced by solar and artificial light exposure, especially by ultraviolets (UV; 100-400nm) and high-energy visible light (HEV; 400-500nm)[15–18]. Oxidative stress caused by the accumulation of ROS can lead to the formation of mutagenic mtDNA damage [11,19].

The presence of multiple mtDNA copies makes mtDNA mutations heteroplasmic (mixture of wildtype and mutant mtDNA in a given cell). Accumulation of some mitochondrial mutations in aged tissues has been explained by a theoretical vicious cycle [20]. Indeed, it has been proposed that endogenous and/or exogenous oxidative stress alter mtDNA integrity, which triggers respiratory function deficiency. This inefficient mitochondrial respiratory function leads to an increased production of ROS [21,22]. This theory is still controversial, and the question remains as to whether mtDNA alterations accumulate with age, or accumulation of mutations causes tissue-aging. Since mtDNA mutations are tolerated and can be catalysed by solar exposure [19], it has been proposed that they can be used as biomarkers of photoaging [23,24]. Such biomarkers could thus be used to determine the implication of cumulative ocular solar exposition in diseases.

Skin and eye are the two main organs exposed to solar radiation. Some mtDNA large deletions have been shown to accumulate in sun-exposed skin, such as the common mtDNA deletion of 4977 bp (mtDNA^{CD4977}) and the 3895 bp mtDNA deletion (mtDNA³⁸⁹⁵) [25–27]. We have previously measured those two mtDNA deletions in different ocular structures and we found that they both accumulate with age in the corneal stroma, the layer conferring rigidity and transparency to the cornea [28,29]. This led us to hypothesise that they could be

used as ocular photo-aging biomarkers. MtDNA³⁸⁹⁵ also accumulates in the macular region of the neural retina and the retinal pigment epithelium (RPE) suggesting a role of solar exposure in the formation of this deletion [29]. Another mutation, a T to G transversion (mtDNA^{T414G}), localized on the light strand promoter binding site of the control region, has been shown to accumulate in aged and sun-exposed skin [25] .

In this study, we have developed a Q-PCR technique to precisely assess the occurrence of mtDNA^{T414G}. Using this technique, we have quantified mtDNA^{T414G} in different human ocular structures. Similarly to the mtDNA³⁸⁹⁵ and mtDNA^{CD4977}, we found an age-dependent accumulation of mtDNA^{T414G} in the corneal stroma but there was no significant difference in the macula or periphery of neural retina or RPE. We found an age-dependent accumulation of mtDNA^{T414G} mutation in the iris. To our knowledge, the mtDNA^{T414G} is the first mutation to accumulate in the iris region and could potentially act as a new biomarker of photo-aging in the iris.

A1- 4 Matériel et méthodes

All experiments performed in this study were conducted in accordance with our institution's guidelines and the Declaration of Helsinki. The research protocols received approval by the CHU de Québec institutional committee for the protection of human subjects.

Human ocular structures isolation and DNA purification

We used a total of 64 human eyes from 38 to 94 -year-old post mortem donors unsuitable for transplantation provided by La Banques d'Yeux du Centre Universitaire d'Ophtalmologie, Québec, Canada) [28–30]. Transplantation exclusion criteria are based on the tissue quality criteria (e.g. scars). The eyes were enucleated no later than 1h after death and dissected upon reception, 24 to 48h post enucleation. The cornea, iris and neural retina were dissected from whole ocular globes and washed in 1x phosphate buffer saline (PBS). To isolate the epithelium, stroma and endothelium, the corneas were incubated in HEPES buffer (0.01 M HEPES, pH 7.45; 0.142 M NaCl, 6.7 mM KCl and 1 mM CaCl₂) containing 2 mg/mL dispase II (Roche Applied Science) for 18h at 4°C. The epithelium and endothelium were then mechanically separated from the stroma, and the structures were washed in 1x PBS. The retinal pigment epithelium (RPE) was isolated by incubation of the posterior portion of the eye in HEPES buffer supplemented with 2 mg/ml dispase II for 45min at 37°C. After mechanical isolation of the RPE from the choroid, RPE was washed in 1x PBS. Total DNA (genomic and mitochondrial) was then isolated using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol with a RNase treatment. DNA extracted from layers containing melanin (iris, RPE and retina), were purified using MicroBiospin 6 chromatography columns (Bio-Rad Laboratories) to remove traces of melanin.

MtDNA^{T414G} level analysis by Q-PCR

MtDNA^{T414G} and total mtDNA levels were quantified using a Rotor-Gene Q real-time thermocycler (Qiagen). Primers were designed and are depicted in Table 1. The Q-PCR was performed using Brilliant II SYBR-Green (Agilent). Primers to detect total mtDNA (F5 and R4) has been used to amplify a sequence of 115 bp. A standard curve (10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005 and 0.001 ng total DNA/reaction) was performed with total mtDNA primers for

each tested sample. Using the standard curve, we derived a fitting logarithmic curve to determine the DNA amount (ng) in function of the Ct. A second set of primers (R4 and mutF3) were designed to amplify a sequence of 80 bp only when the mtDNA^{T414G} mutation was present (Figure 1). The amplification using those primers was done with 10 to 40 ng of total DNA. The amplification level of mtDNA^{T414G} was compared to the standard curve, and a DNA quantity corresponding to the mtDNA containing the T414G mutation was calculated. The ratio of ‘‘mtDNA molecules containing the T414G mutation’’ to the ‘‘total mtDNA molecules’’ was thus calculated (i.e. mtDNA^{T414G}/total mtDNA). Q-PCR were performed in 16ul total volume with Brilliant II SYBR Green master mix and 0.4uM of each primer. Q-PCR cycling conditions were as follow: 10min Hold at 95°C, followed by 40 cycles of 30s at 95°C and 45s at 65.7°C.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 5, GraphPad software. Since mtDNA^{T414G} level data did not follow a normal distribution between samples, we used two non-parametric tests to determine the significance. A Wilcoxon matched-paired rank test (two-tailed) was used to compare the mtDNA level of paired samples, such as different structures from the same subjects. When samples were not paired, a Mann-Whitney Test (two-tailed) was performed to compared two conditions, for example to analyse the ratio mtDNA^{T414G} /total mtDNA of a structure in two groups of different age.

A1- 5 Résultats

We developed a Q-PCR based-technique to precisely evaluate the mtDNA^{T414G}/total mtDNA ratio in the different structures of human eye. To specifically assess this ratio, we used three primers forming two sets. Two primers are placed on each side of the mutation (R4 in position 348-370 and F5 in position 437-462) in order to amplify the fragment proportionally to the total mtDNA levels in the sample. In combination with R4 primer, a third primer recognises the sequence near the mutation (mutF3 in position 414-441). This primer contains two mismatched nucleotides including the G at position 414 (Table 1). Using precise temperature that allows annealing of the primer mutF3 only when the T414G mutation is present, we could selectively amplify mutated mtDNA. Using the Q-PCR data, we derived the “mtDNA molecules containing T414G mutation / total mtDNA molecule” (mtDNA^{T414G}/mtDNA) ratio. This strategy corrects for the variation of mtDNA copy in each cell.

MtDNA^{T414G} occurrence in the human eye

We quantified the mtDNA^{T414G}/total mtDNA ratio in the different ocular structures, i.e. cornea, iris and neural retina, from 7 different subjects. MtDNA^{T414G} level was significantly higher in the iris when compared to cornea and neural retina ($p < 0.02$). Indeed, the median mtDNA^{T414G} levels for the iris, cornea and neural retina were 0.051%, 0.021% and 0.012 %, respectively (Figure 2). No statistical difference was found between the cornea and the neural retina.

MtDNA^{T414G} accumulates with age in the human iris

The higher level of mtDNA^{T414G} in the iris led us to investigate the potential accumulation of this mutation with age in this ocular structure. We used 26 different individuals that were arbitrary divided in two groups ranging from 38 to 69 years old for the younger group, and from 70 to 94 years old for the second group. MtDNA^{T414G}/total mtDNA ratio was significantly higher in the human iris of the older group ($p < 0.02$). Median mtDNA^{T414G} values were 0.052% and 0.091% for the younger and the older groups, respectively (Figure 3). This result indicates an age-related accumulation of mtDNA^{T414G} in human iris.

MtDNA^{T414G} analysis in corneal layers

Human cornea is composed of three cellular layers, i.e. epithelium, stroma and endothelium. We assessed the mutation levels in those 3 layers from 9 subjects (Figure 4). We found significantly more mtDNA^{T414G} in the corneal stroma in comparison to the corneal epithelium and endothelium ($p < 0.04$), with median values of 0.043%, 0.003% and 0.013%, respectively.

MtDNA^{T414G} accumulates with age in the corneal stroma

Similar to the analysis in the iris, we evaluated mtDNA^{T414G} occurrence in corneal stroma according to age. The younger group was chosen between 38 to 69 years old with 14 subjects, while the older group contains 23 subjects from 70 to 94 years old. There was more variation in mtDNA^{T414G}/total mtDNA ratio in the older group. Nonetheless, there was significantly ($p < 0.005$) more mtDNA^{T414G} mutations in the older group (median 0.017%) when compared with the younger group (median 0.007%). As observed in the iris, mtDNA^{T414G} mutation accumulates in corneal stroma with age.

MtDNA^{T414G} in human neural retina and RPE

We investigated mtDNA^{T414G}/total mtDNA ratio more precisely in neural retina and RPE by discriminating macular to non-macular regions (Figure 6). The mutation was quantified in peripheral or macular regions of 7 subjects (i.e. retina macula, retina periphery, RPE macula and RPE periphery). We found no significant difference between the macular or peripheral region of the neural retina (median 0.027% and 0.025%, respectively) or the RPE (0.011% and 0.014%, respectively).

A1- 6 Discussion

Development of a new way to precisely quantify mtDNA^{T414G} level

Previous studies have used different techniques to measure the presence of mtDNA^{T414G} in cells such as Denaturant Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) [31] or denaturing high performance liquid chromatography WAVE analysis [25,26] and sequencing-based techniques [32–34]. In this study, we developed a fast and accurate Q-PCR-based technique to precisely quantify the mtDNA^{T414G}/total mtDNA ratio. This method allows specific evaluation of mtDNA copies that contains mtDNA^{T414G}. Analysis has been performed on fresh post-mortem ocular tissue, which prevented any positive or negative selection of this mutation that could have happened with cellular culture.

The T to G transversion at position 414 of the mtDNA has been previously reported in skin where it was shown to be related to age and cumulated sun-exposure [25,26]. Those studies concluded that mtDNA^{T414G} could be used as a photo-aging biomarker. However, there is still no mechanistic explanation for the induction of this transversion mutation.

MtDNA^{T414G} in cornea, iris and retina

We found that mtDNA^{T414G} accumulates in the iris and the cornea, which are the most anterior structures of the human eye and thus the most sun-exposed structures. This suggests a potential involvement of sunlight in the formation of this mutation. The fact that the retina is protected from harmful UV rays [35,36] might explain the lower occurrence of mtDNA^{T414G} in this ocular structure. We have previously studied large mtDNA deletions known to be induced by sunlight in human ocular structures [28,29]. In line with our data showing a protection of the retina against mtDNA^{T414G}, we found lower levels of mtDNA deletions in the retina.

MtDNA^{T414G} accumulation in corneal stroma

As previously described for the large mtDNA deletions of 3895bp and 4977bp [28,29], we found an accumulation of mtDNA^{T414G} in the corneal stroma (Figure 4). Indeed, the mtDNA^{T414G} levels were 3 times higher in the corneal stroma than in the endothelium and 14

times higher than in the epithelium. In the skin, a correlation between mtDNA^{T414G} mutation and mtDNA³⁸⁹⁵ deletion has been described [25]. It is possible that the mtDNA^{T414G} is also correlated to the mtDNA³⁸⁹⁵ deletion in corneal stroma. In fact, the mtDNA³⁸⁹⁵/total mtDNA ratio we previously shown in corneal stroma (0.062%) [29] is in the same order of magnitude that the mtDNA^{T414G}/total mtDNA ratio we found in this study (0.043%). Further analysis would be necessary to validate the interconnection between the mtDNA³⁸⁹⁵ and the mtDNA^{T414G} mutations in human corneal stroma.

MtDNA^{T414G} accumulates with age in corneal stroma and iris

We found an age-related accumulation of the mtDNA^{T414G} in the corneal stroma and in the iris. The highest levels of mtDNA^{T414G} found in our study was in the iris of older group (up to 0.17%). Since it has been shown that the mtDNA^{T414G} mutation accumulates with age and sun-exposure [25] and that we found it concentrated in solar UV-exposed ocular structure (corneal stroma and iris), it can be postulated that we could use this mutation as a biomarker of ocular photo-aging. We have previously shown that the mtDNA³⁸⁹⁵ is virtually absent from the iris [29], which is in contradiction with the results in this study showing an accumulation of mtDNA^{T414G} in this ocular structure. There must be a mechanism unrelated to the mtDNA³⁸⁹⁵ deletion involved in the generation of mtDNA^{T414G} mutation. Since we did not find any difference in mtDNA^{T414G} levels between the most light-exposed region of the retina, i.e. the macula, and the non-macula (Figure 6), it was irrelevant to investigate the accumulation of this mutation in the retina as a function of age in an attempt to determine a photo-aging marker in the eye.

Involvement of ROS in mtDNA^{T414G} formation

We found similarities (e.g. corneal stroma) and differences (e.g. iris, retina) in mutation induction when comparing previously analysed deletion (i.e. mtDNA^{CD4977} and mtDNA³⁸⁹⁵) with the mtDNA^{T414G} [28,29]. The induction mechanisms involved in these mutations is still under investigation. We know that the mtDNA^{CD4977} and the mtDNA³⁸⁹⁵ deletions are both flanked with short, repeated GC-rich sequences and it has been hypothesised that oxidative DNA damage at those sites catalyze the occurrence of the deletions.

We found an accumulation of mtDNA^{T414G} in the corneal stroma and the iris, two anterior ocular structures. Those structures are directly exposed to solar irradiation. One major role of the cornea is to filter a large portion of the UVB wavelengths (280-315 nm) and some of the UVA wavelengths (315-400 nm) [37,38]. The iris is exposed to UV wavelengths that are not filtered by the cornea, mainly UVA. Exposure to UVA leads to the formation of exogenous ROS, which can damage mtDNA [15]. However, for the mtDNA^{T414G} mutation, there is no site that can be favorable for the formation of oxidative damage and oxidative stress does not seem to have any implication in the formation of this mutation [26,39]. Nonetheless, previous publications linked the accumulation of mtDNA^{T414G} mutation to sun exposure in skin and we show that this mutation is concentrated in the most sun-exposed structures of human eyes. This suggest that there is a relation between sun exposure and mtDNA^{T414G} accumulation in ocular tissue.

T414G as a new photoaging biomarker in corneal stroma and iris

Ocular cumulative solar exposure is difficult to assess. The measurement of ocular solar exposure is challenging especially because multiple components contribute to an individual's exposure at any given time, including wearing prescription glasses, sunglasses or contact lenses; extent of shade coverage; length of forelock hairs; protrusion of the brow; eyelid anatomy; posture; activity, leisure and occupation; day of the year, latitude, elevation; environmental condition (air quality, cloud cover). Cumulative solar exposure is suspected or demonstrated in many ocular pathologies, including uveal melanoma, aged-related macular degeneration (AMD) or Fuch's endothelial corneal dystrophy, but evidence is mainly epidemiological derived.

Due to inter-individual variability, it can be difficult to use a single mitochondrial mutation as a reliable marker of cumulative solar exposure. We have previously shown that certain mtDNA deletions (mtDNA^{CD4977} and mtDNA³⁸⁹⁵) accumulate over time in photo-exposed ocular structures [28,29]. With the addition of mtDNA^{T414G} mutation, it becomes feasible to combine the levels of these different mtDNA mutations to obtain an accurate assessment of the solar exposure that an individual has accumulated during his lifetime. This assessment

could help determine the implication of cumulative sun exposure in ocular pathologies for which sun exposure is suspected, such as AMD, Fuchs' endothelial corneal dystrophy, uveal melanoma or glaucoma.

A1- 7 Informations additionelles

Funding

This work was supported by a Grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MOP-133719) to P.J.R. P.J.R. is a research scholar from the Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQ-S).

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Authors' contributions

Anne-Sophie Gary: experiment conception and design, data collection, analysis and interpretation of data, manuscript writing, and critical revision

Marie M Dorr: experiment conception and design, data collection, analysis and interpretation of data and critical revision

Patrick J Rochette: experiment conception and design, funding acquisition, critical revision

Acknowledgements

We are grateful to Sebastien Gendron, Justin Mallet, Marie-Catherine Drigeard Desgarnier and Corinne Zinflou for technical help on sample preparation.

A1- 8 Bibliographie

1. Giuseppe, A. and Schatz, G. (1988) BIOGENESIS OF MITOCHONDRIA. *Annu Rev Cell Biol*, 4,289–333.
2. Barshad, G., Marom, S., Cohen, T., and Mishmar, D. (2018) Mitochondrial DNA Transcription and Its Regulation: An Evolutionary Perspective. *Trends Genet.*, 34,682–692.
3. Taanman, J.-W. (1999) The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, 1410,103–123.
4. Wallace, D.C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science (80-.)*, 283,1482–1488. doi:10.1126/science.283.5407.1482.
5. Tomkinson, A.E., Thomas Bonk, R., Kim, J., Bartfeld, N., and Linn, S. (1990) Mammalian mitochondrial endonuclease activities specific for ultraviolet-irradiated DNA. *Nucleic Acids Res.*, 18,929–935. doi:10.1093/nar/18.4.929.
6. Tuppen, H.A.L., Blakely, E.L., Turnbull, D.M., and Taylor, R.W. (2010) Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, 1797,113–128.
7. Chen, T., He, J., Huang, Y., and Zhao, W. (2011) The generation of mitochondrial DNA large-scale deletions in human cells. *J. Hum. Genet.*, 56,689–694.
8. Pascucci, B., Versteegh, A., Van Hoffen, A., Van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H.F., and Dogliotti, E. (1997) DNA repair of UV photoproducts and mutagenesis in human mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.*, 273,417–427. doi:10.1006/jmbi.1997.1268.
9. Clayton, D.A., Doda, J.N., and Friedberg, E.C. (1974) The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 71,2777–2781. doi:10.1073/pnas.71.7.2777.
10. Matilainen, O., Quirós, P.M., and Auwerx, J. (2017) Mitochondria and Epigenetics – Crosstalk in Homeostasis and Stress. *Trends Cell Biol.*, 27,453–463.
11. Addabbo, F., Montagnani, M., and Goligorsky, M.S. (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Hypertension*, 53,885–892. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.130054.
12. Brand, M.D., Affourtit, C., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., Pakay, J.L., and Parker, N. (2004) Mitochondrial superoxide: Production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic. Biol. Med.*, 37,755–767. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.05.034.
13. Wang, W., Fang, H., Groom, L., et al. (2008) Superoxide Flashes in Single Mitochondria. *Cell*, 134,279–290. doi:10.1016/j.cell.2008.06.017.Superoxide.
14. Murphy, M.P. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.*, 417,1–13. doi:10.1042/BJ20081386.
15. Cadet, J., Douki, T., and Ravanat, J.L. (2015) Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation. *Photochem. Photobiol.*, 91,140–155. doi:10.1111/php.12368.
16. Hakozaiki, T., Date, A., and Yoshii, T. (2008) Visualization and characterization of UVB-induced reactive oxygen species in a human skin equivalent model. *Arch. Dermatol. Res.*, 300,51–56. doi:10.1007/s00403-007-0804-3.
17. Zinflou, C. and Rochette, P.J. (2017) Ultraviolet A-induced oxidation in cornea : Characterization of the early oxidation-related events. *Free Radic. Biol. Med.*, 108,118–128. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.022.

18. Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J.L., and Di Mascio, P. (2009) Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 8,903–911. doi:10.1039/b905343n.
19. Birch-Machin, M.A. and Swalwell, H. (2010) How mitochondria record the effects of UV exposure and oxidative stress using human skin as a model tissue. *Mutagenesis*, 25,101–107. doi:10.1093/mutage/geb061.
20. Mammucari, C. and Rizzuto, R. (2010) Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging. *Mech. Ageing Dev.*, 131,536–543. doi:10.1016/j.mad.2010.07.003.
21. Kujoth, G.C., Bradshaw, P.C., Haroon, S., and Prolla, T.A. (2007) The role of mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *PLoS Genet.*, 3,0161–0173. doi:10.1371/journal.pgen.0030024.
22. Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120,483–495. doi:10.1016/j.cell.2005.02.001.
23. Eshaghian, A., Vleugels, R.A., Canter, J.A., McDonald, M.A., Stasko, T., and Sligh, J.E. (2006) Mitochondrial DNA deletions serve as biomarkers of aging in the skin, but are typically absent in nonmelanoma skin cancers. *J. Invest. Dermatol.*, 126,336–344.
24. Meissner, C., Bruse, P., Mohamed, S.A., Schulz, A., Warnk, H., Storm, T., and Oehmichen, M. (2008) The 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in human skeletal muscle, heart and different areas of the brain: A useful biomarker or more? *Exp. Gerontol.*, 43,645–652. doi:10.1016/j.exger.2008.03.004.
25. Birket, M.J. and Birch-Machin, M.A. (2007) Ultraviolet radiation exposure accelerates the accumulation of the aging-dependent T414G mitochondrial DNA mutation in human skin. *Aging Cell*, 6,557–564. doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00310.x.
26. Birket, M.J., Passos, J.F., Von Zglinicki, T., and Birch-Machin, M.A. (2009) The relationship between the aging- and photo-dependent T414G mitochondrial DNA mutation with cellular senescence and reactive oxygen species production in cultured skin fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.*, 129,1361–1366. doi:10.1038/jid.2008.373.
27. Krishnan, K.J., Harbottle, A., and Birch-Machin, M.A. (2004) The use of a 3895 bp mitochondrial DNA deletion as a marker for sunlight exposure in human skin. *J. Invest. Dermatol.*, 123,1020–1024.
28. Gendron, S.P., Mallet, J.D., Bastien, N., and Rochette, P.J. (2012) Mitochondrial DNA common deletion in the human eye: A relation with corneal aging. *Mech. Ageing Dev.*, 133,68–74. doi:10.1016/j.mad.2012.01.002.
29. Gendron, S.P., Bastien, N., Mallet, J.D., and Rochette, P.J. (2013) The 3895-bp mitochondrial DNA deletion in the human eye: A potential involvement in corneal ageing and macular degeneration. *Mutagenesis*, 28,197–204. doi:10.1093/mutage/ges071.
30. Desgarnier, M.D., Zinflou, C., Mallet, J.D., and Rochette, P.J. (2016) Telomere Length Measurement in Different Ocular Structures : A Potential Implication in Corneal Endothelium Pathogenesis. 1. doi:10.1167/iovs.16-19878.
31. Wang, Y., Michikawa, Y., Mallidis, C., et al. (2001) Muscle-specific mutations accumulate with aging in critical human mtDNA control sites for replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98,4022–4027.
32. Del Bo, R., Crimi, M., Sciacco, M., et al. (2003) High mutational burden in the mtDNA control region from aged muscles: A single-fiber study. *Neurobiol. Aging*, 24,829–838. doi:10.1016/S0197-4580(02)00233-6.
33. Barritt, J.A., Cohen, J., and Brenner, C.A. (2000) Mitochondrial DNA point mutation in human oocytes is associated with maternal age. *Reprod. Biomed. Online*, 1,96–100.

34. Kassem, A.M., El-Guendy, N., Tantawy, M., Abdelhady, H., El-Ghor, A., and Abdel Wahab, A.H. (2011) Mutational hotspots in the mitochondrial D-loop region of cancerous and precancerous colorectal lesions in egyptian patients. *DNA Cell Biol.*, 30,899–906. doi:10.1089/dna.2010.1186.
35. Meek, K.M. and Knupp, C. (2015) Corneal structure and transparency. *Prog. Retin. Eye Res.*, 49,1–16.
36. Youssef, P.N., Sheibani, N., and Albert, D.M. (2011) Retinal light toxicity. *Eye*, 25,1–14.
37. Boettner, E.A. and Wolter, J.R. (1962) Transmission of the Ocular Media. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1,776–783.
38. Douth, J.J., Quantock, A.J., Joyce, N.C., and Meek, K.M. (2012) Ultraviolet light transmission through the human corneal stroma is reduced in the periphery. *Biophys. J.*, 102,1258–1264.
39. Zsurka, G., Peeva, V., Kotlyar, A., and Kunz, W.S. (2018) Is there still any role for oxidative stress in mitochondrial DNA-dependent aging? *Genes (Basel)*, 9. doi:10.3390/genes9040175.

A1- 9 Tableau et Figures

Primer names	Sequences	Position	Size
Forward (F5)	CCAAACCCCAAAAACAAAGAACC	348-370	23
Reverse wild type (R4)	GGAGGGGAAAATAATGTGTTAGTTGG	437-462	26
Reverse mutated (MutF3)	GATTTCAAATTTTATCTTTGGCGTG	414-441	26

Table 1. Primers used to quantify the mtDNA^{T414G}/total mtDNA ratio

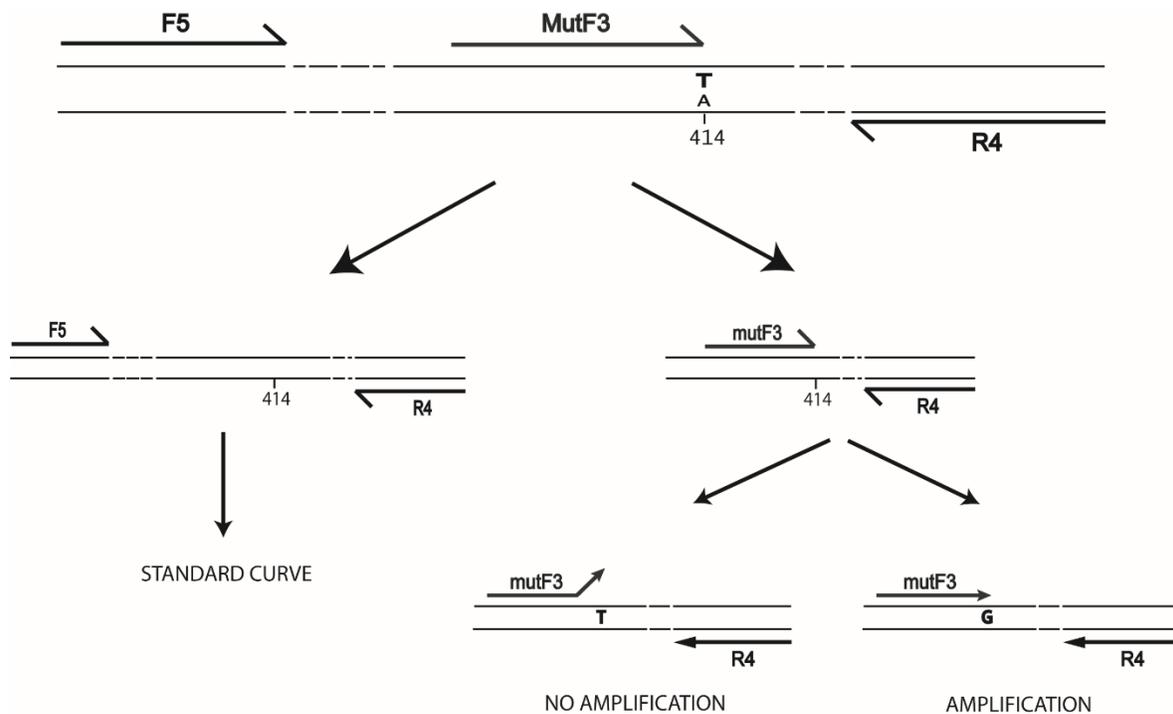


Figure 1. Schematic representation of the Q-PCR technique used to evaluate the mtDNA^{T414G} / mtDNA ratio.

Primer set F5 / R4 is designed to amplify total mtDNA. The primer set R4 / MutF3 specifically detects mtDNA molecules carrying the T414G mutation. The primer contains the T414G mutation in order to amplify only the mtDNA containing a Guanine in position 414.

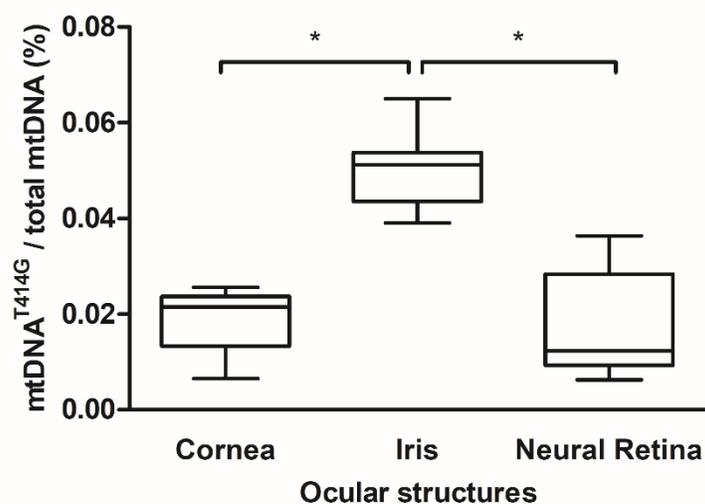


Figure 2. MtDNA^{T414G} / total mtDNA ratio analysis in different ocular structure.

Total DNA was harvested from the cornea, iris and neural retina isolated from 7 human subjects. The mtDNA^{T414G} / total mtDNA ratio was derived from each ocular structure by Q-PCR. A higher mtDNA^{T414G} level has been found in the iris (0.051%), when compared to the cornea (0.021%) and the neural retina (0.012%). According to Wilcoxon matched-paired rank test, the mtDNA^{T414G} / total mtDNA ratio was significantly different between the iris and the cornea and between the iris and the neural retina (*p-value < 0.02) but not between the cornea and the neural retina.

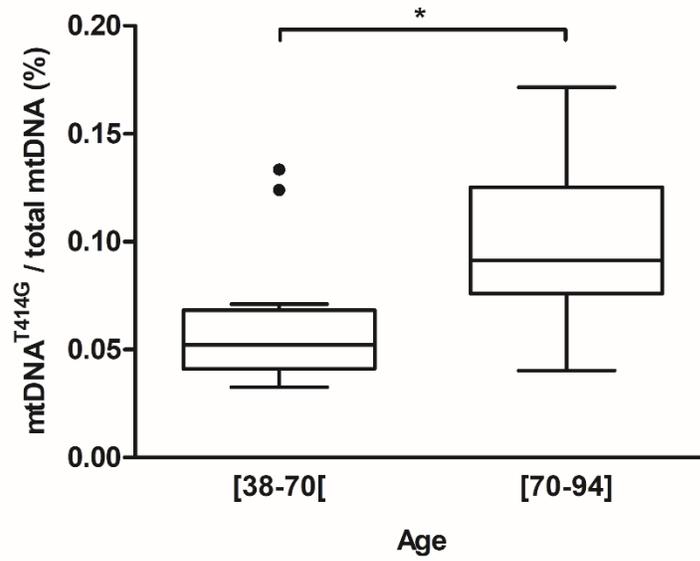


Figure 3. Age-related accumulation of mtDNA^{T414G} mutation in the iris.

Total DNA was harvested from the iris of 13 subjects ranging from 38 to 70 years old and 13 subjects ranging from 70 to 94 years old. MtDNA^{T414G} / total mtDNA ratio was determined using Q-PCR. We found a significant higher mtDNA^{T414G} / total mtDNA ratio in the older group (70-94 years old), when compared to the younger 38-70 years old group, with median values of 0.091% and 0.052%, respectively. A Mann-Whitney test was used (*p-value < 0.02).

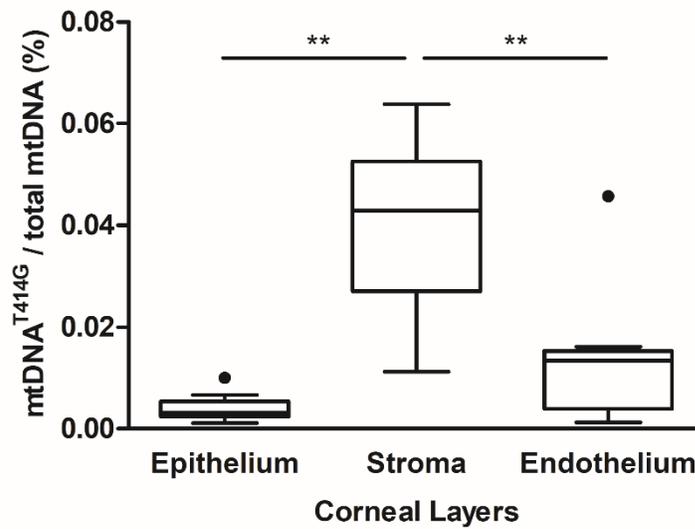


Figure 4. $MtDNA^{T414G}$ / total mtDNA ratio analysis in the different corneal cellular layers.

The $mtDNA^{T414G}$ / total mtDNA ratio was analysed by Q-PCR in the corneal epithelium, stroma and endothelium of 9 human subjects with a median age of 78 years old. We found that the $mtDNA^{T414G}$ mutation is concentrated in the stroma (0.043%), when compared to the epithelium (0.003%) and the endothelium (0.013%). According to Wilcoxon test, the $mtDNA^{T414G}$ / total mtDNA ratio is significantly different between the corneal stroma and the epithelium and between the stroma and the endothelium (*p-value < 0.04).

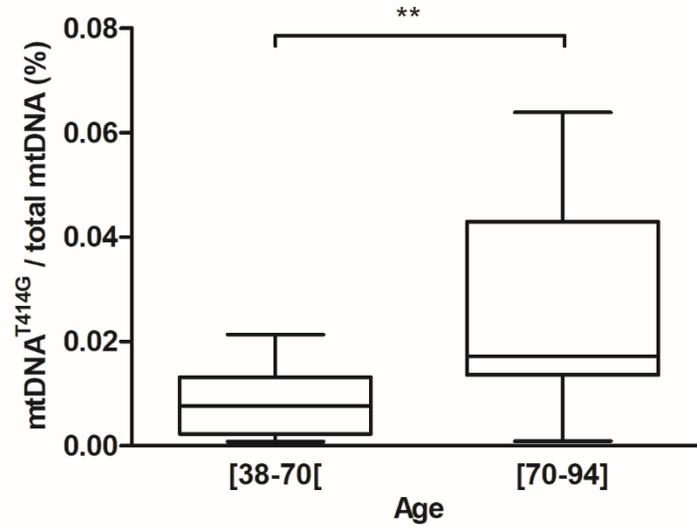


Figure 5. Age-related accumulation of mtDNA^{T414G} in the corneal stroma.

The mtDNA^{T414G} / total mtDNA was analysed in total DNA harvested from the stroma of 14 subjects ranging from 38 to 70 years old and 23 subjects ranging from 70 to 94 years old. MtDNA^{T414G} / total mtDNA ratio was determined by Q-PCR. We found significantly more mtDNA^{T414G} mutation in the older group (0.017%), than in the younger one (0.007%). A Mann-Whitney test has been used (*p-value < 0.01).

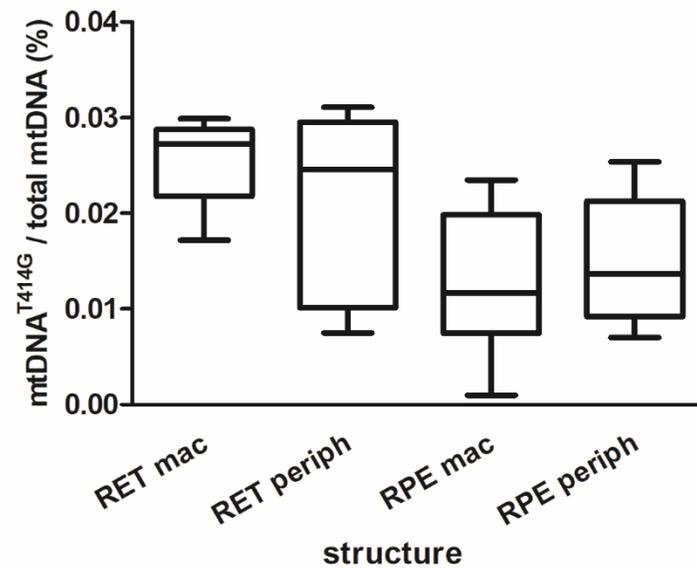


Figure 6. $mtDNA^{T414G}$ / total mtDNA ratio analysis in the macular and peripheral regions of the neural retina and the RPE.

After dissection of the neural retina (RET) and the RPE of 7 patients with a median age of 60, the macular (mac) and peripheral (periph) regions were separated. Total DNA was extracted and $mtDNA^{T414G}$ / total mtDNA ratio was determined using Q-PCR. Analysis of the $mtDNA^{T414G}$ / total mtDNA ratio shows no significant difference between the macular and peripheral regions of both neural retina (0.027% and 0.025% respectively) and RPE (0.011% and 0.014% respectively).

A1- 10 Données supplémentaires

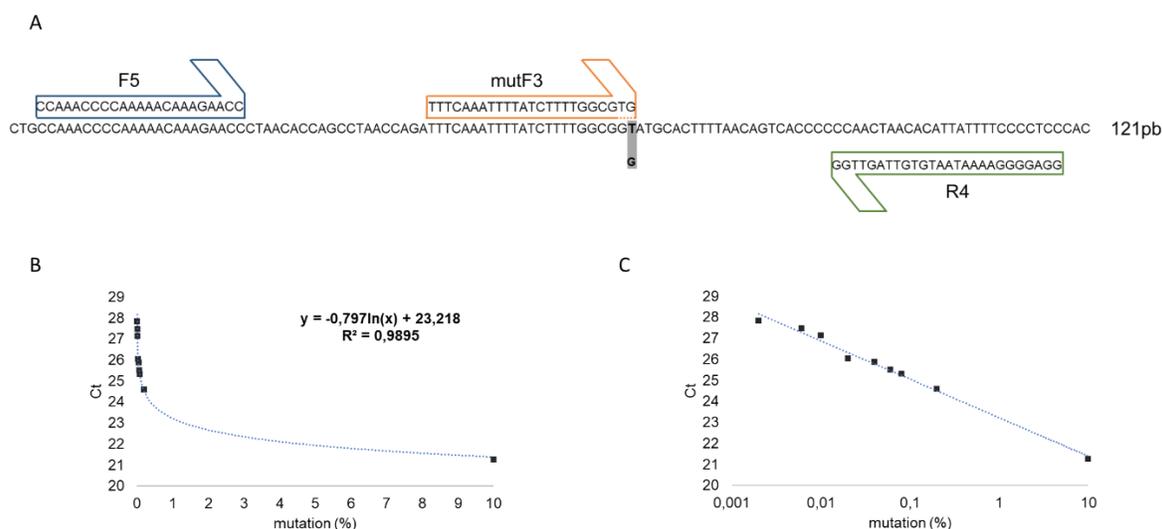


Figure S1. Validation of primer set R4 / mutF3.

The primer set R4 / MutF3 were specifically designed to detect mtDNA molecules carrying the T414G mutation. The primer set was validated using a 121 bp custom oligo of the mutated mtDNA region containing or not the T414G mutation. (A) Sequence of the 121 bp oligo with the position of primers used in the study. Different ratios of mutated oligo / unmutated oligo were amplified using R4 / MutF3 primers by QPCR to test the validity of primer set R4 / mutF3 to amplify specifically and proportionally the mutated DNA. Ct for each sample containing various percentage of mutated oligo is depicted in (B), including the fitting logarithmic curve, its equation, and the R2 value. The same values are plotted with a logarithmic scale in (C). The amplification of mutated DNA is proportional to the percentage of mutated oligo present in the mix.

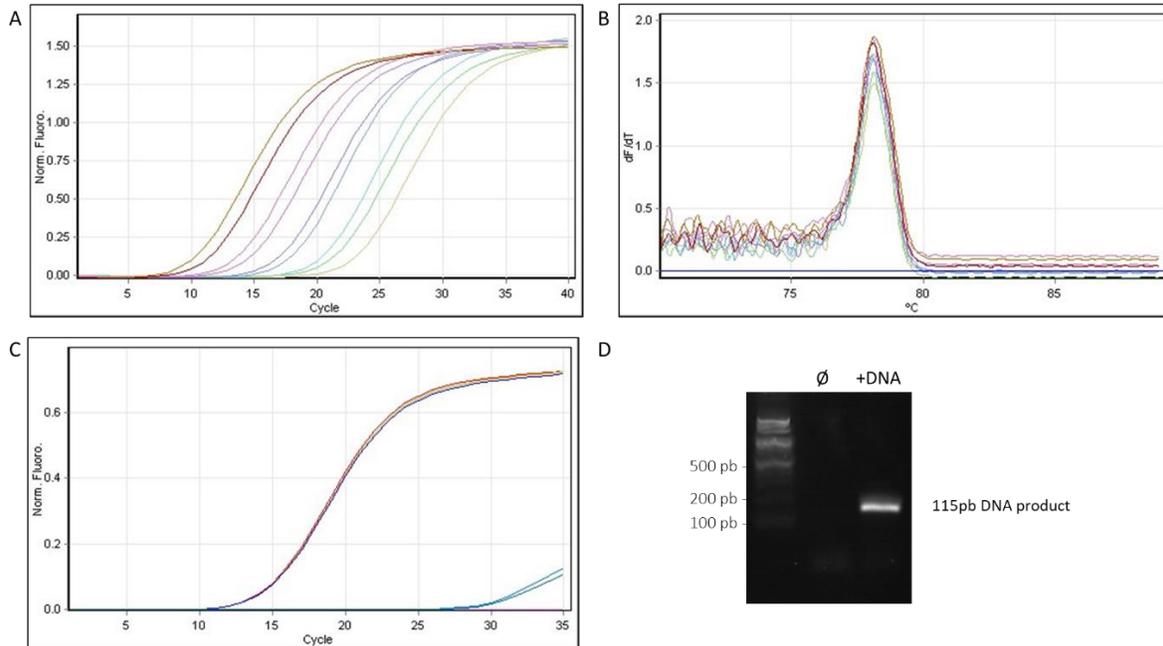


Figure S2. Validation of R4 / F5 primer set.

Primer set F5 / R4 is designed to amplify total, wild type, mtDNA. Using Q-PCR, a standard curve (From left to right, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005 and 0.001 ng total DNA/reaction) was performed with F5 / R4 primer set in (A) follow by a melting temperature analysis (melt curve) (B). A Q-PCR was performed using the same Q-PCR cycling condition as before, with 2ng total DNA/reaction (+DNA) or no DNA/reaction (\emptyset) as a negative control and are presented in (C). Amplified product was separated on an agarose gel to confirm its size (D). The melt curves confirmed the presence of only one amplicon and the gel analysis further confirm the presence of only one band of around 115 bp, as expected. It is important to note that SYBR Green was added to the DNA during the Q-PCR amplification, which results in a migration higher than expected when no intercalating agent is used.