

## THESIS / THÈSE

### DOCTEUR EN SCIENCES

**Etude transcriptomique et mécanistique de la sénescence cellulaire induite prématurément par le peroxyde d'hydrogène chez des fibroblastes exprimant la télomérase**  
**rôle de p38(MAPK) et de la cyclooxygénase 2**

Zdanov, Stéphanie

*Award date:*  
2006

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



Facultés  
Universitaires  
Notre-Dame  
de la Paix

# Etude transcriptomique et mécanistique de la sénescence cellulaire induite prématurément par le peroxyde d'hydrogène chez des fibroblastes exprimant la télomérase: Rôle de $p38^{MAPK}$ et de la cyclooxygénase 2

## Faculté des Sciences

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Dissertation présentée par  
Stéphanie ZDANOV  
en vue de l'obtention du grade  
de Docteur en Sciences

2006

FT B3/2006/3

FACULTES  
UNIVERSITAIRES  
N.-D. DE LA PAIX  
NAMUR

---

**Bibliothèque**



FUNDP  
Faculté des Sciences  
Département de Biologie  
Laboratoire de Biochimie et de  
Biologie cellulaire

Rue de Bruxelles, 61  
B-5000 Namur  
Tél. +32 (0)81 724321  
Fax +32 (0)81 724135  
stephanie.zdanov@fundp.ac.be

**Etude transcriptomique et  
mécanistique de la sénescence  
cellulaire induite prématurément  
par le peroxyde d'hydrogène chez  
des fibroblastes exprimant la  
télomérase: Rôle de p38<sup>MAPK</sup> et de  
la cyclooxygénase 2.**

Dissertation présentée par  
Stéphanie Zdanov  
en vue de l'obtention du grade  
de Docteur en Sciences

Composition du Jury :

Olivier Toussaint (Promoteur, FUNDP)  
William Hornebeck (Université de Reims, France)  
Bernard Masereel (FUNDP)  
Patricia Renard (FUNDP)  
Christian Swine (UCL, Mont-Godinne)

VTL 20026464

© Presses universitaires de Namur & Stéphanie Zdanov  
Rempart de la Vierge, 13  
B - 5000 Namur (Belgique)

Toute reproduction d'un extrait quelconque de ce livre,  
hors des limites restrictives prévues par la loi,  
par quelque procédé que ce soit, et notamment par photocopie ou scanner,  
est strictement interdite pour tous pays.

Imprimé en Belgique  
ISBN-10: 2-87037-522-0  
ISBN-13 : 978-2-87037-522-8  
Dépôt légal: D / 2006 / 1881 / 16

## RESUME

L'exposition de fibroblastes humains diploïdes à divers types de stress oxydatifs subcytotoxiques, entraîne l'apparition d'une sénescence cellulaire prématurée (SIPS). Ce phénotype est caractérisé notamment par l'apparition d'une morphologie sénescente, d'une activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence et d'un arrêt irréversible du cycle cellulaire.

Lors de ce travail, nous avons étudié les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'apparition de la sénescence induite prématurément par un stress subcytotoxique sous peroxyde d'hydrogène chez des fibroblastes IMR-90 exprimant la télomérase. Nous nous sommes particulièrement intéressés au rôle de la MAP kinase p38<sup>MAPK</sup> et de la cyclooxygénase 2 dans l'établissement de ce phénotype.

Une part importante de ce travail a été consacrée au développement d'un damier à ADN afin d'étudier les changements d'expression génique apparaissant lors de l'établissement de la SIPS. Cet outil nous a également permis d'identifier les gènes dont la transcription est contrôlée par p38<sup>MAPK</sup>. La deuxième partie de ce travail a porté sur la recherche des mécanismes conduisant à la surexpression de la cyclooxygénase 2 dans notre modèle de SIPS ainsi qu'en l'étude du rôle de la cyclooxygénase 2 dans l'apparition de ce phénotype.

## SUMMARY

Exposure of human diploid fibroblasts to various types of oxidative stress at sublethal level display a senescent-like phenotype coined "stress-induced premature senescence" (SIPS). This phenotype is characterized namely by a typical cell morphology, a senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activity and a irreversible growth arrest.

In this work, we studied the cellular and molecular mechanisms involved in the establishment of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence. We were particularly interested in the role of p38<sup>MAPK</sup> and cyclooxygenase 2 in SIPS.

An important part of this work was devoted to the development of low density DNA microarray to study gene expression profiles in SIPS. This tool also allowed us to identify genes whose transcription is controlled by p38<sup>MAPK</sup>.

The second part of this work concerned the study of the mechanisms leading to cyclooxygenase 2 overexpression in our model of SIPS and concerned the study of cyclooxygenase 2 role in the appearance of this phenotype.

*Et voici que se clôturent 4 années de thèse... A travers ces quelques lignes, je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail de thèse.*

*Tout d'abord, je souhaite remercier les Professeurs J. Remacle et M. Raes de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de biologie cellulaire et de biochimie.*

*Je remercie tout particulièrement Olivier Toussaint. Merci de m'avoir donné l'opportunité de rester au labo après mon mémoire et mon court séjour à l'université de Newcastle. La confiance que tu as placée en moi ainsi que l'expérience professionnelle que tu m'as permis d'acquérir sont des éléments essentiels dans ce travail.*

*Avec Olivier est associé l'incomparable équipe des GRAS... Merci donc à l'ensemble de l'équipe; Flo, Aline, Céline, Nathalie, les deux Véro, Coralie, Valérie, Michel, Jérôme, Jérémie, Geoffroy pour votre bonne humeur, votre aide et vos encouragements quotidiens. Merci aussi aux anciens, Patrick, Jean-Jean, Véro, Joao, Thierry et Christophe pour l'attention que vous m'avez portée lors de mes premiers pas au laboratoire.*

*Je tiens également à remercier tout les URBCéens.*

*Merci aux "sénior". Malgré vos horaires surchargés, vous avez toujours fait l'effort d'émettre vos remarques et suggestions lors des répétitions FRIA ou autres séminaires. J'en profite, d'ailleurs, pour remercier tout particulièrement Carine Michiels. J'ai grandement apprécié ta disponibilité et tes conseils quant à la mise en oeuvre de certaines manips.*

*Merci aux filles du quatrième, Aline, Céline, Cindy, Véro ainsi que Coralie et Aurore pour les petits verres et soupers que nous avons partagés. Je n'oublierai jamais cette journée froide et pluvieuse du 5 mars 2005... Merci aussi à Christelle alias bouboule de m'avoir refilé en douce les contrôles positifs des TransAM et surtout d'avoir partagé le bureau ces deux dernières années.*

*Ce travail aurait été moins agréable sans l'aide de personnes comme Andrée, Edouard, Anne, Marc, Noelle, Martine M et tous les autres... Merci pour vos compétences, vos précieux conseils et votre bonne humeur.*

*Je voudrais remercier le Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'accordant son soutien financier pendant quatre ans. Je remercie également les Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix qui m'ont accordé une bourse de six mois pour pouvoir terminer ce travail.*

*Je souhaite aussi remercier les membres du jury qui me font l'honneur d'examiner ce travail.*

*Je n'oublie évidemment pas ceux qui font que la vie ne se limite pas au confinement du labo. Je pense à Laurence, Laurent, Isa, Patrick, Manu, Lio et Laurent W. Merci pour votre amitié. Je pense aussi à ma famille et surtout à mes parents. Merci d'avoir insisté pour que je fasse mes études à Namur. Sans vous, je ne me serais jamais embarquée dans cette aventure et je n'aurais certainement pas rencontré JP...*

*Nous y voilà donc,... J'éviterais de faire dans la "gnangnanserie" car je sais que tu détestes cela. Simplement merci pour ta présence, ton soutien et ton réconfort.*

*Un tout grand merci à vous tous.*

*Stéphanie*



## TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
CHAPITRE I: STRESS OXYDATIFS ET VIEILLISSEMENT CELLULAIRE.....	1
1.1. Introduction.....	1
1.2. Les espèces réactionelles dérivées de l'oxygène.....	1
1.2.1. Définition.....	1
1.2.2. Sites de production des ROS.....	2
1.2.3. Mécanismes de défense contre les ROS.....	3
<i>a. Les enzymes antioxydantes.....</i>	<i>4</i>
<i>b. Les défenses antioxydantes non-enzymatiques.....</i>	<i>4</i>
1.2.4. Cibles des ROS.....	5
<i>a. Les lésions des lipides.....</i>	<i>5</i>
<i>b. Les lésions des acides nucléiques.....</i>	<i>6</i>
<i>c. Les lésions des protéines.....</i>	<i>7</i>
1.2.5. ROS et régulation des facteurs de transcription.....	7
1.3. Corrélations entre stress et vieillissement.....	9
1.3.1. Corrélation entre les stress oxydatifs et le vieillissement.....	9
1.3.2. Corrélation entre la production de ROS et la durée de vie.....	10
CHAPITRE II: LA SENESCENCE REPLICATIVE ET LA SENESCENCE INDUITE PREMATUREMENT PAR DES STRESS (SIPS).....	13
2.1. La sénescence réplivative.....	13
2.2. Les biomarqueurs de la sénescence réplivative.....	14
2.2.1. Morphologie cellulaire.....	14
2.2.2. L'activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA $\beta$ -gal).....	15
2.2.3. Altération du génome mitochondrial.....	16
2.2.4. Modulation de l'expression génique.....	16
2.2.5. Arrêt du cycle cellulaire en fin de phase G1.....	17
<i>a. Le cycle cellulaire.....</i>	<i>17</i>
<i>b. Arrêt du cycle cellulaire en fin de phase G1/S.....</i>	<i>18</i>
2.2.6. Le raccourcissement des télomères.....	21

a. Structure et fonction des télomères.....	21
b. Le raccourcissement des télomères et la sénescence réplivative.....	21
2.3. La Sénescence Induite Prématurément par des stress (SIPS).....	27
2.3.1. Introduction.....	27
2.3.2. La Sénescence Induite Prématurément par des stress (SIPS).....	27
a. Les stress chroniques et subcytotoxiques.....	27
b. Les stress aigus et subcytotoxiques.....	29

CHAPITRE III: SIGNALISATION CELLULAIRE ET MEDIEATEURS LIPIDIQUES IMPLIQUES  
DANS LA SENESCENCE REPLICATIVE ET LA SIPS..... 31

3.1. Les MAP kinases.....	31
3.1.1. Généralités.....	31
3.1.2. p38 <sup>MAPK</sup> .....	32
a. Isoformes et mécanisme d'activation de p38 <sup>MAPK</sup> .....	32
b. Cibles de p38 <sup>MAPK</sup> .....	33
c. p38 <sup>MAPK</sup> et la SIPS.....	34
3.2. La cyclooxygenase 2 (COX-2).....	36
3.2.1. Les cyclooxygénases.....	36
a. Les différentes isoformes de COX.....	38
b. Structure des protéines COXs.....	39
3.2.2. COX-2.....	40
3.2.3. COX-2 et la SIPS.....	41

BUT DU TRAVAIL ET CONTEXTE..... 43

RESULTATS..... 45

Manuscrit 1: Identification of p38<sup>MAPK</sup>-dependent Genes Involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Premature Senescence of IMR-90 hTERT Human Fibroblasts..... 45

Manuscrit 2: Exposure of human fibroblasts to subcytotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress triggers premature senescence through a Cyclooxygenase-2 dependent signaling pathway..... 79

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES..... 103

Mise au point d'un modèle de sénescence induite prématurément par un stress sous peroxyde d'hydrogène chez des fibroblastes immortalisés par la sous-unité catalytique de la télomérase.....	103
Etude du rôle de p38 <sup>MAPK</sup> dans les changements d'expression génique induits par un stress subcytotoxique à l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	106
Etude du rôle de COX-2 dans l'apparition du phénotype sénescant.....	112
Relation entre COX-2 et la voie de p38 <sup>MAPK</sup> .....	115
SIPS, inflammation et vieillissement.....	118
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	121
<b>ANNEXE</b> .....	141

## LISTE DES ABREVIATIONS

8-OH-dG	8-hydroxydéoxyguanosine
AA	Acide arachidonique
ADN	acide déoxyribonucléique
ADNmt	ADN mitochondrial
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AP1	Activator protein 1
apo J	apolipoprotéine J
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATF-2	activating transcription factor-2
ATP	adénosine triphosphate
bHLH	basic-helix-loop-helix
bp	paire de base
CdK	kinase dependente de cycline
CdKI	inhibiteur de CdK
COX	cyclooxygenase
CPD	cumulative population doubling
db	double brin
DHEA	déhydroépiandrosteronesulfate
DHFR	dihydrofolate réductase
EGF	epidermal growth factor
ERK	extracellular signal regulated kinase
FHDs	fibroblastes humains diploïdes
GPX	gluthation peroxidase
GSH	gluthation
GSHR	gluthation réductase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxyde d'hydrogène
h	heure
IGF	insuline like growth factor
IGF-BP	protéine de liaison à l'insuline like growth factor
I-κB	Inhibitor kappa B
IL	interleukine
JNK	jun amino terminal kinase
kb	kilobase
MAPK	mitogen-activated protein kinase

MAPKKK	MKK kinase
MDM2	mouse double minute 2
MEC	matrice extracellulaire
MF	fibroblaste mitotique
MKK	MAPK kinase
MMP	métalloprotéinase
MSR	Méthionine sulfoxyde reductase
NAC	N-Acétylcystéine
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
O <sub>2</sub>	oxygène moléculaire
oxo <sup>8</sup> Gua	8-oxoguanine
PARP	poly (ADP-ribose) polymérase
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PDGF	platelet-derived growth factor
PG	prostaglandine
PI-3 kinase	phosphoinositide 3 kinase
PK	protéine kinase
PMF	fibroblaste post-mitotique
pRb	protéine du rétinoblastome
PRDX	peroxyredoxine
ROS	espèce radicalaire dérivée de l'oxygène
RNR	ribonucléotide réductase
RT-PCR	transcription inverse suivie d'une PCR
SA $\beta$ -gal	senescence-associated- $\beta$ -galactosidase
SAPK	stress-activated protein kinase
sb	simple brin
SIPS	stress induced premature senescence
SOD	superoxyde dismutase
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -butylhydroperoxyde
TGF- $\beta$	transforming growth-factor $\beta$
TIMP	Inhibiteur de MMP
TK	thymidine kinase
TNF	tumor necrosis factor
TXN	thioredoxine
TXNR	thioredoxine reductase

TYMS	thymidilate synthase
TX	thromboxane
UV	ultra-violet
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl $\beta$ -D-galactopyranosine

# **INTRODUCTION**

# CHAPITRE I: STRESS OXYDATIFS ET VIEILLISSEMENT CELLULAIRE

## 1.1. Introduction

Pour la première fois de son histoire, l'humanité vieillit. Les causes du vieillissement de la population sont multiples mais l'augmentation de la longévité moyenne en est majoritairement responsable. Le déséquilibre entre le nombre de personnes âgées et jeunes va influencer la vie sociale, politique et économique de la société de demain. En effet, le financement des retraites, l'augmentation des coûts de la médecine et l'accès à la vie sociale et culturelle sont des sources potentielles de conflits intergénérationnels. La parfaite compréhension des mécanismes biologiques du vieillissement peut contribuer à diminuer l'impact de ce type de conflits.

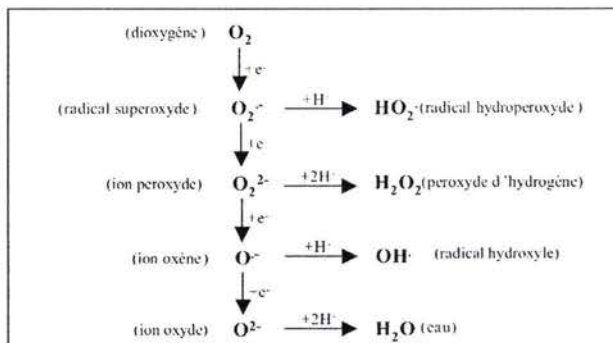
Le vieillissement est caractérisé par un déclin progressif et irréversible des différentes fonctions de l'organisme. Ce processus complexe implique des facteurs génétiques mais est surtout lié à une forte influence de l'environnement. Depuis quelques années, le monde scientifique est envahi par un nouveau concept, celui du "stress oxydant", c'est à dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces radicaux libres sont impliqués dans l'apparition de nombreuses pathologies humaines telles que les maladies neurodégénératives, les cancers, les maladies cardio-vasculaires, les inflammations chroniques, etc. Selon D. Harman, le vieillissement résulterait d'une accumulation de dommages cellulaires causés par les ROS (Harman *et al.*, 1956).

## 1.2. Les espèces réactionnelles dérivées de l'oxygène (ROS)

### 1.2.1. Définition

Les radicaux libres sont des espèces moléculaires possédant un ou plusieurs électrons non appariés. Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule (Webster & Nunn., 1988). L'appellation "espèces réactionnelles dérivées de l'oxygène" ou ROS n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit tels que le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), mais également certaines espèces non radicalaires dont la toxicité est importante telles que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et l'oxygène singulet ( $O_2^1$ ). La Figure 1 montre la cascade monovalente de la réduction de l'oxygène moléculaire.





**Figure 1:** Description des produits dérivés de la réduction monoélectronique de la molécule d'oxygène en eau (d'après Webster & Nunn., 1998).

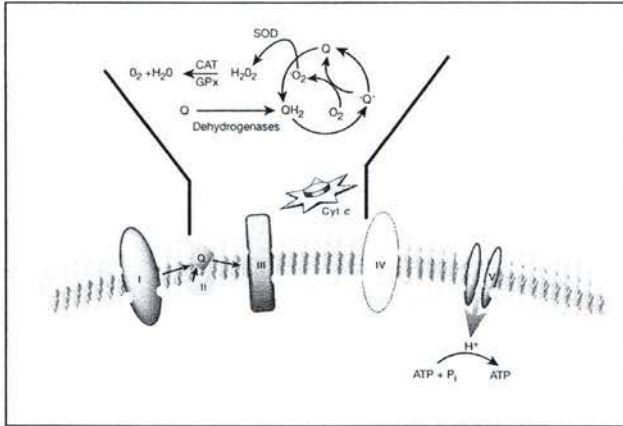
### 1.2.2. Sites de production des ROS

Le métabolisme cellulaire normal de l'oxygène produit, de manière continue, de faibles quantités de ROS. Le rôle physiologique de cette production basale n'est pas totalement connu, toutefois certaines de ces molécules ont été impliquées dans des processus de signalisation cellulaire tel que la régulation de la prolifération après stimulation par des facteurs de croissance (Finkel & Holbrook., 2000) (Finkel., 2003). Dans certaines situations, cette production augmente fortement, entraînant un stress oxydatif que l'on définit comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ces molécules. En raison de leur capacité à endommager presque tous les types de molécules dans l'organisme, les ROS ont été impliqués dans un très grand nombre de pathologies, tant aiguës que chroniques (Gutteridge., 1993).

Les ROS auxquels les cellules sont exposées peuvent être d'origine exogène (ultraviolet (UV), radiations ionisantes, fumée de tabac, xénobiotiques, ozone, etc). Cependant, différents processus cellulaires produisent également des ROS durant leur exécution.

La respiration mitochondriale est le processus cellulaire qui produit le plus de ROS (Figure 2). On estime que 0,4 à 4 % de l'oxygène consommé par les mitochondries est converti en ROS (Chance *et al.*, 1979) (Hansford *et al.*, 1997). Lors de la respiration aérobie, les complexes I et III de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, vont produire du radical instable superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Cadenas *et al.*, 1977) (Cross & Jones., 1991). Cet anion superoxyde est transformé en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par la superoxyde dismutase qui, en présence de traces de métaux ( $Cu^+$  ou  $Fe^{2+}$ ), est lui même converti par la réaction de Fenton en radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), espèce réactive de l'oxygène la plus délétère. D'autres

organelles contribuent également à la formation endogène de ROS. Par exemple, la membrane du réticulum endoplasmique et la membrane externe du noyau possèdent des cytochromes p450 qui peuvent directement réduire l'O<sub>2</sub> en O<sub>2</sub><sup>-</sup> lors du métabolisme de composés xénobiotiques (Goepfert *et al.*, 1995).



**Figure 2: Production de ROS au niveau des complexes de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale.** La production de ROS se fait principalement au sein du complexe III. Les électrons provenant des complexes I et II sont transférés au coenzyme Q (Q). La forme réduite QH<sub>2</sub> va alors subir 2 réductions séquentielles d'un électron lors du cycle Q en utilisant les formes réduites et oxydées du cytochrome b et du cytochrome c (Cyt c). Le radical formé Q<sup>•</sup>, instable, est capable de réagir directement avec l'oxygène et de former des anions superoxydes (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). SOD: Superoxyde dismutase; CAT: catalase (Finkel & Holbrook., 2000).

### 1.2.3. Mécanismes de défense contre les ROS

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat (Beckman & Ames., 1998). Cette définition s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles. Ces molécules antioxydantes peuvent agir à deux niveaux : soit en empêchant la formation de radicaux libres oxygénés (antioxydants primaires), soit en épurant les radicaux libres oxygénés (antioxydants secondaires). En outre, l'organisme est capable de réparer ou d'éliminer les molécules endommagées par l'attaque radicalaire.

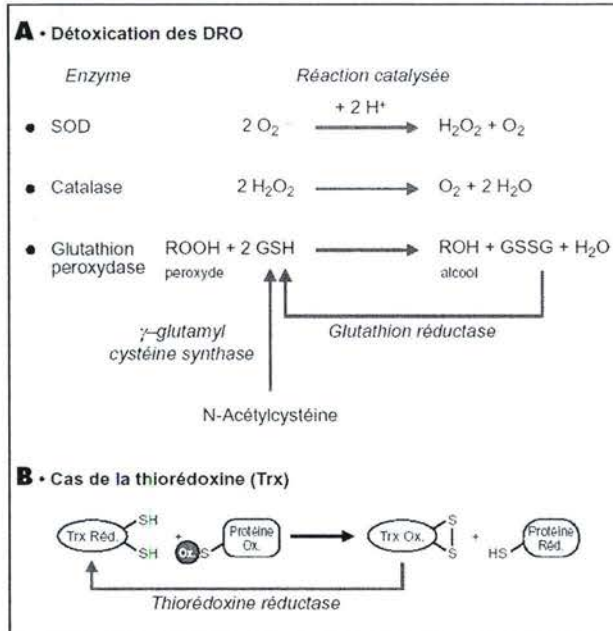
#### a. Les enzymes antioxydantes

Les superoxyde dismutases (SOD) sont des enzymes convertissant l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Ces métallo-enzymes comprennent soit du manganèse (Mn-SOD mitochondriale ou SOD2), soit du cuivre et du zinc (Cu/Zn-SOD cytosolique ou SOD1). Une troisième isoforme de SOD a récemment été découverte au niveau de la matrice extracellulaire d'un nombre limité de tissus (Ookawara *et al.*, 1998). Il s'agit de la EC-SOD ou SOD3.

Le peroxyde d'hydrogène, quant à lui, est soit détruit en oxygène et eau grâce à la catalase, soit transformé en eau lors d'une réaction couplée à l'oxydation du glutathion (GSH), catalysée par les glutathion peroxydases (GPX). Le glutathion oxydé est non toxique et peut en outre être réduit par le NADPH grâce à l'enzyme glutathion réductase (GSHR). Un système similaire à celui de GPX/GSH/GSHR a récemment été mis en évidence. En effet, les peroxiredoxines (PRDX) sont capables de réduire les peroxydes en utilisant comme donneur d'électron la thioredoxine (TXNs). La thioredoxine oxydée est ensuite réduite grâce à la thioredoxine réductase (TXNR) (Fujii & Ikeda., 2002) (Figure 3).

#### b. Les défenses antioxydantes non-enzymatiques

Certains composés antioxydants comme les vitamines E (tocophérol), C (ascorbate), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes apportés par les aliments, sont particulièrement efficaces pour limiter la peroxydation lipidique. Leur effet protecteur est principalement lié à leur capacité à céder un de leurs électrons pour arrêter la propagation radicalaire tout en étant capable soit de céder un second électron lors d'une réaction d'oxydation, soit de se régénérer par le remplacement de l'électron manquant. Ce type d'antioxydant est appelé "scavenger". De très nombreux composés alimentaires peuvent aussi avoir ce comportement : polyphénols, alcaloïdes (Bors *et al.*, 1990).



**Figure 3: Système de défense anti-oxydante** (d'après Morel & Barouki., 1998). Pour lutter contre les effets néfastes du stress oxydatif, les cellules sont équipées de divers systèmes anti-oxydants. **A.** Certaines enzymes dégradent les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO ou ROS): la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase. **B.** Les protéines peuvent subir une oxydation au niveau d'une cystéine. Des réducteurs recyclables comme le glutathion ou la thiorédoxine sont utilisés pour réduire ces acides aminés. Ces molécules oxydées sont ensuite réduites grâce à la thiorédoxine réductase et/ou la glutathion réductase.

#### 1.2.4. Cibles des ROS

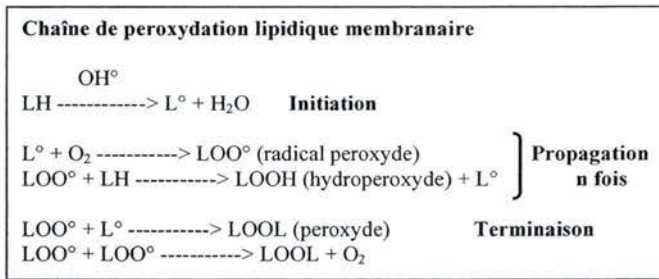
Les espèces réactives dérivées de l'oxygène ont la capacité d'oxyder tous les composants cellulaires tel que les glucides, lipides, protéines, etc (Halliwell & Chirico., 1993) (Stadtman., 1995) (Beckman & Ames., 1998).

##### a. Les lésions des lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle. Ce dernier est capable d'arracher un atome d'hydrogène

sur les carbones situés entre deux doubles liaisons. Cette réaction est appelée "peroxydation lipidique" (Figure 4).

La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne, initiée par l'attaque d'un acide gras insaturé (LH) par un radical R° tel que le radical hydroxyle. Dans un environnement aérobie, l'oxygène se lie au radical lipide pour donner le radical peroxyde (LOO°). Le radical peroxyde peut propager la réaction en chaîne de peroxydation par abstraction d'un atome d'hydrogène d'un autre acide gras insaturé. L'hydroperoxyde (LOOH) peut être décomposé en d'autres espèces réactives : des radicaux alkoxy (LO°), des aldéhydes tel que la malonyldialdéhyde, des alcanes, des alcools, etc (Halliwell & Chirico., 1993).



**Figure 4: Chaîne de peroxydation lipidique membranaire.** La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne caractérisée par trois étapes distinctes: l'initiation, la propagation et la terminaison

Les conséquences de la peroxydation des lipides membranaires sont nombreuses. Les membranes deviennent moins fluides, perdent leur perméabilité sélective, et sous conditions extrêmes, peuvent perdre leur intégrité. Les produits de dégradation de la peroxydation (particulièrement les aldéhydes) peuvent diffuser à travers les membranes et atteindre d'autres compartiments cellulaires. Ces aldéhydes peuvent agir comme agent de pontage et peuvent jouer un rôle dans l'agrégation des protéines. Il a été observé que les produits de la peroxydation lipidique inhibaient des enzymes. De telles modifications entraînent des perturbations fonctionnelles des cellules pouvant aboutir à la mort cellulaire.

b. Les lésions des acides nucléiques

Les bases et les sucres qui composent l'ADN sont particulièrement sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin. Elle peut également entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées. Parmi celles-ci, on trouve la 8-oxoguanine (oxo<sup>8</sup>Gua) et la 8-oxo-2'-

déoxyguanosine (8-OH-dG). Ces deux bases modifiées sont actuellement considérées comme des bons marqueurs des dommages oxydatifs à l'ADN.

### c. Les lésions des protéines

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un ou des groupements sulfhydryles (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs fonctions biologiques (enzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Dröge., 2002). Les protéines oxydées deviennent également plus hydrophobes et peuvent s'associer aux lipides pour former des amas anormaux. Ces amas, appelés "lipofuscines" ou "pigments d'âge", s'accumulent dans les tissus de sujets âgés (Shimasaki *et al.*, 1977) (Sohal & Brunk., 1989). On peut effectivement trouver des neurones de personnes centenaires remplis à 75 % par la lipofuscine (Sitte *et al.*, 2000). Les dommages oxydatifs des protéines ont été associés à la dégénérescence cellulaire qui apparaît au cours du vieillissement, mais également à de nombreuses maladies liées à l'âge telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, la cataracte, la sclérose amyotrophique latérale ou l'arthrite rhumatoïde (Beal., 2002).

#### 1.2.5. ROS et régulation des facteurs de transcription

On sait, depuis quelques années, que le potentiel rédox intracellulaire peut moduler l'activité *in vivo* de certains facteurs de transcription (Klaunig & Kaumendulis., 2004). Chez *Escherichia coli*, la régulation rédox de la transcription passe par deux facteurs de transcription, SoxR (particulièrement sensible à  $O_2^-$ ), et OxyR (particulièrement sensible à  $H_2O_2$ ) qui ne sont opérationnels que sous leur forme oxydée (Storz *et al.*, 1990) (Demple & Amabile-Cuevas., 1991). Une fois activés, SoxR et OxyR vont induire la transcription respective de *soxS* et *oxyS*, des régulateurs positifs qui vont stimuler la transcription d'une série de gènes de défense antioxydante tel que la superoxyde dismutase, KatG (qui encode une enzyme de type catalase-hydroperoxydase), *gorA* (qui encode une glutathion reductase), etc (Volkert & Landini., 2001). Chez les eucaryotes, aucun équivalent simple de ces régulateurs n'a été mis en évidence.

La plupart des facteurs de transcription comportent dans leur séquence protéique des cystéines (sensibles aux variations rédox par leur groupe thiol) fonctionnellement très importantes. En effet, l'oxydation d'une cystéine et la formation anormale d'un pont disulfure peut perturber le comportement d'un facteur de transcription et altérer sa capacité de dimérisation ou sa faculté de liaison à l'ADN (Thannickal & Fanburg., 2000). La modification

redox de l'activité de certains facteurs de transcription permet de mettre en route une réponse à divers stress *via* l'activation ou l'inhibition de l'expression génique. Ce système de régulation a l'avantage d'être très rapide et réversible. La régulation de l'activité des facteurs de transcription Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), Activator protein 1 (AP-1) et p53 par un stress oxydant sont les mieux décrites dans la littérature.

NF- $\kappa$ B est un facteur ubiquitaire jouant un rôle important lors de la réponse rapide à un stress cellulaire (Baeuerle & Baltimore., 1996). Ce facteur de transcription est activé par une variété de stimuli tel que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les UV, les radiations ionisantes, des cytokines pro-inflammatoires, *via* un mécanisme ROS dépendant. Plusieurs études ont ainsi montré que la présence d'antioxydants comme la N-Acétylcystéine (NAC), la pyroldinedithiocarbamate (PDTC), la thiorédoxine ou les vitamines C et E inhibe son activation. Les ROS agiraient en activant des kinases chargées de phosphoryler le facteur I- $\kappa$ B (Inhibitor kappa B), entraînant ainsi sa dissociation de NF- $\kappa$ B ce qui lève l'inhibition de ce dernier (Koong *et al.*, 1994). Une fois libéré, NF- $\kappa$ B migre vers le noyau où il se lie à une séquence cible de l'ADN (GGAnnnTCC) et active la transcription des gènes en aval (Ghosh & Karin., 2002). Cependant, NF- $\kappa$ B (qui comporte une cystéine dans son domaine de liaison à l'ADN) doit être sous forme réduite pour se lier à l'ADN (Mihm *et al.*, 1995). *In vivo*, la réduction de la cystéine critique serait assurée par la thiorédoxine ou une autre protéine appelée Ref-1 (Redox factor 1). La régulation rédox de NF- $\kappa$ B se fait donc à deux niveaux: translocation nucléaire et liaison à l'ADN (Anderson *et al.*, 1994).

Le complexe AP-1 est un facteur de transcription pouvant se présenter sous forme homodimérique Jun-Jun ou sous forme hétérodimérique Fos-Jun (Karin *et al.*, 1997). Il est activé rapidement par divers stress tel que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les UV, le tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), etc. L'oxydation de la cystéine 252 de la protéine Jun située dans le domaine de liaison à l'ADN empêche la liaison d'AP-1 à sa séquence-cible d'ADN (5'TGANTCA3') (Abate *et al.*, 1990). La mutation de cette cystéine en sérine supprime cette sensibilité à l'oxydation et conduit à l'activation permanente de la liaison à l'ADN (Abate *et al.*, 1990). D'autre part, la surexpression ou l'ajout dans le milieu extracellulaire d'antioxydants peut induire fortement l'activité de liaison d'AP-1 (Schenk *et al.*, 1994).

p53, quant à lui, possède douze cystéines dans sa séquence protéique. Neuf d'entre elles se trouvent dans le domaine de liaison à l'ADN alors que les trois autres sont impliquées dans la coordination d'un cation Zn. Parks *et al.*, ont montré que l'activité de liaison à l'ADN de p53

ainsi que la transcription d'un gène rapporteur placé sous le contrôle de p53 diminuent lors d'un traitement oxydant (Parks *et al.*, 1997).

### **1.3. Corrélations entre stress et vieillissement**

#### **1.3.1. Corrélation entre les stress oxydatifs et le vieillissement**

Le stress le plus commun auquel nos cellules sont confrontées est probablement le stress oxydatif. En 1956, D. Harman proposa une théorie selon laquelle les dommages causés par les ROS constituent un facteur important dans le processus du vieillissement biologique (Harman *et al.*, 1956) (Harman *et al.*, 1998). Le vieillissement cellulaire apparaît donc comme fortement dépendant de la production de ROS, des défenses antioxydantes, mais également des systèmes de maintenance cellulaire qui sont responsables de l'élimination ou de la réparation des composants cellulaires endommagés.

Au cours du vieillissement cellulaire, on assiste à une accumulation de composants cellulaires endommagés dont l'élimination et/ou la réparation semble ne plus être aussi efficace que celle assurée par la cellule jeune (Sohal., 1993). La perte d'activité du protéasome observée au cours du vieillissement dans différents types cellulaires ou tissulaires permet d'expliquer, en partie, l'accumulation de protéines anormales dans la cellule (Friguet *et al.*, 2000). Les mécanismes responsables de cette diminution d'activité sont peu connus. Toutefois, l'introduction de lipofuscine artificielle chez les fibroblastes jeunes provoque une inhibition du protéasome, suggérant ainsi une implication directe de ces protéines oxydées dans l'altération fonctionnelle du protéasome (Sitte *et al.*, 2000). Outre le protéasome, plusieurs systèmes de réparation de protéines endommagées voient également leur activité altérée au cours du vieillissement. Il s'agit du système thioredoxine/thioredoxine reductase capable de réduire les ponts disulfures entre deux cystéines et du système méthionine sulfoxyde reductase (MSR) capable de réverser l'oxydation de la méthionine (Friguet *et al.*, 2002) (Petropoulos *et al.*, 2001).

Une perte progressive des capacités cellulaires de réponse face aux stress est également observée lors du vieillissement. Il a été montré que les hépatocytes de rats âgés sont plus sensibles aux effets cytotoxiques du *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP) que ceux de rats nouveau-nés (Adamson & Harman., 1988). La diminution de l'activité de certaines enzymes antioxydantes contribuent à cette baisse d'efficacité des systèmes de défense. En effet, l'activité des superoxyde dismutases et des glutathion peroxydases diminue de manière significative dans le foie et les reins de rats âgés (Cand & Verdetti., 1989).



### 1.3.2. Corrélation entre la production de ROS et la durée de vie

Plusieurs études génétiques réalisées sur des organismes transgéniques comme *Drosophila melanogaster* ont montré qu'un allongement de la vie pouvait résulter de la surexpression d'enzymes antioxydantes telles que la glutathion réductase (Mockett *et al.*, 1999), la catalase, la méthionine sulfoxide reductase A (MSRA) et les superoxyde dismutases 1 et 2 (Orr & Sohal., 1994) (Tableau 1). De même, le traitement de *Caenorhabditis elegans* au moyen de deux composés synthétiques, EUK-8 et EUK-137 mimant les activités superoxyde dismutase et catalase, augmentait la durée de vie du nématode d'environ 44 % (Melov *et al.*, 2000). D'autre part, des souris transgéniques déficientes pour la sous-unité catalytique de la Mn-SOD meurent dans les premières semaines de leur vie, soulignant la nécessité pour l'organisme de pouvoir détoxifier les ROS afin de maintenir l'homéostasie générale. L'allongement de la vie semble donc être associé à une résistance accrue aux ROS et à une activité élevée des enzymes antioxydantes.

Systèmes	Effet sur la durée de vie	Effet sur le stress oxydant	Références
<b>Mouche (<i>Drosophila melanogaster</i>)</b>			
Augmentation de la catalase	Pas d'effet	Réduction de la sensibilité	Orr & Sohal (1992) Griswold <i>et al.</i> (1993) Sun & Tower (1999)
Augmentation de la SOD1	Pas d'effet	Pas d'effet	Seto <i>et al.</i> (1990)
	Augmentation dans certaines souches	Réduction de la sensibilité	Orr et Sohal (1993) Staveley <i>et al.</i> (1990)
Augmentation de la catalase et de la SOD 1	Augmentation	Réduction de la sensibilité	Parkes <i>et al.</i> (1998) Sun & Tower (1999)
	Augmentation	Réduction de la sensibilité	Orr & Sohal (1994)
Augmentation de la SOD2	Pas d'effet	Pas d'effet	Mockett <i>et al.</i> (1999)
Augmentation de la glutathion réductase	Augmentation de la durée de vie sous hypoxie	Réduction de l'oxydation des protéines sous hypoxie	Mockett <i>et al.</i> (1999)
Augmentation de la msrA	Augmentation	Augmentation de la résistance	Ruan <i>et al.</i> (2002)
<b>Souris (<i>Mus musculus</i>)</b>			
Augmentation de la SOD 1	Non déterminé	Augmentation de la sensibilité	Epstein <i>et al.</i> (1987)

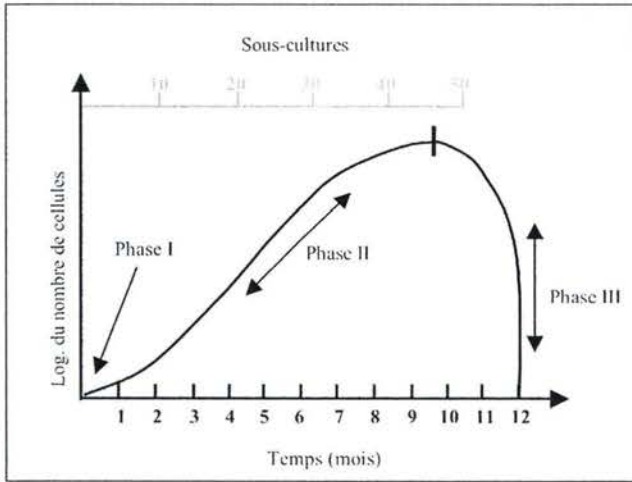
**Tableau 1: Relation entre résistance au stress oxydant et longévité** (d'après Friguet., 2003). L'augmentation de l'expression des différents gènes dans les organismes modèles a été obtenue par transfection. SOD : superoxyde dismutase; msrA: peptide methionine sulfoxyde réductase A.

On sait que la restriction calorique constitue l'une des seules interventions permettant de ralentir le vieillissement chez les mammifères. Elle agirait en modulant l'accumulation des composants cellulaires endommagés, notamment en diminuant la production de ROS (Lee *et al.*, 1999). En effet, il a été démontré que la production de ROS issu des mitochondries chez des souris en restriction calorique était significativement moins élevée que chez des souris nourries normalement (Masoro., 2000). Il est probable que la diète a aussi des effets favorables chez l'homme. Des chercheurs ont entrepris des expériences sur des animaux plus proches des êtres humains que les souris à savoir les singes macaques. Ils ont constaté qu'après 3 à 5 ans de régime maigre, les singes ont une température corporelle plus basse et présentent un taux sanguin d'insuline diminué d'environ 40 % alors que celui de la DHEA (déhydroépiandrosteronesulfate) est augmenté d'environ 50 %. Chez l'homme, ces trois paramètres sont de bons indicateurs de longévité. Les personnes ayant un taux de DHEA plus élevé que la moyenne, mais une température corporelle et un taux d'insuline plus bas, ont une espérance de vie supérieure à celle des personnes pour qui ces paramètres se situent à l'autre extrémité de l'échelle de mesure (Roth *et al.*, 2002).

## CHAPITRE II: LA SENESCENCE REPLICATIVE ET LA SENESCENCE INDUITE PREMATUREMENT PAR DES STRESS (SIPS)

### 2.1. La sénescence rélicative

En 1961, L. Hayflick et P. Moorhead montrèrent que des fibroblastes de poumon foetal humain mis en culture, ont une durée de vie limitée. Ils observèrent que l'évolution des cultures pouvait être divisée selon trois phases: la phase I se rapportant à la mise en culture des cellules à partir du tissu d'origine, la phase II correspondant à une croissance rapide et exponentielle des cellules et la phase III se caractérisant par un ralentissement progressif des divisions cellulaires débouchant sur un arrêt irréversible des mitoses et menant ensuite à la mort cellulaire par nécrose (Hayflick & Moorhead., 1961) (Figure 5).



**Figure 5:** Illustration schématique du phénomène de sénescence rélicative des cellules en culture (d'après Hayflick., 1977). Succession des phases de mise en culture primaire (Phase I), de prolifération (Phase II) et de dégénérescence précédant la mort des cellules (Phase III).

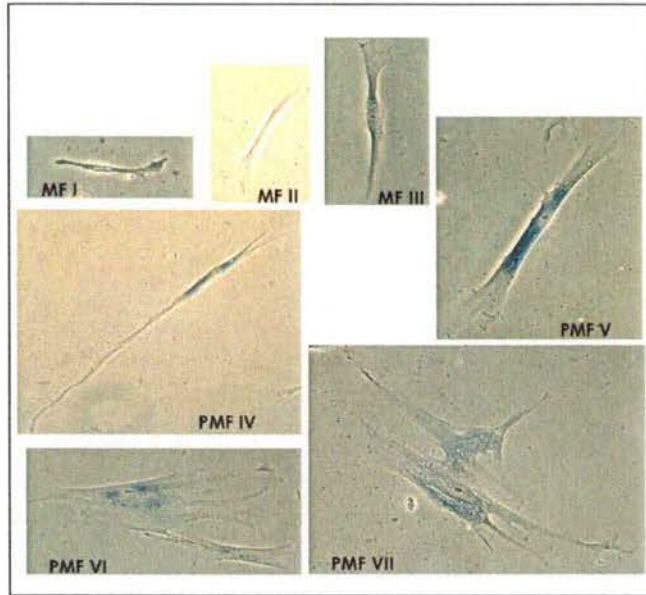
Ce modèle connu sous le nom de sénescence rélicative fut ensuite élargi à d'autres types cellulaires prolifératifs tels que les kératinocytes (Rheinwald & Green., 1975), les cellules endothéliales (Mueller *et al.*, 1980), les cellules adrénocorticales (Hornsby & Gill., 1978), les lymphocytes (Tice *et al.*, 1979), les chondrocytes (Évans & Georgescu., 1983), etc, de telle sorte qu'il est actuellement accepté comme modèle général du vieillissement *in vitro* des cellules à potentiel prolifératif limité. Différents biomarqueurs de la sénescence rélicative *in*

*vitro* apparaissent lors du vieillissement *in vivo*. Parmi ceux-ci, on trouve une morphologie sénescence (Bayreuther *et al.*, 1988), une activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA  $\beta$ -gal) (Dimri *et al.*, 1995) (Sigal *et al.*, 1999) (Mishima *et al.*, 1999), des délétions dans l'ADN mitochondrial (Liu *et al.*, 1998). Toutefois, il semble qu'il n'y ait qu'une minorité de cellules qui deviennent sénescences *in vivo* (Shay & Wright., 2000). D'autre part, il a été montré que des fibroblastes issus de centenaires sont capables de proliférer aussi longtemps que des cellules issues d'individus plus jeunes (Tesco *et al.*, 1998). Cette hétérogénéité cellulaire au sein des tissus a été décrite comme la "mosaïque d'Hayflick" (Toussaint *et al.*, 2002). Malgré le fait que les cellules sénescences soient minoritaires dans les tissus, il est probable qu'elles interfèrent avec l'homéostasie des tissus, participant ainsi au vieillissement tissulaire (Shay & Wright., 2000).

## **2.2. Les biomarqueurs de la sénescence réplivative**

### **2.2.1. Morphologie cellulaire**

De profonds changements morphologiques apparaissent lors de la sénescence réplivative. La taille des cellules augmente et leur forme se diversifie. Les études du groupe de Bayreuther montrèrent qu'il est possible de classer les fibroblastes humains selon sept morphologies bien distinctes qui se succèdent au cours des divers passages en culture des fibroblastes (Bayreuther *et al.*, 1988). Ils proposèrent d'appeler morphotypes, ces différentes morphologies apparaissant au cours du vieillissement des fibroblastes. La figure 6 nous montre les différents morphotypes observés pour des fibroblastes de derme humain. Les morphotypes mitotiques (MF I, II et III) se retrouvent principalement dans les cultures jeunes. Ces cellules sont de petites tailles et se divisent activement. En revanche, les morphotypes post-mitotiques (MF IV, V et VI) apparaissent progressivement au fil des passages en culture et présentent une morphologie de plus en plus étalée. Le septième morphotype correspond à des cellules nécrotiques. Ce morphotype est très rarement observable.



**Figure 6:** Morphotypes et SA  $\beta$ -gal des FHDs de derme AG04431 (FS). On peut classer les fibroblastes en morphotypes mitotiques (MF I-MF III) et post-mitotiques (PMF IV-PMF VII). On observe une coloration bleue chez les FHDs post-mitotiques, résultant de la coloration histochimique permettant de mettre en évidence l'activité de la SA  $\beta$ -gal.

#### 2.2.2. L'activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA $\beta$ -gal)

La  $\beta$ -galactosidase est une enzyme lysosomale capable d'hydrolyser le lactose en glucose et galactose et dont l'activité est optimale à pH 4. En 1995, l'équipe de J. Campisi a mis en évidence chez les cellules sénescences, l'existence d'une activité  $\beta$ -galactosidase qui leur est propre et pour cette raison nommée "Senescence-Associated  $\beta$ -galactosidase Activity (SA  $\beta$ -gal) (Dimri *et al.*, 1995). L'activité de cette enzyme est détectable dans les cellules sénescences par histochimie à pH 6 grâce au X-GAL, un substrat artificiel de l'enzyme, qui après clivage colore les cellules en bleu (Figure 6). Il est essentiel que la révélation de cette activité ait lieu à pH 6 et non à pH 4 sinon on détecte l'activité  $\beta$ -galactosidase "normale" à la fois chez les cellules jeunes et âgées. L'origine de cette activité SA  $\beta$ -gal est toujours inconnue, toutefois, on pense que cette activité apparaît suite à un élargissement du pic de pH optimal qui serait dû à l'augmentation de la taille des lysosomes chez les cellules sénescences, permettant ainsi une accumulation de l'enzyme dont l'activité devient détectable dans une gamme de pH plus élargie (Kurz *et al.*, 2000).

Ce biomarqueur est relativement ubiquitaire. En effet, diverses études ont permis de le mettre en évidence chez plusieurs types cellulaires humains dont les fibroblastes (Dimri *et al.*, 1995), les kératinocytes (Dimri *et al.*, 1995), les mélanocytes (Medrano *et al.*, 1995), les hépatocytes (Sigal *et al.*, 1999), les cellules endothéliales, etc. Ce biomarqueur représente donc un outil remarquable pour la détection des cellules sénescents au sein d'une culture cellulaire.

### 2.2.3. Altération du génome mitochondrial

L'énergie nécessaire au métabolisme cellulaire provient essentiellement des mitochondries sous forme d'ATP. Les mitochondries possèdent un génome circulaire de 16569 paires de base (pb) codant en partie pour les protéines impliquées dans la respiration mitochondriale. Au cours du vieillissement cellulaire, de nombreuses mutations et délétions dans ce génome ont été observées. Parmi celles-ci, on retrouve celles touchant à la chaîne de transport des électrons ainsi que celles portant sur des gènes impliqués dans la réplication mitochondriale (Lezza *et al.*, 1994) (Michikawa *et al.*, 1999). La plus fréquente est une délétion de 4977 pb dite « délétion commune » de l'ADN mitochondrial que l'on retrouve en sénescence répllicative (Dumont *et al.*, 2000). D'autre part, plusieurs études réalisées sur différents échantillons de tissus humains ont montré que la fréquence de cette délétion augmentait durant le vieillissement *in vivo*. Ces études portaient sur des biopsies de peau (Pang *et al.*, 1994), de rein (Liu *et al.*, 1998), de poumon (Fahn *et al.*, 1996) et de foie (Yen *et al.*, 1994). Les mécanismes responsables de l'apparition de ces délétions sont encore flous. Toutefois, une corrélation entre l'exposition de l'ADNmt à des stress oxydatifs et l'apparition de ces délétions a été établie, suggérant que les ROS participent à l'altération du génome mitochondrial (Filser *et al.*, 1997).

### 2.2.4. Modulation de l'expression génique

Plus de 80 gènes voient leur niveau d'expression varier lors de la sénescence de fibroblastes humains en culture. Il s'agit pour la plupart de gènes codant pour des facteurs de croissance, des récepteurs, des composants de la matrice extracellulaire (MEC), des régulateurs du cycle cellulaire, etc (Cristofalo *et al.*, 1998).

Parmi ces gènes, la fibronectine, l' $\alpha$ 1-procollagène de type II, l'ostéonectine, l'apolipoprotéine J et SM22 sont couramment utilisés comme biomarqueur de la sénescence répllicative.

La fibronectine et l' $\alpha$ 1-procollagène de type II sont des composants essentiels de la matrice extracellulaire (MEC) associés à des fonctions telles que l'adhésion cellulaire, l'organisation

du cytosquelette, la migration, la croissance et la différenciation cellulaire (Garcia *et al.*, 1999). La fibronectine interviendrait entre autres dans les changements morphologiques observés lors de la sénescence réplivative (Kumazaki *et al.*, 1993).

L'ostéonectine contribue au remodelage des tissus en induisant l'expression de métalloprotéases telles que la collagénase et la gélatinase capable de dégrader la MEC et les membranes basales. D'autre part, il a été démontré que l'ostéonectine était capable d'inhiber l'entrée en phase S de certains types cellulaires. En effet, cette protéine peut se fixer au PDGF (platelet derived growth factor) empêchant ainsi la reconnaissance de ce dernier par son récepteur spécifique (Pichler *et al.*, 1996).

L'apolipoprotéine J, également appelée clusterine, est un glycoprotéine hétérodimérique sécrétée de 75-80 kDa. Cette protéine semble protéger les cellules lors de stress oxydatifs en empêchant l'altération radicalaire de certaines protéines (Dumont *et al.*, 2002) (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005). En effet, il a été montré que l'apolipoprotéine J est capable de s'associer à des protéines modifiées suite à des stress et de former des complexes, empêchant ainsi leurs précipitations (Humphreys *et al.*, 1999).

SM22, quant à elle, est une protéine du cytosquelette de 22 kDa abondante dans les cellules musculaires lisses. Celle-ci serait capable de se lier aux fibres de stress ainsi qu'à la fibronectine et interviendrait donc dans l'organisation du cytosquelette (Fu *et al.*, 2000).

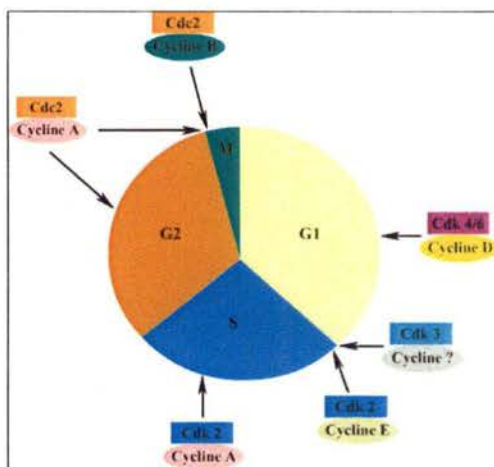
## 2.2.5. Arrêt du cycle cellulaire en fin de phase G1

### a. Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est subdivisé en 4 phases:

- La phase G1 qui est une phase de croissance et de récupération.
- La phase S correspondant à la duplication du génome.
- La phase G2 où se met en place les mécanismes pour la division cellulaire.
- La phase M correspondant à la mitose et à la division cellulaire.

En fin de la phase G1, la cellule passe par un point de restriction R, lui permettant de déterminer si toutes les conditions sont remplies pour entamer une nouvelle division (abondance de milieu nutritif, importance des dommages à l'ADN, etc) (Figure 7).



**Figure 7: Régulation du cycle cellulaire.** Illustration des différentes phases du cycle cellulaire ainsi que les différents complexes cycline/CDK impliqués dans la régulation du cycle.

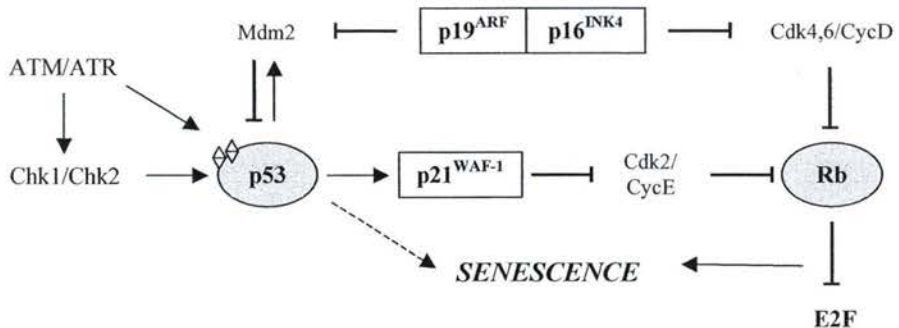
La progression du cycle cellulaire à travers ces différentes phases est régulée par une famille de protéines kinases appelées CDK (cyclin dependent kinases) formant des complexes avec diverses cyclines. La progression en phase G1 nécessite la participation des cyclines de type D qui répondent aux facteurs de croissance au niveau du point de restriction, moment où la cellule prend la décision d'entrer en phase S. Les kinases cyclines D-dépendantes, cdk4 et cdk6 lié à la cycline D, phosphorylent entre autre la protéine de rétinoblastome pRb, permettant la libération des facteurs de transcription, e2F et DP1, qui contrôlent l'expression des protéines requises pour la phase S. Le complexe cdk2/cycline E joue un rôle important lors de la transition G1/S, il est indispensable pour la mise en route de la synthèse d'ADN. La cycline E est rapidement dégradée dès que la réplication débute et est remplacée par la cycline A. Le complexe cdk2/cycline A est nécessaire pour la poursuite de la réplication de l'ADN et contrôle également la durée de la phase S en inactivant les facteurs e2F et DP1 par phosphorylation. L'entrée en phase M est gouvernée par le complexe cdc2/cycline B.

b. Arrêt du cycle cellulaire en fin de phase G1/S

Les cellules sénescents sont caractérisées par un arrêt irréversible en fin de phase G1/S du cycle cellulaire. Des expériences de marquage de noyaux à la thymidine tritiée montrent que 80-90 % des noyaux issus de cultures à faible nombre de passages en culture, sont positifs



et que cette proportion décroît avec l'âge de la culture (Cristofalo & Sharf., 1973). Cette perte progressive de la capacité répliquative culmine finalement par l'arrêt complet et définitif des divisions à la limite G1/S du cycle cellulaire. Le mécanisme responsable de cet arrêt du cycle cellulaire fait principalement intervenir les protéines p53 et pRb, qui sont des suppresseurs de tumeur (Ben-Porath & Weinberg., 2005) (Figure 8).



**Figure 8: Représentation schématique de l'arrêt de prolifération dirigé par les protéines p53 et pRb** (d'après Ben-Porath & Weinberg., 2005). Lors de la sénescence, p53 est activé par phosphorylation par les protéines ATM/ATR et Chk1/Chk2 et par la protéine p19<sup>ARF</sup> qui séquestre Mdm2. Une fois activé, p53 induit l'arrêt du cycle cellulaire en surexprimant p21<sup>WAF-1</sup> et en activant pRb qui va séquestrer le facteur de transcription E<sub>2</sub>F. pRb est également activé par p16<sup>INK-4</sup>.

p53 est un facteur de transcription jouant un rôle majeur dans l'arrêt de la prolifération et l'apoptose. En condition normale, p53 est présent en très faible quantité dans la cellule alors qu'on le retrouve en abondance chez les cellules sénescents. De plus, l'activité de liaison à l'ADN et de transactivation de p53 augmentent lors de la sénescence (Kulju *et al.*, 1995) (Atadja *et al.*, 1995). Plusieurs protéines participent à son activation. Ainsi, l'activation des protéines ATM/ATR et Chk1/Chk2 par des agents causant des dommages à l'ADN, induit la phosphorylation et la stabilisation post-traductionnelle de p53 (Wahl & Carr., 2001) (d'Adda di Fagagna *et al.*, 2003). D'autre part, la protéine p19<sup>ARF</sup>, en séquestrant la protéine codée par le gène Mdm2, participe également à l'activation de p53 (Lowe & Sherr., 2003). En effet, Mdm2, dont l'expression est réprimée lors de la sénescence, est une ubiquitine ligase capable d'activer la dégradation protéolytique de p53 par le protéasome (Haupt *et al.*, 1997). La séquestration de Mdm2 par p19<sup>ARF</sup> empêche donc la dégradation de p53, qui peut dès lors s'accumuler dans la cellule. Une fois activé, p53 exerce son rôle de facteur de transcription en induisant l'expression de différents gènes cibles. Parmi ceux-ci, on trouve l'inhibiteur de kinase dépendant des cyclines (CKI) p21<sup>Waf-1</sup> dont le niveau d'ARNm est présent en quantité beaucoup plus élevée (10 à 20 fois plus) chez les fibroblastes

sénescents en comparaison avec des fibroblastes jeunes (Wong & Riabowol., 1996). Cette protéine est capable d'inhiber l'activité kinasique des CDK en s'associant au complexe cdk2/cyclineE (Dulic *et al.*, 1994), intervenant dans la phosphorylation de la protéine de rétinoblastome pRb (Sherr & Roberts., 1999). L'inhibition de cette kinase est responsable de l'hypophosphorylation de pRb.

La protéine pRb est un corépresseur transcriptionnel dont l'activité est régulée par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation (Herwig & Strauss., 1997). Lorsque pRb est hypophosphorylée, elle agit en tant qu'inhibiteur du cycle cellulaire et retient les cellules en phase G1. En effet, sous sa forme hypophosphorylée, pRb se lie et séquestre les facteurs de transcription de la famille E<sub>2</sub>F (Narita *et al.*, 2003). Ceux-ci sont des facteurs de transcription hétérodimériques formés par l'association d'un membre de la famille E<sub>2</sub>F (E<sub>2</sub>F. 1,-2,-3,-4,-5) avec un membre de la famille DP (DP-1,-2,-3) (La Thangue., 1994). La séquestration et l'inactivation d'E<sub>2</sub>F suite à l'hypophosphorylation de pRb résulte en l'inhibition de la transcription de nombreux gènes nécessaires au passage en phase S du cycle cellulaire et à la répllication de l'ADN. Plusieurs gènes régulés par E<sub>2</sub>F voient leur niveau d'expression fortement diminué lors de la sénescence répllicative (Campisi., 1996). Parmi ceux-ci, certains sont des régulateurs du cycle cellulaire comme les cyclines A, B, D et E. D'autres sont des gènes directement impliqués dans la synthèse de l'ADN et le métabolisme des nucléotides comme l'ADN polymérase  $\alpha$ , la thymidine kinase (TK), la dihydrofolate reductase (DHFR), la thymidylate synthétase (TS), la ribonucléotide réductase (RNR), le "Proliferating Cell Nuclear Antigen" (PCNA). D'autres encore sont des membres de la famille E<sub>2</sub>F eux-même (Good *et al.*, 1996) (Kouzarides *et al.*, 1995) (Weinberg *et al.*, 1996).

Une deuxième voie est également impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en sénescence répllicative. Celle-ci fait intervenir la CDKI p16<sup>INK-4</sup> qui est responsable de l'inactivation des complexes cdk4/cycline D et cdk6/cycline D participant à la phosphorylation de pRb (Rheinwald *et al.*, 2002). La protéine p16<sup>INK-4</sup> est fortement induite lors de la sénescence répllicative (Alcorta *et al.*, 1996) (Palmero *et al.*, 1997) et se maintient à un niveau très élevé pendant au moins deux mois après la dernière division cellulaire (Stein & Dulic., 1998). pRb peut donc être à la fois activé par la voie faisant intervenir les protéines p53 et p21<sup>Waf-1</sup> mais aussi par celle impliquant la protéine p16<sup>INK-4</sup>.

## 2.2.5. Le raccourcissement des télomères

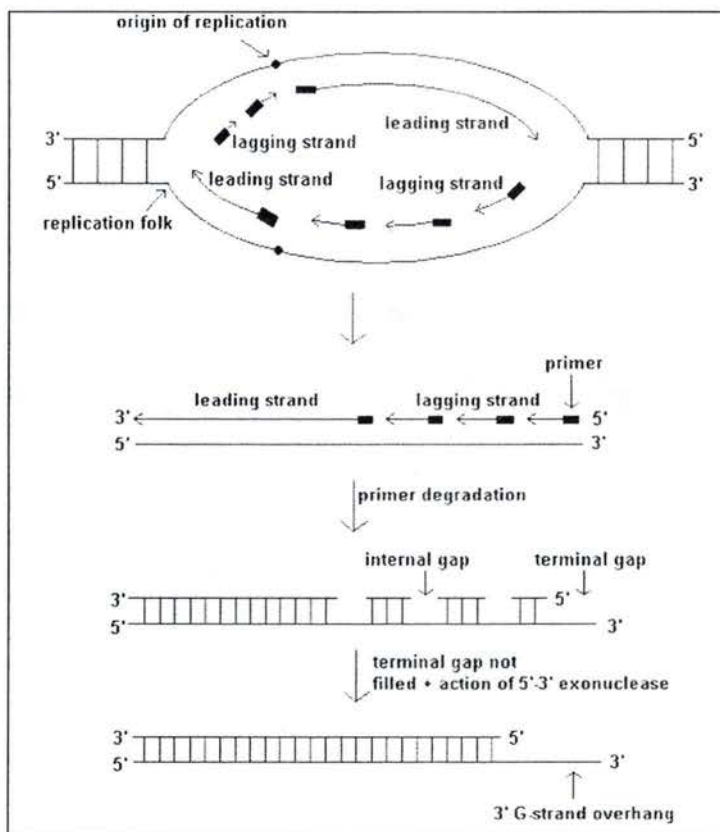
### a. Structure et fonction des télomères

Il y a plus de soixante ans, H. Muller et B. McClintock démontrèrent l'existence de structures spécialisées protégeant l'extrémité des chromosomes qu'ils nommèrent "télomères" (Muller., 1938) (McClintock., 1941). Chez les eucaryotes, les télomères sont composés de centaines, voire de milliers d'éléments nucléotidiques répétitifs placés en tandem dans la région terminale de chaque chromosome. Chez les vertébrés, l'unité fondamentale de ces éléments est la séquence TTAGGG (Meyne *et al.*, 1989). De nombreuses protéines sont associées aux télomères formant ainsi des structures tridimensionnelles appelées "télosomes" (Blackburn., 1991). La protéine la mieux caractérisée est RAP1, de *Saccharomyces cerevisiae*, qui lie à intervalles réguliers l'ADN télomérique et participe à la régulation de sa longueur (Conrad *et al.*, 1990). Chez les mammifères, l'homologue de cette protéine est TRF-2. Cette protéine semble empêcher les télomères courts de fusionner. En effet, l'inhibition de TRF-2 conduit à l'arrêt du cycle cellulaire suite à la fusion interchromosomique des télomères.

Les télomères sont des éléments génétiques essentiels pour la stabilité des chromosomes (Gilson *et al.*, 1993). Ils empêchent la dégradation des extrémités chromosomiques, préviennent les recombinaisons illégitimes et empêchent les fusions entre chromosomes. En effet, les chromosomes dont les extrémités sont cassées deviennent instables et sont portés à fusionner, donnant naissance à des chromosomes dicentriques (Blackburn., 1991). Les télomères permettent de différencier les extrémités des chromosomes de cassures doubles brins et protègent celles-ci de la dégradation par les exonucléases (Bourgain *et al.*, 1991).

### b. Le raccourcissement des télomères et la sénescence réplivative

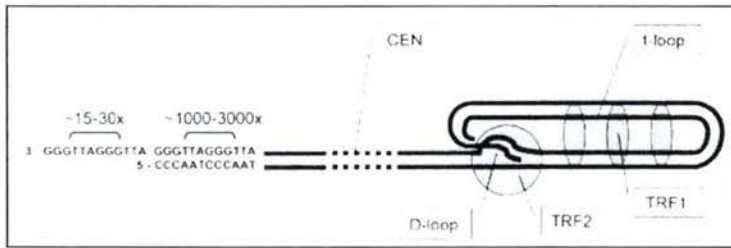
De nombreuses études ont démontré que la longueur des télomères présents dans les cellules somatiques humaines raccourcit progressivement en fonction de l'âge des individus analysés (Hastie *et al.*, 1990) (Lindsey *et al.*, 1991) (Allsopp *et al.*, 1992). Les télomères les plus courts sont retrouvés chez les octogénaires (5 à 7 Kb) tandis que chez les nouveau-nés, la longueur des télomères oscillent entre 10 à 15 Kb. Ce raccourcissement *in vivo* a été estimé à environ 100 à 150 pb par passage en culture *in vitro* (Allsopp *et al.*, 1992). Ce raccourcissement est expliqué, en partie, par le mode d'action de l'ADN polymérase lors de la réplication (Figure 9).



**Figure 9: Mécanisme de raccourcissement des télomères.** Durant la réplication, l'un des deux brins est synthétisé de manière discontinue. Cette synthèse nécessite des amorces ARN (fragments d'Okazaki). Les amorces sont ensuite dégradées et les espaces vides sont comblés à l'exception de celle qui subsiste à l'extrémité 5'. Il en résulte un raccourcissement de l'extrémité du chromosome. ([http://www.medscape.com/viewarticle/482667\\_2](http://www.medscape.com/viewarticle/482667_2)).

En effet, l'ADN polymérase, ne pouvant progresser que dans le sens 5'-3', génère la synthèse d'un brin continu et d'un brin discontinu. Le brin discontinu apparaît sous forme de petits fragments, dits d'Okazaki, amorcés par une courte séquence d'ARN ( $\pm 10$  bases), et prolongés par une séquence d'ADN beaucoup plus longue (100-600 bases). Les amorces d'ARN sont ensuite dégradées par une RNase ce qui fait apparaître, entre les fragments d'ADN, des brèches que des enzymes réparatrices colmatent, formant ainsi une chaîne d'ADN continue. Ce système de réparation étant incapable de remplacer l'amorce située à l'extrémité 5' du brin discontinu, il s'ensuit que le télomère "discontinu" néoformé possède

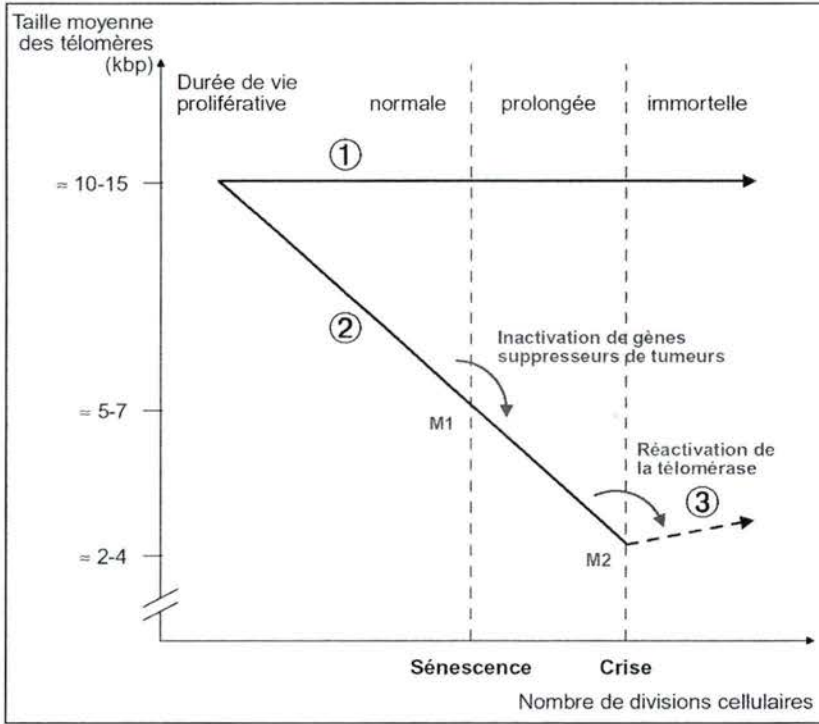
une queue simple brin longue de quelques bases tandis que le télomère "continu" en est dépourvu. À partir de cette observation est née la théorie télomérique du vieillissement cellulaire. Selon celle-ci, le raccourcissement critique d'au moins un télomère peut induire un arrêt du cycle cellulaire (Allsopp *et al.*, 1992). Différents modèles ont été proposés afin d'expliquer par quel mécanisme le raccourcissement des télomères pourrait induire la sénescence répllicative. En 1999, Griffith *et al.* montrèrent que l'extrémité des télomères peuvent adopter une conformation dite en "lasso" (ou t-loop), qui apparaît suite à l'invasion de la région double brin (db) du télomère par la queue simple brin (sb) (Griffith *et al.*, 1999) (Figure 10).



**Figure 10:** Structure en "lasso" des télomères (d'après von Zglinicki *et al.*, 2000). La conformation en lasso (t-loop) est stabilisée par des protéines, dont les principales sont TRF1 et TRF2. TRF-1 se lie à la région double brin des télomères, tandis que TRF2 se lie à la boucle D (D-loop), où la queue simple brin s'insinue dans la région db.

Plusieurs protéines tel que TRF-1 et TRF-2 sont associées à ces boucles. *In vitro*, TRF-1 forme des gaines autour de l'ADN et y induit une courbure qui facilite la formation de lasso. TRF-2, quant à elle, favorise l'invasion de la région db par la queue sb et par conséquent empêche les télomères courts de fusionner. La suppression de cette protéine conduit à l'arrêt du cycle cellulaire suite à la fusion interchromosomique des télomères (Takai *et al.*, 2003). A l'opposé, la surexpression de TRF-2 induit un raccourcissement accéléré des télomères (Karlseider *et al.*, 2002). Plusieurs auteurs ont suggéré que le raccourcissement des télomères pouvait générer des télomères "sans protection" (uncapped), dont la structure en lasso serait rompue (Blackburn *et al.*, 2001) (Cristofalo *et al.*, 2004). Récemment, il a été montré que la sénescence était associée à la perte de structure en lasso des télomères (Stewart *et al.*, 2003). Ces télomères dépourvus de protection sont reconnus et perçus par la cellule comme dommage à l'ADN ce qui active le suppresseur de tumeur, p53, enclenchant ainsi un arrêt de prolifération en phase G1 du cycle cellulaire (Vaziri & Benchimol., 1996) (d'Adda di Fagagna *et al.*, 2003).

L'arrêt des divisions provoqué par le raccourcissement des télomères est un phénomène physiologique normal (Figure 11).



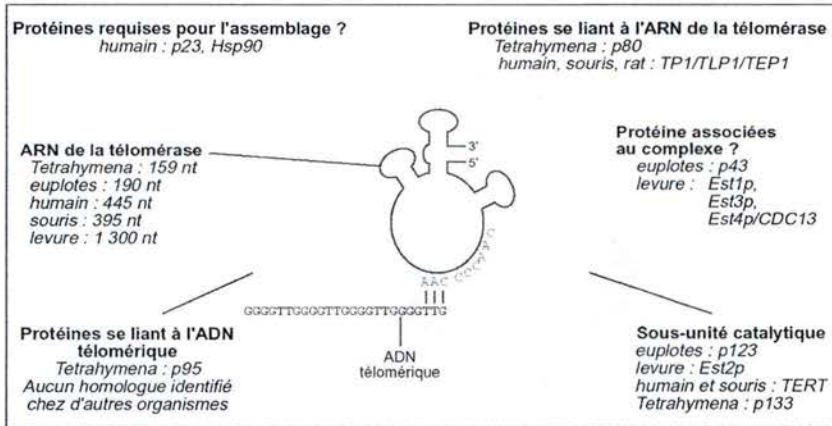
**Figure 11: Représentation schématique de l'implication de la longueur des télomères dans la sénescence répllicative** (d'après Harley et al., 1992). (1) La télomérase est active dans les cellules germinales et dans certaines cellules souches contribuant à la stabilité de la longueur des télomères. (2) Chez les cellules somatiques en culture, la longueur des télomères raccourcit à chaque division cellulaire jusqu'à atteindre une longueur critique qui provoquerait un signal d'arrêt du cycle cellulaire, phénomène appelé sénescence (M1). L'entrée en sénescence peut être supprimée suite à la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs. Cependant, les télomères de ces cellules transformées continuent de raccourcir contribuant à une instabilité des chromosomes. Les cellules vont alors entrer en crise (M2) caractérisée par la mort d'un grand nombre de cellules. (3) Certaines cellules vont survivre à la crise et devenir immortelles suite à l'activation de la télomérase, qui va stabiliser la longueur des télomères.

Si les cellules n'obéissent pas au signal d'arrêt, leurs chromosomes commencent à fusionner dès que les répétitions télomériques couvrent moins de 5 kb. Les fusions provoquent des aberrations chromosomiques, dues au fait que les chromosomes possèdent deux

centromères et ne se séparent pas correctement lors de la mitose. Les cellules deviennent aneuploïdes. Dans la plupart des cas, ces cellules meurent suite à un excès ou un déficit de gènes, toutefois certaines échappent à ce phénomène de crise et prolifèrent de manière désordonnée. Un surcroît de proto-oncogènes tend à stimuler ces divisions. D'autre part, la perte d'hétérozygotie peut également conduire à la prolifération anarchique de ces cellules en éliminant l'allèle fonctionnel d'un suppresseur de tumeur dont le produit empêche la poursuite des divisions. Le gène p53 est muté dans plus de 50% des tumeurs apparaissant chez les êtres humains (Wirman *et al.*, 1997). Dans la plupart des cas, il s'agit de mutations ponctuelles, ayant pour effet de remplacer un acide aminé par un autre dans la protéine p53, et plus particulièrement dans son domaine de liaison à l'ADN.

Contrairement aux cellules somatiques, les cellules germinales et les cellules tumorales ne subissent pas de raccourcissement télomérique (Harley & Kim., 1996). En effet, ces cellules possèdent une télomère synthase appelée télomérase capable d'empêcher l'érosion des télomères (Greider & Blackburn., 1985) (Kim *et al.*, 1994). L'activité télomérase a été identifiée pour la première fois chez le protozoaire cilié du genre *Tetrahymena thermophila* (Greider & Blackburn., 1985). Plusieurs expériences faites sur cet unicellulaire montrent que la télomérase est essentielle pour la viabilité à long terme. Cette enzyme est une ribonucléoprotéine à activité transcriptase inverse constituée de deux sous-unités de nature différente (Morin *et al.*, 1989) (Figure 12) ; une sous-unité catalytique, appelée hTERT chez l'homme, capable de polymériser des désoxyribonucléotides sur une matrice d'ARN et de maintenir une taille constante des télomères (Lendvay *et al.*, 1996) (Meyerson *et al.*, 1997) et une sous-unité structurale, appelée TERC, constituée d'une matrice d'ARN contenant un motif de 9 à 30 nucléotides. Celle-ci est complémentaire de la séquence télomérique et est responsable de l'extension de l'extrémité 3' sortante du télomère (Feng *et al.*, 1995). Une fois cette extrémité 3' allongée, une nouvelle amorce peut s'hybrider et permettre la synthèse du brin complémentaire. L'introduction de la sous-unité catalytique hTERT dans les fibroblastes humains, qui en sont habituellement dépourvus, instaure l'activité de la télomérase, permettant ainsi de maintenir la taille des télomères (Weinrich *et al.*, 1997). Ces fibroblastes sont capables d'être maintenus en culture pendant plus de 300 générations alors que leur capacité normale de doublement dépasse rarement 90 cumulative population doublings (CPDs) (Bodnar *et al.*, 1998). Ces observations permettent de conclure que l'expression ectopique de la télomérase dans des fibroblastes prévient la sénescence. Plusieurs études ont analysé si les cellules immortalisées suite à l'introduction du gène *hTERT* expriment un phénotype de cellules transformées (Jiang *et al.*, 1999) (Morales *et al.*, 1999). Ils observèrent que ces cellules n'avaient pas la capacité de proliférer en l'absence de sérum, ne formaient pas de colonies en agar mou, exprimaient la propriété d'inhibition de contact, et que leur caryotype était normal. De plus, les mécanismes de surveillance du

contrôle du cycle cellulaire dépendant des protéines p53 et Rb étaient fonctionnels. Toutefois, plusieurs études comparatives de profils d'expression génique ont montré que les fibroblastes BJ immortalisés par la télomérase sont biochimiquement différents des fibroblastes BJ normaux (Lindvall *et al.*, 2003) (de Magalhaes *et al.*, 2004).



**Figure 12: Composantes associées au complexe de la télomérase dans différents organismes.** La télomérase est une transcriptase inverse composée d'une sous unité catalytique et d'une molécule d'ARN. Le schéma représente les composantes de la télomérase du protozoaire Tetrahymena: p133, la sous unité catalytique; p95, une protéine qui lie l'ADN télomérique; p80, une protéine qui se lie à l'ARN matrice de la télomérase; une molécule d'ARN de 159 nucléotides. La sous-unité catalytique ainsi que l'ARN matrice de la télomérase ont été identifiées dans différents organismes tels que les Euplotes, la levure, la souris et l'humain (Nugent *et al.*, 1998).



### **2.3. La Sénescence Induite Prématurément par des stress (SIPS)**

#### 2.3.1. Introduction

Un stress peut être défini comme toute perturbation d'un facteur exogène auquel un système vivant est exposé. Au cours de leur vie, les cellules sont soumises à une multitude de stress, tels que des stress osmotiques, oxydatifs, mécaniques, thermiques, etc. auxquels elles font face plus ou moins efficacement en modulant l'activité de certaines voies métaboliques. C'est ce qu'on appelle la réponse aux stress. Dans cette réponse aux stress, on distingue d'une part la réponse immédiate et la réponse à long terme : la réponse immédiate détermine le sort de la cellule d'après l'activation de certaines cascades de kinases : soit la cellule meurt par apoptose ou nécrose, soit elle survit et subit ou non des modifications. La réponse à long terme, quant à elle, correspond à des variations d'expressions géniques et d'activités cellulaires pouvant être observées jusqu'à plusieurs semaines après des stress d'intensité subcytotoxique.

#### 2.3.2. La Sénescence Induite Prématurément par des stress (SIPS)

L'exposition de différents types cellulaires prolifératifs à des stress oxydatifs subcytotoxiques induit l'apparition précoce des biomarqueurs de la sénescence (Tableau 2). Ce phénomène est appelé "Sénescence Induite Prématurément par des stress ou SIPS" (Toussaint *et al.*, 2000) (Brack *et al.*, 2000). Différents modèles cellulaires de SIPS ont été mis au point. Ils peuvent être distingués par la nature de l'agent stressant, par la durée du stress, le type cellulaire utilisé ou le type de protocole utilisé. On peut également classer ces modèles de SIPS selon deux grandes classes: les modèles faisant intervenir une exposition chronique à l'agent stressant et les modèles où la sénescence est induite suite à l'exposition répétée ou non à des agents stressants à une concentration subcytotoxique.

##### a. Les stress chroniques et subcytotoxiques

L'équipe de T. von Zglinicki a montré que des FHDs WI-38 soumis à une hyperoxie chronique entraînent en sénescence prématurée après environ 3 passages en culture (von Zglinicki *et al.*, 1995). Ces FHDs cultivés sous 40% d'oxygène subissent un raccourcissement accéléré de leurs télomères (500 pb par doublement de population au lieu de 90 pb observé chez les cellules en normoxie). Selon eux, les cassures simples et doubles brins de l'ADN, apparaissant lors de dommages oxydatifs, s'accumulent préférentiellement

Conditions	Type cellulaire	Espèce	Morphologie sénescente	SA β-gal	Anéli prolifératif	stop G1	Reference
tert-butylhydroperoxyde	Fibroblastes foetaux WI-38	Homme	+	+	+		(Dumont P. et al., 2002; Dumont P. et al., 2001)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fibroblastes foetaux IMR-90	Homme	+	+	+		(Dumont P. et al., 2000)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fibroblastes foetaux IMR-90	Homme	+	+	+		(Frapcat C. et al., 2001)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fibroblastes foetaux IMR-90	Homme	+	+	+		(Wolf F. et al., 2002)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fibroblastes cardiaques	Rat	+	+	+		(Swik D. et al., 2001)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ou UVB	Fibroblastes BJ et BJ-HERT	Homme	+	+	+		(de Magalhães J. et al., 2002)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> UVB ou irradiation	Fibroblastes foetaux WI-38 et WI-38 HERT	Homme	+	+	+		(Gorbunova V. et al., 2002)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> UVB ou irradiation	Fibroblastes foetaux IMR-90 et IMR-90 HERT	Homme	+	+	+		(Gorbunova V. et al., 2002)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> UVB ou irradiation	Fibroblastes HIC-02 et HIC-02 HERT	Homme	+	+	+		(Gorbunova V. et al., 2002)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> UVB ou irradiation	Fibroblastes E1123-1 et E1123-1 HERT	Homme	+	+	+		(Gorbunova V. et al., 2002)
UV	Fibroblastes HH-8	Homme	+	+	+		(Rodemann H. et al., 1989)
UVB	Mélanocytes	Homme	+	+	+		(Medrano E. et al., 1995)
UVB	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Chantoux F. et al., 2002)
Radiation ionisante	Cellules endothéliales	Bovin	+	+	+		(Oh C. et al., 2001)
Irradiation-γ	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Di Leonardo A. et al., 1994)
Champs électromagnétiques impulsionnels	Fibroblastes WI-38 et HI-8	Homme	+	+	+		(Rodemann H. et al., 1989)
Xanthine + xanthine oxydase	Fibroblastes WI-38 et HI-8	Homme	+	+	+		(Rodemann H. et al., 1989)
Mitomycin C	Fibroblastes cardiaques	Rat	+	+	+		(Swik D. et al., 2001)
Bleomycin, actinomycin D	Fibroblastes HH-8	Homme	+	+	+		(Rodemann H. et al., 1989)
5-Bromodeoxyuridine	Fibroblastes TIC-7	Homme	+	+	+		(Robles S. et al., 1998)
Hydroxyure	Fibroblastes TIC-7	Homme	+	+	+		(Mochizuki E. et al., 1999)
Photoactivation + poralén	Fibroblastes REF-52	Homme	+	+	+		(Subtil T. et al., 2001)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Yeo E. et al., 2000)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Frapcat C. et al., 2002)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Ma W. et al., 2002)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(von Gleich T. et al., 1995)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Sorensen G. et al., 1998)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Honda S. et al., 1983)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Xu D. et al., 2000)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Frapcat C. et al., 2001)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Chen J. et al., 2001)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Reichel J. et al., 2002)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Chen J. et al., 2002)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Swik D. et al., 2001)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Swik D. et al., 2001)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Frestat M. et al., 1998)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Colado M. et al., 2000)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Frestat M. et al., 1998)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Mochizuki E. et al., 1998)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Xu D. et al., 2002)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Volante D. et al., 2002)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Domatit A. et al., 2001)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Serano M. et al., 1997)
Hyperoxie	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Dini G. et al., 2000)

**Tableau 2: Modèles de SIPS dans des types cellulaires non transformés (d'après Dierck *et al.*, Modulating Aging and Longevity, Kluwer Academic Publishers, 2003).**

au niveau des télomères (Beckam & Ames., 1998) (Petersen *et al.*, 1998) et sont responsables de leur raccourcissement (von Zglinicki *et al.*, 2000). Ils ont montré que ces cassures télomériques, reconnues par la cellule comme un dommage à l'ADN, induisent un arrêt du cycle cellulaire suite à l'activation de p53 (Saretzki *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent l'implication des télomères dans l'apparition de la sénescence prématurée induite par un stress chronique (von Zglinicki *et al.*, 2002).

#### b. Les stress aigus et subcytotoxiques

Le traitement des cellules par certaines substances telles que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Chen & Ames., 1994), le *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP) (Dumont *et al.*, 2000), l'éthanol (Pascal *et al.*, 2005), ou encore les UV (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005) augmentent le niveau intracellulaire de ROS et permettent l'apparition d'une SIPS. Des proportions accrues de cellules positives pour l'activité SA  $\beta$ -gal ont été observées dans ces différents modèles de SIPS. Contrairement aux cellules sous hyperoxie chronique, les FHDs IMR-90 stressés deux fois par semaine sous  $75 \mu M$  d' $H_2O_2$  ne présentent pas de raccourcissement télomérique alors que les biomarqueurs classiques de la sénescence sont bien présents (Chen *et al.*, 2001). D'autre part, P. Dumont n'a observé qu'un raccourcissement de 300 pb, 12 jours après une série de cinq stress sous *t*-BHP et 18 jours après un stress sous  $H_2O_2$  (Dumont *et al.*, 2001). Une explication partielle de ces résultats doit considérer l'hétérogénéité de la population cellulaire. D'une part, il y a une tranche de la population dont le cycle cellulaire est irréversiblement bloqué suite à un stress subcytotoxique. Les télomères de ces cellules ne peuvent donc plus raccourcir. D'autre part, il y a une faible proportion de la population cellulaire qui reste mitotique après le stress subcytotoxique et qui doivent se diviser un grand nombre de fois afin d'atteindre la confluence durant les sous-cultures (Toussaint *et al.*, 2002).

Le raccourcissement des télomères semble donc être la conséquence plus que la cause de la sénescence prématurée. En 2002, plusieurs équipes en apportèrent la preuve. Ainsi, ils montrèrent que l'instauration de l'activité télomérase chez des fibroblastes conférait à ces cellules une résistance accrue face aux stress cytotoxiques induisant l'apoptose. Toutefois, cette enzyme n'empêchait pas l'apparition de la SIPS suite à une exposition aux UV ou à l' $H_2O_2$ . En effet, les fibroblastes surexprimant hTERT présentaient une activité SA  $\beta$ -gal ainsi qu'un arrêt prolifératif en fin de phase G1 caractérisant les cellules en SIPS. Ces observations nous indiquent donc que contrairement à la sénescence répliquative, la SIPS ne peut être empêchée par un maintien de la longueur des télomères *via* hTERT (Gorbunova *et al.*, 2002) (de Magalhaes *et al.*, 2002) (Matuoka & Chen., 2002).

## CHAPITRE III: SIGNALISATION CELLULAIRE ET MEDiateURS LIPIDIQUES

### IMPLIQUES DANS LA SENESCENCE REPLICATIVE ET LA SIPS

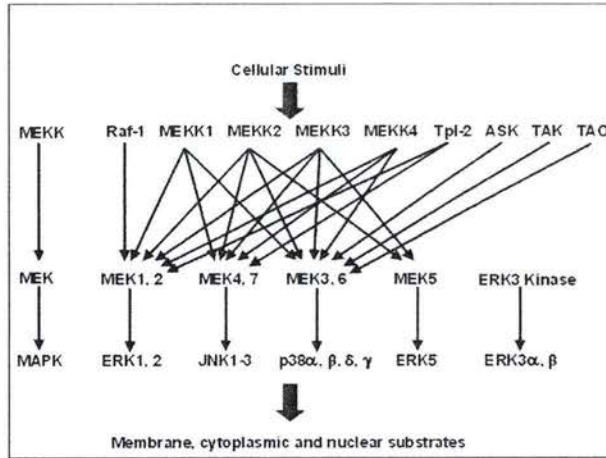
Les cascades de transduction du signal sont essentielles pour produire une réponse cellulaire adaptée à un stimulus. De nombreux signaux extracellulaires activent des récepteurs membranaires qui transmettent leur activation à des protéines de signalisation intracellulaires. Ces protéines de signalisation sont souvent des protéines kinases. On estime que le génome humain encode plus de 2000 protéines kinases, qui phosphorylent un ensemble d'environ 30000 protéines (Cuenda *et al.*, 1999). Les kinases actives ajoutent des groupements phosphates aux acides aminés sérine, thréonine et tyrosine des protéines en aval dans la cascade. La phosphorylation de ces résidus change les propriétés chimiques de la protéine, qui à son tour peut lier, activer, phosphoryler ou déphosphoryler son substrat. De nombreux médiateurs lipidiques participent également à la signalisation cellulaire. Ainsi, les prostanoïdes, issus de la cascade de l'acide arachidonique, sont responsables d'un large spectre de réponses biologiques.

Dans le cadre de cette introduction, nous nous attarderons sur la Mitogen Activated Protein kinases (MAPK) p38<sup>MAPK</sup> ainsi que sur la cyclooxygénase 2, une enzyme clé de la synthèse des prostanoïdes.

#### **3.1. Les MAP kinases**

##### 3.1.1. Généralités

La réponse cellulaire adaptée à un stimulus extracellulaire nécessite des voies de signalisation intracellulaires. Souvent ces voies de signalisation impliquent des MAP kinases, qui peuvent intervenir aussi bien au niveau de la prolifération et de la différenciation que sur le plan de l'apoptose et de la réponse aux stress. Trois groupes de MAP kinases ont été identifiés incluant les ERK (extracellular signal regulated kinase), les JNK/SAPK (Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase) et les p38 kinases (Figure 13). Ces MAPK sont activées par phosphorylation par une MAPK kinase (MEK ou MAPKK), qui a été préalablement activée par une MEK kinase (MEKK ou MAPKKK). Une fois activées, les MAP kinases sont transloquées dans le noyau où elles phosphorylent certains facteurs de transcription qui induisent alors la transcription de gènes cibles. De nombreuses connections existent entre les MAP kinases si bien qu'il est souvent difficile d'attribuer une réponse cellulaire à une des trois MAP kinases.



**Figure 13:** Les cascades des MAP kinases. Les signaux qui régulent la prolifération, la différenciation et l'apoptose passent par trois cascades de MAP kinases, nommées ERK, JNK et  $p38^{MAPK}$ . Les connexions entre les cascades sont multiples.

([http://www.komabiotech.co.kr/technical/review/map\\_kinase\\_pathway.htm](http://www.komabiotech.co.kr/technical/review/map_kinase_pathway.htm)).

### 3.1.2. $p38^{MAPK}$

#### a. Isoformes et mécanisme d'activation de $p38^{MAPK}$

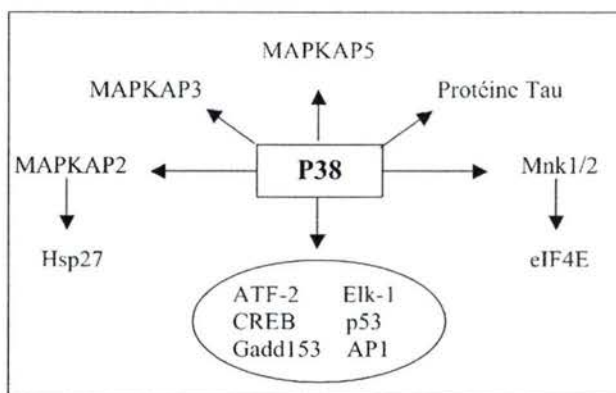
Les kinases  $p38^{MAPK}$  sont surtout activées en condition de stress cellulaire. En effet, les rayons UVB (Kabuyama *et al.*, 2001), le peroxyde d'hydrogène (Volonte *et al.*, 2001), l'hypoxie (Conrad *et al.*, 1999), des cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-1 et le TNF $\alpha$  (Mc Dermott *et al.*, 2002) sont capables d'induire l'activation de cette kinase dans différents types cellulaires (Ono & Han., 2000). Jusqu'à présent, quatre isoformes de  $p38^{MAPK}$  ont été identifiées:  $p38\alpha$ ,  $p38\beta$  (Jiang *et al.*, 1996),  $p38\gamma$  (Cuenda *et al.*, 1996) et  $p38\delta$  (Goedert *et al.*, 1997) (Wang *et al.*, 1997). Ces quatre isoformes présentent une homologie de séquences d'acides aminés d'au moins 60 % et sont toutes activées par une double phosphorylation au niveau de la thréonine 180 et de la tyrosine 182 localisées sur le motif Thr-Gly-Tyr (Raingeaud *et al.*, 1995). Cette phosphorylation est induite par des voies de signalisation activant les MAP kinases kinases, MKK3 (Derijard *et al.*, 1995) et MKK6 (Lin *et al.*, 1995) (Raingeaud *et al.*, 1996). Il a été montré que MKK3 phosphoryle et active uniquement les isoformes  $\alpha$  et  $\gamma$  alors que MKK6 active les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Enslin *et al.*, 1998).

A l'heure actuelle, on dispose de plusieurs molécules capables d'inhiber spécifiquement l'activité kinase de p38<sup>MAPK</sup> mais celles-ci agissent uniquement sur certaines isoformes de p38<sup>MAPK</sup>. La molécule SB203580 est l'inhibiteur le plus souvent utilisé et cité dans la littérature. Il se lie au site de fixation d'ATP des kinases p38<sup>MAPK</sup>  $\alpha$  et  $\beta$  et empêche de cette façon l'activité kinase de ces deux isoformes (Cuenda *et al.*, 1995). Cet inhibiteur appartient à la classe des pyridinyl imidazoles qui empêchent la production de cytokines pro-inflammatoires et dont on espère des applications thérapeutiques dans le domaine des supprimeurs de douleurs (Kyriakis & Avruch., 2001).

#### b. Cibles de p38<sup>MAPK</sup>

L'activation de p38<sup>MAPK</sup> résulte en l'activation par phosphorylation d'une série de substrats comprenant d'autres kinases ainsi que des facteurs de transcription (Figure 14). Plusieurs études ont montré que p38<sup>MAPK</sup> pouvait activer le facteur de transcription AP-1 en induisant l'expression de c-Jun et c-Fos *via* la phosphorylation respective des facteurs de transcription ATF-2 et Elk-1 (Hazzalin *et al.*, 1996). En effet, p38<sup>MAPK</sup> phosphoryle ATF-2 au niveau des résidus Threonine 69 et 71 ce qui permet à ATF-2 de se lier au promoteur de *c-Jun* et d'induire sa transcription. D'autre part, p38<sup>MAPK</sup> contribue à l'induction de *c-Fos* *via* Elk-1, qui une fois activé se lie sur le site de liaison SRE situé au niveau du promoteur de *c-Fos* (Price *et al.*, 1996). L'expression de *c-Fos* peut également être induite suite à la phosphorylation de CREB par la MAPKAP kinase 2, un autre substrat de p38<sup>MAPK</sup> (Tan *et al.*, 1996). MAPKAP kinase 2 active également la protéine de choc thermique, HSP27. Cette protéine chaperonne protège le réseau de microfilaments d'actine des stress cellulaires en augmentant leur polymérisation (Lavoie *et al.*, 1995). Une autre cible de phosphorylation de p38<sup>MAPK</sup> est le facteur de transcription Gadd153. Une fois activé suite à la phosphorylation de ses résidus sérine 78 et 81 (Wang & Ron., 1996), Gadd153 participe à l'arrêt du cycle cellulaire induit par des stress oxydatifs (Barone *et al.*, 1994) (Zhan *et al.*, 1994) (Maytin *et al.*, 2001). Enfin, il a été montré que la protéine anti-proliférative p53 est directement phosphorylée au niveau de résidus sérine par p38<sup>MAPK</sup> en réponse aux radiations d'UV (Bulavin *et al.*, 1999) (Huang *et al.*, 1999).

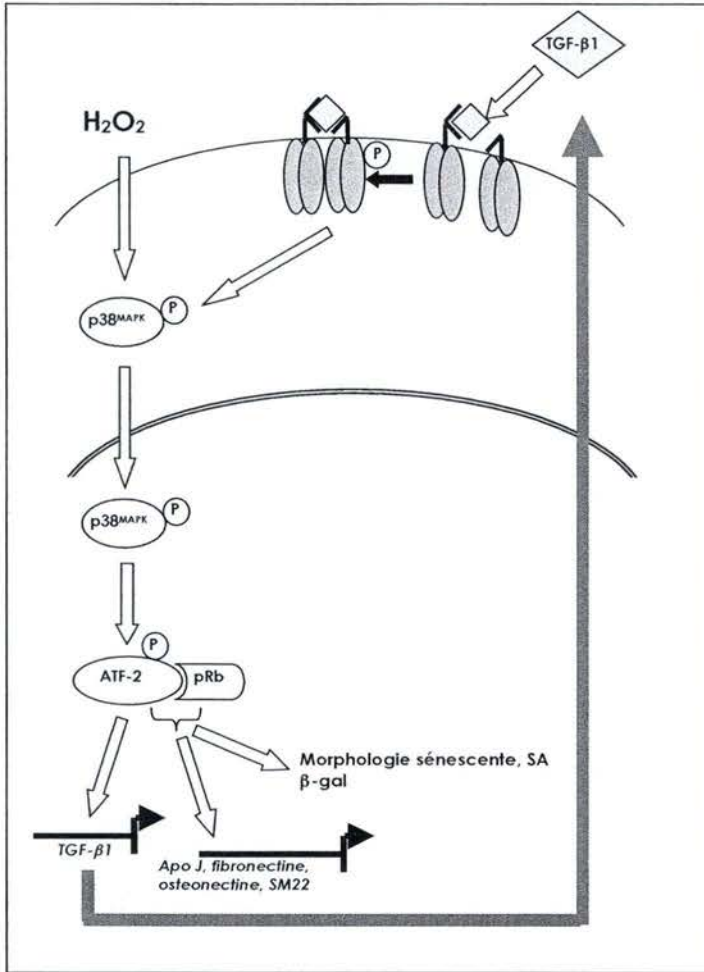
Outre ces facteurs de transcription, p38<sup>MAPK</sup> active aussi une variété de substrats cytoplasmiques tels que les protéines tau (Reynolds *et al.*, 1997), MAPKAP kinase 3, MAPKAP kinase 5 (Ni *et al.*, 1998), Mnk1/2 et le facteur d'élongation de la traduction eIF4E (Wang *et al.*, 1998).



**Figure 14: Cibles de  $p38^{MAPK}$**  (d'après Mielke & Herdegen., 1999). L'activation de  $p38^{MAPK}$  induit la phosphorylation d'une série de protéines.  $p38^{MAPK}$  peut agir directement en phosphorylant et activant divers facteurs de transcription comme ATF-2, CREB, Gadd153, Elk-1, p53 et AP-1 et peut agir indirectement en phosphorylant des kinases tel que MAPKAP-2, -3 et -5 et Mnk1/2.  $p38^{MAPK}$  active également la protéine Tau.

### c. $p38^{MAPK}$ et la SIPS

Notre laboratoire a montré le rôle de  $p38^{MAPK}$  dans l'apparition des différentes caractéristiques de la sénescence induite par un stress subcytotoxique unique sous  $H_2O_2$  sur des FHDs IMR-90 de poumon foetal (Fripiat *et al.*, 2002) (Figure 15). En effet, suite à un stress sous  $H_2O_2$ ,  $p38^{MAPK}$  est activé et phosphoryle le facteur de transcription ATF-2. Il en résulte un arrêt immédiat du cycle cellulaire ainsi que la surexpression au niveau messager et protéique du Transforming Growth Factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1). Le TGF- $\beta$ 1 contribue à l'apparition des biomarqueurs de la SIPS. En effet, la neutralisation du TGF- $\beta$ 1 ou de ses récepteurs de type II par des anticorps empêche l'apparition d'une morphologie cellulaire de type sénescence et de la SA  $\beta$ -gal et la surexpression de 4 gènes liés à la sénescence (*fibronectine*, *ostéonectine*, *SM22* et *apolipoprotéine J*) (Fripiat *et al.*, 2001). Une fois libéré dans le milieu extracellulaire, le TGF- $\beta$ 1 engendre une seconde vague d'activation de  $p38^{MAPK}$  qui est maintenue à long terme. Celle-ci va réactiver le facteur de transcription ATF-2 qui, de part son interaction avec la protéine pRb hypophosphorylée, induit l'apparition des différents biomarqueurs de la SIPS. Des résultats similaires ont été obtenus sur des FHDs AG04431 de peau soumis à une série de stress sous UVB (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005).



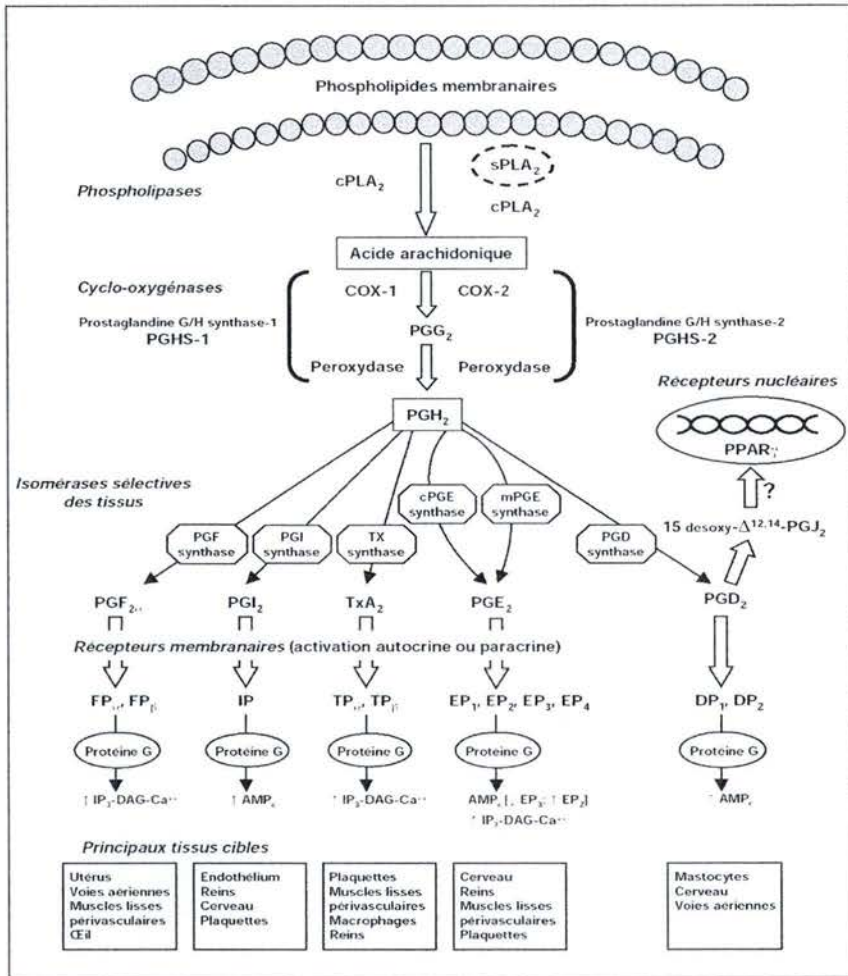
**Figure 15:** Transduction du signal impliquée dans l'apparition des caractéristiques de la sénescence prématurée induite par un stress subcytotoxique à l' $H_2O_2$  chez les fibroblastes IMR-90. L'activation de  $p38^{MAPK}$  suite à un stress sous  $H_2O_2$  induit la phosphorylation du facteur de transcription ATF-2, ce qui engendre un arrêt immédiat du cycle cellulaire et la surexpression du TGF- $\beta 1$ . Ce dernier va induire une seconde vague d'activation de  $p38^{MAPK}$  qui est indispensable à la mise en place des différents biomarqueurs de la SIPS.



## **3.2. La cyclooxygénase 2 (COX-2)**

### **3.2.1. Les cyclooxygénases**

Les cyclooxygénases (COX) ou prostaglandine endoperoxyde G/H synthases (PGHS) sont les enzymes clés de la synthèse des prostanoides à partir d'acides gras polyinsaturés comme l'acide arachidonique (AA) (Funk., 2001) (Figure 16). En effet, cette enzyme bifonctionnelle assure, dans des sites actifs distincts mais proches, une activité cyclooxygénasique responsable de l'oxydation de l'acide arachidonique en prostaglandine G2 (PGG<sub>2</sub>) et une activité peroxydasique responsable de la réduction de la PGG<sub>2</sub> en prostaglandine H2 (PGH<sub>2</sub>). La conversion de la PGH<sub>2</sub> en prostanoides comme les prostaglandines (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>), les thromboxanes (TXA<sub>2</sub>) et les prostacyclines (PGI<sub>2</sub>) dépend d'isomérases et de synthases qui sont exprimées sélectivement dans certains tissus ou certains types cellulaires. Ces métabolites sont impliqués dans la transmission des informations entre les cellules et sont notamment à l'origine des processus inflammatoires. Leurs effets sont médiés par la stimulation de récepteurs membranaires spécifiques de chaque prostanoides (Narumiya *et al.*, 1999). Il existe au moins 5 types de récepteurs à 7 hélices  $\alpha$  transmembranaires, qui sont couplés, *via* des protéines G, à d'adénylate cyclase ou à la phospholipase C (Tsuboi *et al.*, 2002).



**Figure 16 :** Voies de biosynthèse et actions des prostaglandines et du thromboxane (d'après Jouzeau et al., 2004). cPLA<sub>2</sub> : phospholipase A2 cytosolique ; sPLA<sub>2</sub> : phospholipase A2 sécrétée ; COX : cyclooxygénase ; PGHS : prostaglandine H synthase ; PG : prostaglandine ; TX : thromboxane ; cPGE : prostaglandine E synthase cytosolique ; mPGE : prostaglandine E synthase membranaire ; FP : récepteur de la prostaglandine F ; IP : récepteur de la prostacycline ; TP : récepteur du thromboxane ; EP : récepteur de la prostaglandine E ; DP : récepteur de la prostaglandine D ; PPAR : récepteur activé par les proliférateurs de peroxyssomes ; IP<sub>3</sub> : inositol triphosphate ; DAG : diacylglycérol ; AMP<sub>c</sub> : adénosine monophosphate cyclique.

### a. Les différentes isoformes de COX

Les COXs existent sous deux isoformes, de structures et de fonctions proches mais elles sont codées par des gènes différents (Hla *et al.*, 1999) (Smith *et al.*, 2000). En effet, les gènes des deux COXs ne sont pas présents sur le même chromosome et ne contiennent pas le même nombre d'exons et d'introns (Tableau 3). De plus, le promoteur de COX-2 possède plusieurs éléments de réponse à des facteurs de transcription dont les éléments de réponse à NF- $\kappa$ B, AP-2 et CEBP/NF-IL-6 (Appleby *et al.*, 1994), contrairement au promoteur de COX-1 qui ne contient que deux éléments cis-régulateurs Sp1.

	COX-1	COX-2
<b>Type d'expression</b>	Constitutive	Inductible
<b>Localisation</b>	Chromosome 9	Chromosome 1
<b>Taille du gène</b>	22 kb	8,3 kb
<b>Nombre d'exons/introns</b>	11/10	10/9
<b>Taille de l'ARNm</b>	2,8 kb	4,6 kb

**Tableau 3:** Caractéristiques des gènes codant pour les deux isoformes de la cyclooxygénase

COX-1 est décrite comme une enzyme exprimée de façon constitutive et est ubiquitaire. Son gène est localisé sur le chromosome 9 et code pour une protéine de 67 kDa composée de 576 acides aminés. Cette glycoprotéine fixée à la membrane du réticulum endoplasmique et de l'enveloppe nucléaire est responsable de la production physiologique de prostanoides intervenant dans les processus d'aggrégation plaquettaire, de reproduction, et dans l'homéostasie du tractus gastrointestinal et du rein (Spencer *et al.*, 1998) (Vane *et al.*, 1998) (Harizi *et al.*, 2001). COX-1 est fortement exprimée dans les plaquettes, les macrophages, les cellules endothéliales et les glandes séminales.

COX-2, quant à elle, a été découverte en 1990 et a été rapidement associée aux phénomènes inflammatoires. Elle a été mise en évidence après que certaines études aient prouvé que la quantité de protéines COX augmentait dans les états inflammatoires, suggérant la présence d'une forme inductible de la cyclooxygénase (Raz *et al.*, 1988). COX-2 est codée par un gène inductible, dont la taille réduite est caractéristique des gènes à réponse immédiate et facilite la transcription et la maturation rapide après induction de l'expression. Ce gène est localisé sur le chromosome 1 et code pour une protéine de 72 kDa. COX-2 est exprimée dans un nombre limité de cellules comme les monocytes, les macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes.

Une nouvelle isoforme de COX a récemment été décrite. En 2000, Willoughby et son équipe ont mis en évidence une «COX» qui produisait peu de PGE<sub>2</sub> lors de la réaction inflammatoire induite chez le rat après injection d'une molécule pro-inflammatoire (Willoughby *et al.*, 2000). Cette réponse inflammatoire n'étant pas inhibée par les inhibiteurs connus, ils ont conclu qu'il s'agissait d'une troisième isoforme de COX (Gilroy *et al.*, 1999). L'expression de cette troisième isoforme a été mise en évidence par l'équipe de Simmons (Chandrasekharan *et al.*, 2002). Ces auteurs ont décrit plusieurs variants de COX issus d'épissage alternatif de l'ARNm de COX-1. COX-3 possède des caractéristiques de structure et d'activité voisines de celles de COX-1 et COX-2 et est également localisée dans le réticulum endoplasmique où elle est glycosylée afin d'être active.

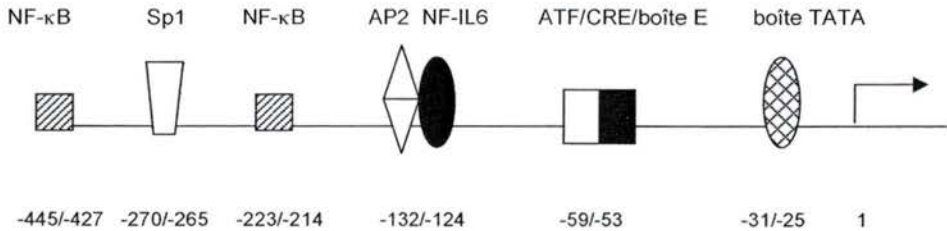
#### b. Structure des protéines COXs

Les COXs sont des enzymes membranaires monotopiques, c'est à dire insérées dans un seul des 2 feuillettes de la bicouche phospholipidique. Elles sont présentes sous la forme d'homodimères glycosylés. Elles sont habituellement localisées au niveau des faces luminales du réticulum endoplasmique et au niveau des membranes interne ou externe de l'enveloppe nucléaire (Morita *et al.*, 1995) (Spencer *et al.*, 1998). Sous certaines conditions, on peut également les trouver au niveau des cavéoles de la membrane plasmique (Liou *et al.*, 2001). Les protéines COX-1 et COX-2 glycosylées matures ont un poids moléculaire respectif de 67 kDa et 72 kDa (Garavito *et al.*, 1996). Elles sont constituées de trois domaines : un domaine amino-terminal contenant un site de liaison à l'EGF («epidermal growth factor»), un domaine de liaison à la membrane composé de quatre hélices  $\alpha$  dans lequel viendra se loger l'acide arachidonique, et un site catalytique globulaire comprenant un site cyclooxygénase et un site peroxydase (Battu *et al.*, 1997). Les COXs présentent une homologie de séquence de 60 % qui traduit une légère variation structurale conduisant à d'importantes modifications d'activités enzymatiques. Parmi les principales différences entre ces iso-enzymes, on soulignera que COX-2 a une sélectivité de substrat plus large que celle de COX-1, ce qui est cohérent avec la plus grande largeur de son site actif (Lu *et al.*, 1999). Ces différences structurales au sein des sites catalytiques des deux enzymes ont permis de développer des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 dotés de propriétés anti-inflammatoires et analgésiques (Brooks & Day., 2000). Cette sélectivité confère à ces molécules un avantage thérapeutique par rapport aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) tels que l'aspirine, l'indométhacine, l'ibuprofène, etc. En effet, contrairement aux AINS, les inhibiteurs spécifiques de COX-2 inhibent sélectivement le processus inflammatoire et évitent les lésions de la paroi stomacale et la toxicité rénale provoquées par l'inhibition de la COX-1 (Cryer & Kimmey., 1998) (McGettigan & Henry., 2000).

### 3.2.2. COX-2

COX-2 est un gène de réponse précoce, pouvant faire l'objet d'une régulation transcriptionnelle (nombreux éléments de réponse à des facteurs de transcription) et post-transcriptionnelle (nombreuses séquences d'instabilité dans la région 5' non traduite de son ARNm), ce qui lui confère une grande inductibilité pour réaliser la synthèse stimulée de prostaglandines en situation de stress cellulaire.

L'expression de COX-2 est induite par un grand nombre de facteurs comme les facteurs de croissance (EGF : «epidermal growth factor», TGF $\beta$  : «transforming growth factor beta») (Dubois *et al.*, 1994), les cytokines pro-inflammatoires (Ristimaki *et al.*, 1994) (Feng *et al.*, 1995) (Liu *et al.*, 2003), les oncogènes (Sheng *et al.*, 1998), ainsi que des stress oxydatifs (Ashida *et al.*, 2003) (Rockwell *et al.*, 2004). Les différents stimuli qui induisent l'expression de COX-2 agissent par des récepteurs membranaires pouvant être des récepteurs tyrosine kinases. Une fois activés, ces récepteurs induisent différentes voies de transduction du signal conduisant à la phosphorylation de facteurs de transcription. Ces facteurs peuvent alors se fixer sur certaines séquences du promoteur du gène COX-2 et activer sa transcription. Les différents éléments de régulation transcriptionnels du promoteur de COX-2 sont : deux sites de liaison au NF- $\kappa$ B, un motif NF-IL6, deux séquences superposées boîte E et ATF/CRE, deux sites AP1 et trois sites Sp1 (Kosaka *et al.*, 1994) (Figure 17).



**Figure 17 :** *Éléments principaux de régulation dans le promoteur du gène humain COX-2.*

Les composés synthétisés par COX-2 sont impliqués dans des phénomènes pathologiques tels que l'inflammation chronique aiguë, les maladies cardiovasculaires, la maladie d'Alzheimer (Gasparini *et al.*, 2004) et la maladie de Parkinson (Hunot *et al.*, 2004). Les prostaglandines jouent un rôle important dans la carcinogenèse puisqu'elles affectent la mitose, la prolifération cellulaire, l'adhésion cellulaire ou encore l'apoptose (Taketo *et al.*, 1998).

### 3.2.3. COX-2 et la SIPS

Au delà de son implication dans le processus inflammatoire, COX-2 intervient également au niveau de la régulation du cycle cellulaire ainsi qu'au niveau du processus apoptotique. En effet, de récents travaux ont montré que la surexpression de COX-2 induisait un arrêt de prolifération chez des cellules mésangiales (Zahner *et al.*, 2002). De plus, un ralentissement dans la progression du cycle cellulaire dû à une répression de la cycline D1, a également été mis en évidence chez les cellules épithéliales surexprimant COX-2 (DuBois *et al.*, 1996) (Trifan *et al.*, 1999).

D'autre part, l'inhibition de COX-2 chez des cellules cancéreuses du colon HCA-7 entraîne une augmentation de mort cellulaire (Sheng *et al.*, 1997) alors que des cellules épithéliales surexprimant COX-2 deviennent résistantes à l'apoptose en augmentant leur niveau de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique (Tsujii *et al.*, 1995). Il semblerait donc que l'induction de COX-2, outre ses effets dans le processus inflammatoire, a des effets anti-prolifératifs et anti-apoptotiques que l'on retrouve chez les cellules en SIPS et en sénescence répllicative. De récents travaux réalisés par Han *et al.*, montrent que l'inhibition de COX-2 par l'inhibiteur chimique spécifique NS-398, retarde l'entrée des fibroblastes en sénescence (Han *et al.*, 2004). De plus, il a été établi que des fibroblastes de derme surexprimant le facteur de transcription c-Rel, entraînent dans un état de sénescence prématurée suite à la surexpression subséquente de COX-2 (Bernard *et al.*, 2001). Les ROS semblent aussi être impliqués dans l'induction de COX-2. Ainsi, l'inactivation de ROS par des antioxydants empêche l'expression de COX-2 chez les fibroblastes et les kératinocytes (Cui *et al.*, 2004) alors que la synthèse accrue de PGE<sub>2</sub>, observée chez les macrophages issus de souris âgées, est atténuée en présence de vitamine E (Wu *et al.*, 1998). De plus, Chen et son équipe ont montré que des kératinocytes soumis à un stress sous UVB surexpriment COX-2 via un mécanisme dépendant d'ERK et de p38<sup>MAPK</sup> (Chen *et al.*, 2001). On peut donc imaginer qu'une activation de la voie de p38<sup>MAPK</sup> peut conduire à une surexpression de COX-2 chez des fibroblastes stressés.

# **But du Travail**

## BUT DU TRAVAIL ET CONTEXTE

Diverses équipes ont montré que des cellules humaines normales à faible passage en culture, soumises à différents types de stress subcytotoxiques (ultraviolets (UV), peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP), éthanol, etc) présentent un phénotype similaire à celui des cellules sénescences. Ce phénomène a été nommé sénescence induite prématurément par les stress (SIPS). Les principaux biomarqueurs de la sénescence répliquative qui apparaissent suite au stress oxydatif subcytotoxique sont la morphologie sénescence, un arrêt prolifératif irréversible en phase G1/S, une diminution de la synthèse d'ADN, une augmentation du nombre de cellules présentant l'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA  $\beta$ -gal) (Toussaint *et al.*, 2000). Durant notre mémoire, nous avons montré que le « Transforming Growth-Factor  $\beta$ 1 » (TGF- $\beta$ 1), surexprimé après un stress subcytotoxique sous 150  $\mu$ M d' $H_2O_2$  par les fibroblastes diploïdes humains (FHDs) IMR-90, était responsable de l'apparition de la morphologie sénescence, de l'activité SA  $\beta$ -gal et de la surexpression de l'ostéonectine, la fibronectine, l'apolipoprotéine J et de SM22 (Fripiat *et al.*, 2001). Notre laboratoire a aussi montré que les fibroblastes de souche BJ qui expriment la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT), enzyme qui rallonge les télomères dont l'érosion peut-être accélérée par les stress oxydatifs, entrent malgré cela en SIPS lorsqu'ils sont exposés à l' $H_2O_2$  (de Magalhaes *et al.*, 2002). Notre travail s'inscrit dans ces travaux et vise à comprendre les mécanismes par lesquels des fibroblastes de souche IMR-90 exprimant la télomérase, entrent en SIPS après un stress sous  $H_2O_2$ .

Nos premiers travaux ont permis la mise au point et la caractérisation d'un modèle de SIPS chez les fibroblastes IMR-90 immortalisés par la sous-unité catalytique de la télomérase. En effet, nous avons mis en évidence une diminution du potentiel prolifératif ainsi qu'une augmentation du pourcentage de cellules positives pour la SA  $\beta$ -gal en condition de stress. Nous avons également montré une absence de surexpression du TGF- $\beta$ 1 lors de l'établissement de la SIPS chez les cellules IMR-90 hTERT. Afin de déterminer les mécanismes moléculaires responsables de la SIPS chez les FHDs IMR-90 hTERT, nous avons, dans un premier temps, mis au point et validé un damier à ADN de faible densité, « le Dualchip Human Aging », représentant 240 gènes dont les produits sont impliqués dans le cycle cellulaire, la réponse aux stress, l'apoptose, etc. Ces gènes présentaient un attrait évident dans le cadre de nos travaux sur la SIPS. Cet outil étant développé, nous avons pu étudier les changements du niveau d'expression de ces 240 gènes dans notre modèle.



Une fois ces étapes effectuées, nous nous sommes intéressés aux mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'apparition de la sénescence induite prématurément par un stress subcytotoxique sous  $H_2O_2$  chez des fibroblastes IMR-90 exprimant la télomérase. Nous avons privilégié deux axes de recherche. Dans un premier temps, nous avons entamé l'étude du rôle de  $p38^{MAPK}$ , protéine de réponse aux stress de la famille des MAP kinases, par l'utilisation d'inhibiteur chimique (SB203580) et d'ARN interférants ainsi que par l'utilisation du damier à ADN afin d'identifier les gènes dont la transcription est contrôlée par  $p38^{MAPK}$  lors de la SIPS induite sous  $H_2O_2$ .

Le second volet de ce travail a porté sur la recherche des mécanismes ainsi qu'en l'étude du rôle de la cyclooxygénase 2 (COX-2) dans l'apparition de ce phénotype. Au moment où nous avons commencé ce travail, il était établi que des fibroblastes de derme surexprimant le facteur de transcription c-Rel, entraient dans un état de sénescence prématurée suite à la surexpression subséquente de COX-2 (Bernard *et al.*, 2001). D'autre part, de récents travaux réalisés par Han et son équipe montrent que l'inhibition de COX-2 par l'inhibiteur chimique spécifique NS-398, diffère l'entrée des fibroblastes en sénescence (Han *et al.*, 2004). Suite à ces observations, nous nous sommes demandés si COX-2 pouvait être surexprimé et activé après un stress subcytotoxique sous  $H_2O_2$  et si il était impliqué dans l'apparition de la SIPS. Nous avons également recherché les voies de signalisation induites par un stress sous  $H_2O_2$  et menant à la surexpression de COX-2.

# Résultats

**Manuscrit 1 : Identification of p38<sup>MAPK</sup>-dependent Genes Involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Premature Senescence of IMR-90 hTERT Human Fibroblasts (soumis dans le journal "FEBS Letters")**

*In vitro*, les cellules somatiques humaines prolifératives, dont les fibroblastes, ont une capacité proliférative limitée. Ceci se marque par un arrêt progressif des divisions cellulaires conduisant à un blocage irréversible du cycle cellulaire dû à un raccourcissement critique des télomères. Ce phénomène est appelé sénescence répliquative. Outre cet arrêt de prolifération, les fibroblastes sénescents présentent une morphologie typique, une activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA  $\beta$ -gal) et surexpriment divers gènes (*apolipoprotéine J*, *fibronectine*, *ostéonectine*, etc).

Diverses recherches suggèrent que des cellules humaines normales à faible passage en culture, soumises à différents types de stress subcytotoxiques tel que les ultraviolets (UV), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), le *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP), l'éthanol, présentent un phénotype similaire à celui des cellules sénescents. Ce phénomène a été nommé sénescence induite prématurément par les stress ou SIPS.

Lorsque nous avons commencé ce travail, nous venions de montrer au laboratoire que l'activité télomérase (enzyme rallongeant constamment les télomères) n'empêchait pas l'entrée en sénescence prématurée de fibroblastes humains à la suite d'un stress oxydatif subléthal pour les cellules, alors que cette activité était connue comme immortalisant les mêmes cellules en conditions non stressantes. Il devait donc exister un mécanisme indépendant de la longueur des télomères expliquant l'entrée en sénescence prématurée (de Magalhaes *et al.*, 2002). Notre travail s'inscrit dans ces travaux et vise à comprendre les mécanismes par lesquels des fibroblastes de souche IMR-90 exprimant la télomérase, entrent en SIPS après un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Les fibroblastes IMR-90 hTERT que nous avons utilisés lors de ce travail, ont été transfectés avec un plasmide présentant un promoteur faible pour la sous-unité catalytique de la télomérase. Ce détail prend toute son importance étant donné qu'en cas de transfection sous l'influence d'un promoteur fort, un pourcentage de la population cellulaire entre en sénescence (Gorbunova *et al.*, 2003).

Caractérisation du modèle cellulaire

La première partie de ce travail a consisté en la mise au point et la caractérisation d'un modèle de sénescence induite prématurément par un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez les fibroblastes IMR-90 immortalisés par la sous-unité catalytique de la télomérase, hTERT. L'activité SA  $\beta$ -

gal et la diminution du potentiel prolifératif ont été déterminés ainsi que le niveau d'ARNm et protéique de p21<sup>WAF-1</sup> et de p53. Nous avons également caractérisé de façon plus complète l'état des FHDs IMR-90 hTERT en SIPS en étudiant leur profil d'expression génique. En collaboration avec la société "Eppendorf Array Technologies" nous avons développé un damier à ADN de faible densité "le Dualchip Human Aging", représentant 240 gènes dont les produits sont impliqués dans le cycle cellulaire, la réponse aux stress, l'apoptose, etc. Lors de notre thèse, nous avons non seulement participé à la construction de ce damier (clonage de trappeurs, etc), mais également à sa validation technique (absence de réaction d'hybridation croisée, validation des chambres d'hybridation, etc) et sa validation biologique (comparaison par rapport à d'autres méthodes, reproductibilité, sensibilité, etc). La partie de validation biologique nous a contraint à préparer des quantités importantes d'échantillons biologiques et à réaliser de nombreuses RT-PCR en temps réel. Dans cet article, nous relatons les changements d'expression génique de fibroblastes IMR-90 hTERT en sénescence induite prématurément par exposition à un stress subcytotoxique sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### Etude du rôle de p38<sup>MAPK</sup> dans les changements d'expression génique induits par un stress subcytotoxique à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Au sein de notre équipe, C. Fripiat avait montré l'importance du rôle de p38<sup>MAPK</sup> dans l'apparition de plusieurs biomarqueurs de la sénescence induite par un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez les FHDs IMR-90. En effet, il a montré que p38<sup>MAPK</sup> était activé à court et à long terme après le stress (à 2, 4, 8, 24, 48 et 72 h) et que son inhibition par l'inhibiteur chimique SB203580 empêche l'apparition d'une morphologie sénescence, de la SA  $\beta$ -gal et la surexpression de la fibronectine, de l'ostéonectine, de l'apolipoprotéine J et de SM22 (Fripiat *et al.*, 2002).

Dans le présent article, nous avons déterminé, par Western-blot, le niveau de phosphorylation de p38<sup>MAPK</sup> à différents temps après un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Etant donné que p38<sup>MAPK</sup> était activé dans ces conditions, nous avons étudié le rôle joué par p38<sup>MAPK</sup> dans l'apparition des biomarqueurs de la SIPS suite à l'inhibition de p38<sup>MAPK</sup> par le SB203580 chez les fibroblastes IMR-90 hTERT stressés sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Enfin, nous avons déterminé si certains des changements de niveau d'expression de gènes observés lors de la sénescence induite sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, étaient ou non dépendants de p38<sup>MAPK</sup>. Pour cela, nous avons établi et comparé différents profils d'expression génique après un stress subcytotoxique sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence ou non de l'inhibiteur de p38<sup>MAPK</sup>.

## Identification of p38<sup>MAPK</sup>-dependent Genes Involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Premature Senescence of IMR-90 hTERT Human Fibroblasts

Stéphanie Zdanov<sup>a</sup>, Florence Debacq-Chainiaux<sup>a</sup>, Jérôme Marijsse<sup>a</sup>, Christelle Plennevaux<sup>b</sup>, Sophie Boffe<sup>b</sup>, José Remacle<sup>ab</sup>, and Olivier Toussaint<sup>ac</sup>

<sup>a</sup> *Research Unit on Cellular Biology (URBC), University of Namur (FUNDP), Rue de Bruxelles, 61 B-5000 Namur, Belgium*

<sup>b</sup> *Eppendorf Array Technologies, Rue du Seminaire, 22 B-5000 Namur, Belgium*

<sup>c</sup> *Corresponding author: O. Toussaint, Research Unit on Cellular Biology (URBC), University of Namur (FUNDP), Rue de Bruxelles, 61 B-5000 Namur, Belgium.*

Telephone: +32-81-724132 ; Fax: +32-81-724135 ;

E-mail address : [olivier.toussaint@fundp.ac.be](mailto:olivier.toussaint@fundp.ac.be)

**Running title** : p38<sup>MAPK</sup> and Stress-induced Premature Senescence

## ABSTRACT

Premature senescence of IMR-90 human diploid fibroblasts (HDFs) expressing telomerase (hTERT) establishes after exposure to an acute sublethal concentration of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) with appearance of several biomarkers of cellular senescence like enlarged cell shape, Senescence Associated  $\beta$ -galactosidase activity (SA  $\beta$ -gal) and a permanent cell cycle arrest. The induction of stress-induced premature senescence (SIPS) was associated with a transient increase in DNA-binding activity of p53 and an increased expression of p21<sup>WAF-1</sup>. We showed that p38<sup>MAPK</sup> was phosphorylated after exposure of IMR-90 hTERT HDFs to  $H_2O_2$ . Selective inhibition of p38<sup>MAPK</sup> activity with SB203580 significantly attenuated the increase in SA  $\beta$ -gal activity, but did not affect  $H_2O_2$ -induced growth arrest and the increased expression of p21<sup>WAF-1</sup>. In order to better characterize the molecular events that trigger SIPS induced by  $H_2O_2$  in IMR-90 fibroblasts expressing telomerase, we generated a low density DNA microarray to study gene expression profiles of 240 senescence- and stress-related genes. The reliability of this DNA array in senescence-related studies was previously shown. Using this DNA array, SB203580 and p38<sup>MAPK</sup> siRNA, we identified several p38<sup>MAPK</sup>-target genes that are differentially expressed in  $H_2O_2$ -stressed IMR-90 hTERT cells, giving clues on how p38<sup>MAPK</sup> participates in  $H_2O_2$ -induced premature senescence.

**Keywords :** senescence, oxidative stress, hydrogen peroxide, fibroblasts, telomerase, p38<sup>MAPK</sup>, gene expression

### List of Abbreviations

ECM, extracellular matrix; FCS, fetal calf serum;  $H_2O_2$ , hydrogen peroxide; HDFs, human diploid fibroblasts; MAPK, mitogen activated protein kinase; NF- $\kappa$ B, nuclear factor-kappa B; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E2; ROS, reactive oxygen species; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SA  $\beta$ -gal, Senescence associated  $\beta$ -galactosidase; SIPS, Stress induced premature senescence; s.d., standard deviation; siRNA, small interferent RNA; *t*-BHP, *tert*-butylhydroperoxide; TGF- $\beta$ 1, Transforming growth factor beta 1

## INTRODUCTION

Normal human somatic cells in culture undergo a limited number of divisions before entering an irreversible growth-arrest state defined as replicative senescence [1]. Several lines of evidence suggest that a similar process occurs *in vivo* and contributes to human aging [2]. Telomere shortening represents a mechanism for counting cell division [3]. When telomeres reach a critical short length, a p53 DNA damage response pathway becomes activated and triggers growth arrest through the overexpression of cyclin-dependent kinase inhibitors such as p21<sup>WAF-1</sup> [4-6]. Replicative senescence in human diploid fibroblasts (HDFs) can be overcome by overexpression of human catalytic subunit of telomerase (hTERT). Telomerase is a reverse-transcriptase enzyme that elongates the telomeres and can immortalize the cells [7].

HDFs exposed to various types of oxidative stress at sublethal level display a senescent-like phenotype coined « stress-induced premature senescence » (SIPS) [8]. For instance, SIPS can be triggered by a single or repeated exposure to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [9, 10], *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP) [11], ethanol [12] or UVB [13]. HDFs in SIPS display the major features of senescent cells : typical cell morphology [14], increase in the proportion of senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA  $\beta$ -gal) positive cells [15], growth arrest in the G1 phase of the cell cycle [9], deletion in mitochondrial DNA [11] and change in the expression level of several senescence-associated genes. It was suggested that premature senescence induced by acute short exposures to oxidizing agents at subcytotoxic level is telomere independent. Indeed very limited telomere shortening was observed in such conditions [16], part of which is due to oxidative stress [17]. In addition it has been observed that expression of human telomerase does not render the cells more resistant to SIPS [18, 19].

p38<sup>MAPK</sup> is a mitogen-activated protein kinase activated by phosphorylation on Ser/Thr residue when cells are exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. p38<sup>MAPK</sup> is involved in the establishment of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescence-like phenotype in IMR-90 HDFs, by triggering the overexpression of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) *via* activation of ATF-2 transcription factor [20].

In this work, we studied whether p38<sup>MAPK</sup> regulates the change of expression level of a large series of senescence-associated genes. For this purpose, we generated a low density DNA array allowing to study the relative mRNA level of 240 genes known to undergo changes of expression level in replicative senescence, SIPS and oxidative stress. This technology was previously validated in senescence-related studies on UVB-, *t*-BHP-, ethanol- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence [12, 13, 21]. Nevertheless, a significant number of results obtained in this study were validated with Real-Time RT-PCR. Using a specific inhibitor of p38<sup>MAPK</sup> and small interferent RNA technology, we studied whether inhibition of p38<sup>MAPK</sup>

affects these changes of gene expression. This work gives further insight into the role of p38<sup>MAPK</sup> in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Cell culture, SA $\beta$ -gal activity and [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation*

Human fetal lung IMR-90 fibroblasts immortalized with the catalytic subunit of telomerase, (hTERT) were a kind gift from Dr. J. G. Valles, Ludwig Institute for Cancer Research, UK. IMR-90 hTERT HDFs were grown in MEM (Invitrogen, UK) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Invitrogen, UK). p38<sup>MAPK</sup> was inhibited using a specific inhibitor, SB203580 (Alexis Biochemicals, Belgium) diluted at 20  $\mu$ M in MEM + 10% FCS. IMR-90 hTERT HDFs at half confluence were exposed for 2 h to 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Germany) diluted in MEM + 10% FCS. After the stress, cells were rinsed with MEM and given fresh MEM + 10% FCS. Control cultures followed the same schedule of medium changes without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. At 48 h after the stress, the cellular protein content was assayed by the Folin method [22]. This method was previously shown to give accurate estimates of the number of surviving cells in such conditions [11, 13]. The results (mean of triplicates  $\pm$  s.d.) are expressed as percentage of surviving cells.

At 48 h after the stress, the cells were seeded in 35 mm culture dishes (Falcon, UK) at a density of 700 cells/cm<sup>2</sup>. Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activity (SA  $\beta$ -gal) was determined 24 h later as described by Dimri *et al.* The population of SA  $\beta$ -gal positive cells was determined by counting 400 cells per dish. The results were given as percentage of the total number of cells counted in each dish and were expressed as mean of triplicates  $\pm$  standard deviation (s.d.).

At 24 h after the stress, the cells were seeded in 24-well plates (Cell Cult, UK) at a density of 10,000 cells/well. 1  $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H]-thymidine (specific activity: 2 Ci/mmol, Du Pont, NEN, USA) was added to the culture medium for 48 h. The incorporated radioactivity was quantified by a scintillation counter (Packard Instrument Company, USA). Results were expressed as mean values  $\pm$  s.d..

### *Low density DNA-array*

#### Design of the array

We developed the "DualChip Human Aging", a low-density DNA array representing a range of 240 genes involved in senescence or stress response in collaboration with Eppendorf (Germany). The method is based on a system with two assays (a control and a test) per



glass slide with three sub-array per assay. The sequences of the DNA covalently linked to the glass slide were carefully chosen by sequence comparison. It was checked that no cross-hybridization takes place. Several positive and negative hybridization and detection controls were spotted on each sub-arrays in order to control the reliability of the experimental data, as previously published [12, 13, 21]. Six internal standard controls and housekeeping genes are arrayed on the slides for the normalisation. Twenty micrograms of total RNA were retrotranscribed using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, UK). Duplicates from three independent experiments were performed, meaning hybridizations on six sub-arrays. Hybridization on DualChip Human Aging was carried out as described by the manufacturer. Detection was performed using a Cy3-conjugated IgG anti-biotin (Jackson Immuno Research Laboratories, USA) on biotinylated cDNA.

#### Imaging, data normalization and statistical analysis

Fluorescence of the hybridized arrays was scanned using the Packard ScanArray (PerkinElmer, USA) at 10  $\mu\text{m}$  resolution. To maximize the dynamic range of detection, the same arrays were scanned at three photomultiplier gains for quantifying high- and low-copy expressed genes. The scanned 16-bit images were imported into the ImaGene 4.1 software (BioDiscovery, USA). The fluorescence intensity of each DNA spot (average of intensity of each pixel present within spot) was calculated using local mean background subtraction. A signal was accepted when the average intensity after background subtraction was at least 2.5-fold higher than its local background. The three intensity values of the triplicate DNA spots were averaged and used to calculate the intensity ratio between the reference and the test samples. The data were normalized in two steps. First, the values were corrected using a factor calculated from the intensity ratios of the internal standards in the reference and test samples. The presence of the six internal standards probes at two different locations of the array allowed a measurement of local background and evaluation of the array homogeneity, which is considered in the normalization. However, since the internal standard control does not take into account the purity and quality of the mRNA, a second step of normalization was performed based on calculating the average intensity for a set of thirteen housekeeping genes. The variance of the normalized set of housekeeping genes was used to generate an estimate of expected variance, leading to a predicted confidence interval for testing the significance of the ratios obtained. Ratios outside the 95% confidence interval were determined to be significantly different [12, 13, 21].

#### ***Real Time RT-PCR***

Total RNA was extracted from three independent cultures using Total RNAgent extraction kit (Promega, USA). Total RNA (2  $\mu\text{g}$ ) was reversed transcribed using SuperScript II Reverse

Transcriptase (Invitrogen, UK). Gene specific primers (Table 1) were designed (Primer Express 1.5 Software, PE Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Amplification reactions assays contained 1x SYBR Green PCR Mastermix and primers at optimal concentration (Applied Biosystems, The Netherlands). A hot start at 95°C for 5 minutes was followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 65°C for 1 minute using the ABI PRISM 7000 SDS thermal cycler (Applied Biosystems, The Netherlands). Fluorescence emission was detected for each PCR cycle and the threshold cycle (Ct) values were determined. Values were reported as average of triplicate analysis  $\pm$  s.d..

Genes	Positions (bp)	Sequences
<i>CTGF</i>	242-258	5'-CAA GCT GCC CGG GAA AT-3'
	365-384	5'-GGA CCA GGC AGT TGG CTC TA-3'
<i>Fibronectin</i>	5023-5041	5'-TGT GGT TGC CTT GCA CGA T-3'
	5111-5131	5'-GCT TGT GGG TGT GAC CTG AGT-3'
<i>GADD153</i>	346-365	5'-TCT CTG GCT TGG CTG ACT GA-3'
	461-481	5'-TCC TGG TTC TCC CTT GGT CTT-3'
<i>GAPDH</i>	942-963	5'-ACC CAC TCC TCC ACC TTT GAC-3'
	1033-1053	5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA-3'
<i>HSP27</i>	314-334	5'-TCC CTG GAT GTC AAC CAC TTC-3'
	380-397	5'-CTC GTG CTT GCC GGT GAT-3'
<i>IGFBP3</i>	655-678	5'-CAG AGC ACA GAT ACC CAG AAC TTC-3'
	742-765	5'-CAC ATT GAG GAA CTT CAG GTG ATT-3'
<i>IGFBP5</i>	698-719	5'-TGT GAC CGC AAA GGA TTC TAC A-3'
	803-822	5'-TCC CCG TCA ACG TAC TCC AT-3'
<i>MMP2</i>	2105-2123	5'-CAT GCG CAC AAA TCC CTT CTA-3'
	2196-2220	5'-GAA CAG CCC AGT ACT TAT TCC CTT T-3'
<i>Osteonectin</i>	868-889	5'-GAG ACC TGT GAC CTG GAC AAT G-3'
	957-982	5'-GGA AGG AGT GGA TTT AGA TCA CAA GA-3'
<i>p21</i>	495-515	5'-CTG GAG ACT CTC AGG GTC GAA-3'
	599-617	5'-CCA GGA CTG CAG GCT TCC T-3'
<i>p53</i>	1209-1229	5'-AAG AAA CCA CTG GAT GGA GAA-3'
	1263-1283	5'-CAG CTC TCG GAA CAT CTC GAA-3'
<i>TGF-<math>\beta</math>1</i>	1788-1808	5'-AGG GCT ACC ATG CCA ACT TCT-3'
	1869-1889	5'-CCG GGT TAT GCT GGT TGT ACA-3'

**Table 1.** Primers used for Real-Time RT-PCR

### Gene silencing experiments

Small interfering RNA (siRNA) transfection experiments against p53 and p38<sup>MAPK</sup> were performed using double-stranded RNA synthesized by Dharmacon (siGENOME SMARTpool, Dharmacon, USA). A non-targeting siRNA (Eurogentec, Belgium) was used as control. IMR-90 hTERT cells were transfected with JetSI (Eurogentec, Belgium) at a ratio of 3  $\mu$ l/ $\mu$ g of siRNA according to the manufacturer's instructions. Transfection efficiency in cells plated on cover-slips was determined using fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled siRNA and evaluated to 90-95% after 24 h and 48 h by cell counting by a confocal microscopy (Leica, Germany). IMR-90 hTERT cells were plated in 25 cm<sup>2</sup> flasks at 50% confluence 24 h before

Germany). IMR-90 hTERT cells were plated in 25 cm<sup>2</sup> flasks at 50% confluence 24 h before transfection with 50 nM siRNA or incubated with JetSI alone. At 24 h after transfection, cells were stressed for 2 h with 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. At 24 h after the stress, extraction of total RNA and Real-Time RT-PCR were performed.

### ***Western blot analysis***

Cells were washed once with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed on ice (10 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate and anti-protease complete (Roche, Germany). After homogenization of the lysates, 30 µg of proteins were electrophoresed on Bis-Tris Gel NuPage 10% (Invitrogen, UK). The proteins were transferred on hybond-P membrane (Amersham Biosciences, Sweden). We used anti-p53 (sc-6243), anti-p21<sup>WAF-1</sup> (sc-6246) (Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-phosphorylated-p38<sup>MAPK</sup>, anti-p38<sup>MAPK</sup> (#9211, Cell Signaling Technology, USA), anti-α-tubulin antibody (AM2495-11, Innogenex, USA) and horseradish peroxidase-linked secondary antibodies (Amersham Biosciences, Sweden). The bands were visualized after incubation of chemiluminescent substrates (ECL Advance Detection Kit, Amersham Biosciences, Sweden). Semi-quantification was obtained with the ImageMaster TotalLab software (Pharmacia, Sweden).

### ***Detection of transcription factor DNA-binding activity***

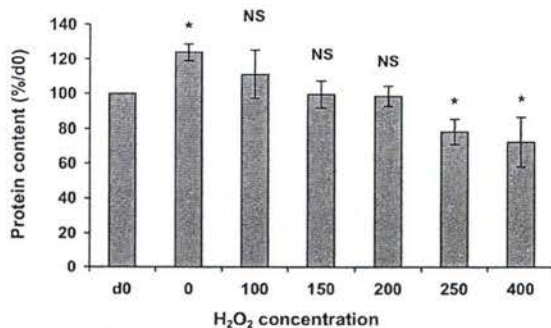
DNA-binding ELISA assays (TransAM kits, ActiveMotif, USA) were based on the use of multi-well plates coated with a cold oligonucleotide containing the consensus binding site for p53. The presence of the DNA-bound p53 was detected by specific antibodies and revealed by colorimetry. The specificity and high reproducibility of this type of assay have been previously demonstrated. This assay has also shown to be more sensitive than electrophoretic mobility shift assay [23] and has already been used in senescence-related studies [21]. Nuclear extracts were obtained, according to manufacturer's instructions, at increasing times after a single exposure of IMR-90 hTERT cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 200 µM. Values were reported as average of triplicate analysis ± s.d..

### ***Statistical analysis***

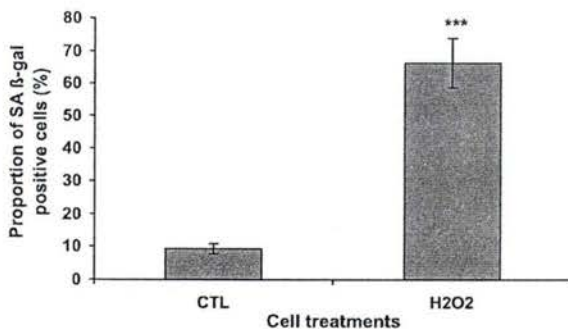
Statistical analysis was carried out with the Student's t-test. ns, non significant (P>0.05); \*, 0.05>P>0.01; \*\*, 0.01 >P> 0.001; \*\*\*, P<0.001.

**Figure 1**

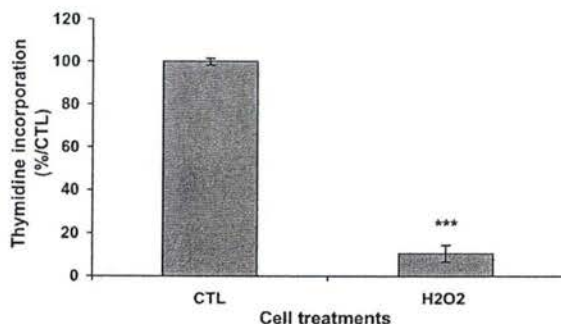
**A. Cell survival**



**B. SA  $\beta$ -gal activity**



**C. [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation**



**Figure 1.**

Increased proportion of SA  $\beta$ -gal positive cells and inhibition of DNA synthesis in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated IMR-90 hTERT fibroblasts. **A.** Cytotoxicity of a single exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in IMR-90 hTERT HDFs. The results are expressed as percentages of the values found in control cells at day 0 (d0) before the stress. **B.** Proportion of cells positive for the SA  $\beta$ -gal activity at 72 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. **C.** Estimation of the proliferative potential of IMR-90 hTERT HDFs exposed to a single H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress by measurement of the incorporation of [<sup>3</sup>H]-thymidine into DNA at 72 h after stress. The results obtained are expressed as percentages of the cpm incorporated by the control cells. The results are given as mean  $\pm$  s.d. from three independent experiments.

## RESULTS

### Model characterisation

#### *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence in IMR-90 hTERT HDFs*

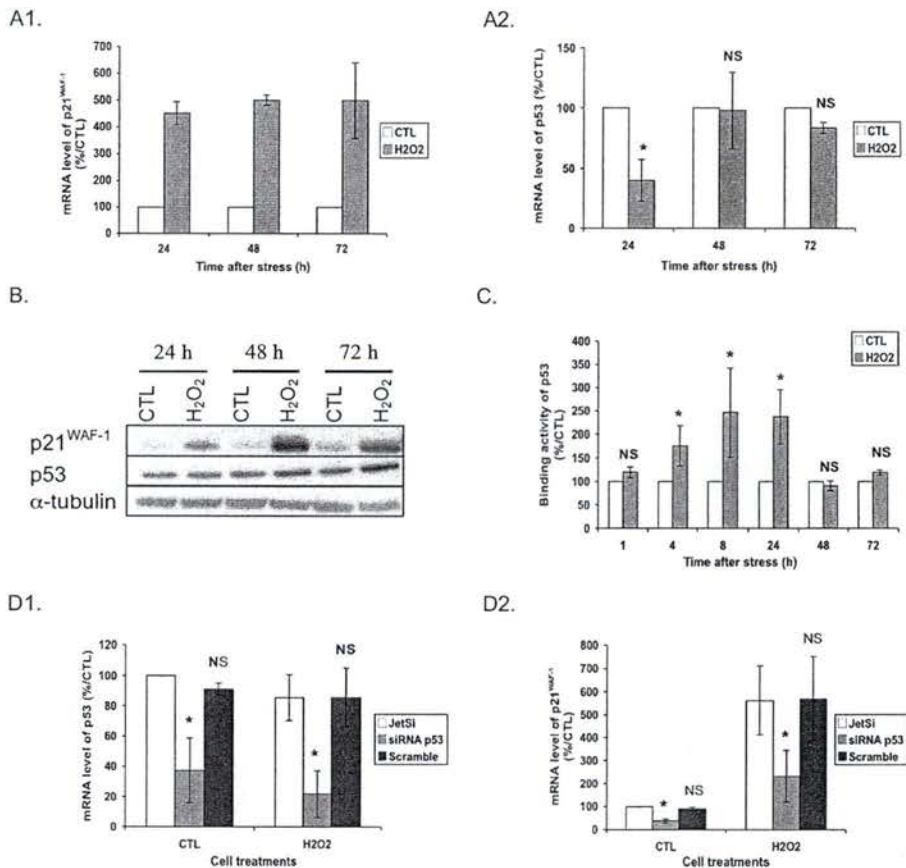
To select the conditions of subcytotoxic stress, cell viability was determined by protein mass assay [22] at 48 h after the stress. This method has proven to give results representing cell survival in models of subcytotoxic stress when compared to other methods such as the MTT method or cell counting method [11, 13, 21]. At 48 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress, the cellular protein content of the control cells increased by 25%. Thus, an apparent 25% decrease of cellular protein content at 48 h after stress with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, when compared to protein content before stress, corresponds to an absence of growth rather than cell death [18]. Cytotoxicity was found after exposure to 250 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 1A). Therefore the subcytotoxic dose used throughout this study was 200 µM. Senescence-associated β-galactosidase activity was shown to be a reliable marker of fibroblast senescence [15]. At 72 h after stress, the proportion of SA β-gal positive activity was around 55% compared to 11% in the control cells (Fig. 1B). This proportion is in agreement with published results [10, 11, 18].

Irreversible growth arrest is an important feature of replicative senescence and SIPS. The level of [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation into DNA was determined at 72 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. This level fell by 72% in IMR-90 hTERT cells at 72 h after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 1C). Thus, sublethal oxidative stress under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced premature appearance of two important markers of replicative senescence in IMR-90 hTERT HDFs. These results confirmed that expression of catalytically active telomerase does not prevent stress-induced senescence, as shown previously [18, 19, 24].

#### *Expression level of p21<sup>WAF-1</sup> and p53*

p21<sup>WAF-1</sup> is an universal inhibitor of cyclin dependent kinases and causes G1 growth arrest. It is up-regulated by p53 after DNA damage and is overexpressed after five repeated exposures of WI-38 HDFs to *t*-BHP [11] and after a single exposure of IMR-90 HDFs to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [25]. We estimated the levels of p21<sup>WAF-1</sup> and p53 at mRNA and protein level in IMR-90 hTERT HDFs after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. When compared with non treated cells, the mRNA level and protein abundance of p21<sup>WAF-1</sup> was highly increased at 24, 48 and 72 h after stress (Fig. 2A1 and 2B). The mRNA level of p53 decreased during the first 24 h and returned close to the initial level at 48 and 72 h after stress (Fig. 2A2). A slight 30% increase of p53 protein was found at 72 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress (Fig. 2B). Using a colorimetric ELISA assay, we showed

**Figure 2**



**Figure 2.**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates the p53-p21<sup>WAF-1</sup> pathway in IMR-90 hTERT HDFs. **A**, Steady-state mRNA level of p21<sup>WAF-1</sup> (A1) and p53 (A2). Total RNA was extracted at 24, 48 and 72 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. The GAPDH steady-state mRNA level was used as reference in the Real Time RT-PCR. Results are expressed in percentage of the corresponding control as mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments. White columns: control cells; grey columns: cells after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at sublethal concentration. **B**, Analysis of p21<sup>WAF-1</sup> and p53 protein level by western-blotting. The expression of p21<sup>WAF-1</sup> and p53 in control or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stressed cells was determined at 24, 48 and 72 h after stress.  $\alpha$ -tubulin protein was used as reference level. **C**, Quantitative detection of DNA binding activity of p53 using a colorimetric assay. Tests were performed on 10  $\mu$ g of nuclear proteins extracted at various times after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. Results are expressed in percentage of the corresponding control as mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments. White columns: control cells; grey columns: cells after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at sublethal concentration. **D**, Effect of p53-specific siRNA on p53 (D1) and p21<sup>WAF-1</sup> (D2) mRNA level. IMR-90 hTERT HDFs were transfected for 4 h with 50 nM of p53 siRNA or non targeting siRNA (Scramble) and incubated for 4 h with the transfection reagent (JetSi), and then stressed or not (controls, CTL) with 200  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Total RNA was extracted at 24 h after stress and the GAPDH steady-state mRNA level was used as reference in the Real Time RT-PCR. The results obtained from the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stressed cells are expressed as percentage of the steady-state mRNA level of the control cells treated with JetSi (CTL JetSi). The results are given as mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments.

that the DNA binding activity of p53 was increased between 4 and 24 h after stress and not at 48 and 72 h (Fig. 2C). This type of assay was already compared to electrophoretic mobility shift assay, showing increased sensitivity [23] and was already used in premature senescence-based studies [21]. In order to investigate the transcriptional role of p53 in the induction of p21<sup>WAF-1</sup> at 24 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress, endogenous expression of p53 was down-regulated using small interfering RNA (siRNA) (50 nM/L) specifically targeting p53. Using Real Time RT-PCR analysis, we confirmed that p53 siRNA treatment attenuated p53 mRNA level by 65% in the control cells (Fig. 2D1). As a control, nonsilencing siRNA (Scramble) did not affect p53 level. p53 siRNA affected the basal level of p21<sup>WAF-1</sup> mRNA but did not affect the overexpression of p21<sup>WAF-1</sup> after stress. Indeed a five-fold overexpression was observed with p53 siRNA and control siRNA compared to the respective non stressed controls (Fig. 2D2). A p53-independent induction of p21<sup>WAF-1</sup> in SIPS has already been suggested since IMR-90 HDFs lacking p53 due to ectopic expression of the viral protein E6 are still able to develop a senescent phenotype after subcytotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress with elevated p21<sup>WAF-1</sup> level [26]. However, E6 protein can interact with several proteins like p73 [27], CBP/p300 [28], the interferon regulatory factor-3 (IRF-3) [29] and Myc protein [30]. This fully justifies the siRNA approach described above since it is p53 specific.

#### ***Gene expression in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence***

In a second step of this study, we wished to test how H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence of IMR-90 hTERT HDFs affects the expression level of senescence- and stress-related genes in order to better characterize premature senescence in hTERT expressing fibroblasts. For this purpose, we generated a low-density DNA array allowing to estimate the relative expression level of 240 genes involved in cell senescence or stress response. The list of the genes present on this low density DNA array was published previously [13]. This set of senescence and stress-related genes involves key players in cell proliferation, apoptosis, pro-inflammatory status and stress response. In this part of the work, we compared the relative levels of 240 transcripts in IMR-90 hTERT HDFs at 24 and 72 h after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 200  $\mu$ M. Respectively 16 and 18 genes were found to be significantly up-regulated at 24 and 72 h after stress (Table 2A). Respectively 35 and 17 genes displayed a decreased mRNA level (Table 2B) at 24 and 72 h after stress. Among these genes, only 4 and 14 genes were found to be respectively overexpressed or repressed at both 24 and 72 h after stress, indicating a different pattern of genes with modified expression level at different times after stress. This interesting finding is detailed here under.

**Table 2**

A. Genes overexpressed

Gene	Name	Genbank	24h	72h
<b>Apoptosis / Inflammation</b>			<b>fold-overexpression</b>	<b>fold-overexpression</b>
BAX	Bcl2-associated X protein	NM_004324		1.42 ± 0.23
BCLX	Bcl-2-related gene	NM_000633		1.47 ± 0.28
IL11	Interleukin 11	NM_000641		1.58 ± 0.23
<b>DNA synthesis / Cell cycle regulation</b>				
CCNG	Cyclin G	U53328	2.82 ± 1.78	
H2B/S	histone 2b member B/S consensus	NM_080593	2.37 ± 1.09	2.66 ± 0.24
ID2	Inhibitor of DNA binding 2	M97796	1.77 ± 0.14	
MDM2	MDM2	NM_002392	11.71	2.95
ODC	Ornithine decarboxylase 1	NM_002539	1.90 ± 0.74	
p21	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	U03106	2.88 ± 0.50	3.21 ± 0.78
<b>Defense system/ Stress response</b>				
AOP2	Anti-oxidant-protein2	NM_004905		1.55 ± 0.14
GADD153	DNA damage inducible transcript3	S40706	6.19 ± 1.40	2.66 ± 1.17
GPX	glutathione peroxidase	M21304		1.49 ± 0.22
HMOX	heme-oxygenase	NM_002133	2.45 ± 0.65	
HSP70B	Heat shock 70 kD	NM_002155	1.88 ± 0.26	
HSP90-alpha	Heat shock 90 kD alpha	X15183	1.82 ± 0.29	
JNK2	Mitogen activated protein kinase 9	U09759	1.73 ± 0.10	
<b>Growth factors</b>				
CTGF	Connective tissue growth factor	U14750		1.57 ± 0.21
HBEGF	Heparin binding epidermal growth factor	M60278	1.54 ± 0.06	
<b>Insulin Growth Factor Binding protein</b>				
IGFBP2	Insulin growth factor binding protein 2	M35410		2.44 ± 0.57
IGFBP3	Insulin growth factor binding protein 3	X64875		1.97 ± 0.51
IGFBP5	Insulin growth factor binding protein 5	M65062		2.55 ± 1.46
<b>Morphology / Cellular adhesion</b>				
SM22	transgelin	M95787		2.01 ± 0.37
TPA	Tissue Plasminogen Activator	NM_000930		1.45 ± 0.32
<b>Protein degradation</b>				
CTSD	cathepsin D	NM_001904		1.67 ± 0.38
MMP1	matrix metalloproteinase 1	NM_002421	2.24 ± 0.55	
MMP14	matrix metalloproteinase 14	NM_004995		1.81 ± 0.33
MMP2	matrix metalloproteinase 2	NM_004530		2.23 ± 0.65
PLAU	urokinase	NM_002658	1.75 ± 0.32	
<b>Protein synthesis</b>				
EF1A	Eukaryotic translation elongation factor	AY043301	1.89 ± 0.36	
RPS10	ribosomal-protein S10	NM_001014	1.83 ± 0.58	

**Table 2A.** List of genes overexpressed at 24 and 72 h after exposure of IMR-90 hTERT HDFs to 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Differential gene expression has been estimated by calculating the ratio of the normalized hybridization intensity values obtained in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stressed-cells compared to that obtained with the control cells. The results are given as the mean of the ratios  $\pm$  s.d. of three independent experiments.



Table 2

## B. Genes down-regulated

Gene	Name	Genbank	24h	72h
<b>Apoptosis / Inflammation</b>			fold-downregulation	fold-downregulation
CASP8	Caspase 8	X98172		2.44 ± 0.09
COX1	Prostaglandin endoperoxidase synthase 1	NM_000962	2.20 ± 0.11	
RANTES	Small inducible cytokine A5	NM_002985	3.04 ± 0.21	
<b>DNA synthesis / Cell cycle regulation</b>				
BAT1	Nuclear-RNA-helicase	Z37166	1.56 ± 0.34	1.59 ± 0.12
CCNB1	cyclin B1	NM_031966	5.04	15.80
CCND3	cyclin D3	NM_001760	2.17 ± 0.13	
CDK2	Cyclin dependent kinase 2	NM_001798	1.44 ± 0.33	6.78
CDK4	Cyclin dependent kinase 4	U79269	1.56 ± 0.26	
DHFR	Dihydrofolate reductase	NM_000791	6.04	6.94
E2F1	E2F transcription factor 1	NM_005225	4.54 ± 0.08	3.81
H4FM	histone 4 member M consensus	NM_003495	3.13 ± 0.11	3.66 ± 0.08
MCM2	Mitotin	D21063	3.33 ± 0.05	
PLK	Polo-like kinase	U01038	14.18	16.42
POLA2	Polymerase alpha	NM_002689	3.03 ± 0.18	2.68
RRM1	ribonucleotide-reductase M1	NM_001033	2.07 ± 0.25	2.33 ± 0.10
TFAP2A	Transcription factor AP2-alpha	M36711	1.74 ± 0.09	
TK1	thymidine kinase	NM_003258	5.43 ± 0.06	23.35
TYMS	thymidylate-synthetase	NM_001071	1.98 ± 0.46	1.99 ± 0.08
<b>Defense system/ Stress response</b>				
ADPRT	polysynthetase	J03473	2.79 ± 0.18	2.14 ± 0.05
MSRA	methionine-sulfoxide-reductase A/peptide	AF183420	1.80 ± 0.21	1.69 ± 0.10
RRAS	R-ras	NM_006270	1.77 ± 0.08	
<b>Growth factors</b>				
CTGF	Connective tissue growth factor	U14750	1.88 ± 0.06	
IGFBP5	Insulin growth factor binding protein 5	M65062	2.34 ± 0.21	
<b>Morphology / Cellular adhesion</b>				
COL1A1	Collagen 1 alpha1	NM_000088	1.97 ± 0.26	
COL3A1	collagen III alpha1	NM_000090	3.59 ± 0.16	
FN1	fibronectin	X02761	2.80 ± 0.10	
Oste	osteonectin	NM_003118	1.70 ± 0.24	
SM22	transgelin	M95787	2.65 ± 0.19	
THBS1	Thrombospondin	X14787	4.09 ± 0.03	
TPA	Tissue Plasminogen Activator	NM_000930	2.08 ± 0.11	
<b>Protein degradation</b>				
MP1	Metalloprotease 1	AF061243	1.56 ± 0.19	
PSMA3	proteasome subunit. alpha type 3	NM_002788		1.98 ± 0.24
PSMD1	proteasome 26S subunit. non-ATPase. 1	NM_002807		1.61 ± 0.12
TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	NM_003254	1.53 ± 0.06	
TIMP2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	NM_003255	1.91 ± 0.08	
UBE2C	Ubiquitin conjugating enzyme E2C	NM_007019	9.50	43.33
<b>Energy metabolism</b>				
ETFB	electron-transfert-flavoprotein-beta	NM_001985	1.66 ± 0.29	
G6PD	glucose-6-phosphate-dehydrogenase	NM_000402	1.61 ± 0.17	

**Table 2B.** List of genes down-regulated at 24 and 72 h after exposure of IMR-90 hTERT HDFs to 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Differential gene expression has been estimated by calculating the ratio of the normalized hybridization intensity values obtained in  $\text{H}_2\text{O}_2$  stressed-cells compared to that obtained with the control cells. The results are given as the mean of the ratios  $\pm$  s.d. of three independent experiments.

**Table 2**

C. Real-Time RT-PCR versus DNA array

Gene	Real-time	Array
CTGF	1,61 ± 0,57	1,57 ± 0,21
Fibronectin	1,19 ± 0,13	1,23 ± 0,20
GADD153	2,17 ± 1,12	2,67 ± 1,17
HSP27	1,09 ± 0,31	1,08 ± 0,11
IGFBP3	1,55 ± 0,33	1,97 ± 0,51
IGFBP5	1,94 ± 0,21	2,55 ± 1,46
MMP2	2,21 ± 0,54	2,23 ± 0,65
Osteonectin	1,13 ± 0,22	1,26 ± 0,10
p21	4,98 ± 1,42	3,05 ± 0,97
TGF-β1	1,01 ± 0,14	0,92 ± 0,28

**Table 2C.** Comparison between the data obtained with Real-Time RT-PCR and the DualChip human aging. Total RNA was extracted at 72 h after exposure of IMR-90 hTERT HDFs to 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The GAPDH steady-state level was used as reference in the Real-Time RT-PCR. Results are obtained from three independent cell cultures which considers both technical and experimental reproducibility.

### Control of cell cycle

HDFs undergoing SIPS are growth arrested in G1 phase of the cell cycle [26]. Several anti-proliferative genes were found as overexpressed in our model. First, the DNA array confirmed the overexpression of  $p21^{WAF-1}$  in agreement with the data obtained with Real-Time RT-PCR. In addition, *insulin growth factor binding protein-3* (IGFBP-3) [31], *IGFBP-5* [32] and *GADD153* [33] were also found to be overexpressed in oxidative conditions. Genes involved in DNA synthesis were down-regulated such as *thymidine kinase* (TK), *thymidylate synthetase* (TYMS), *dihydrofolate reductase* (DHFR), *ribonucleotide-reductase M1* (RRM1) at both 24 and 72 h after stress. Genes involved in cell cycle regulation such as *cyclin B1* (CCNB1), *cyclin dependent kinase 2* (CDK2), *polo-like kinase* (PLK), *polymerase A2* (POLA2) and  $E_2F_1$  were also down-regulated at both 24 and 72 h after stress. The decreased expression of these genes can be explained, in part, by the down-regulation of  $E_2F_1$  transcription factor.

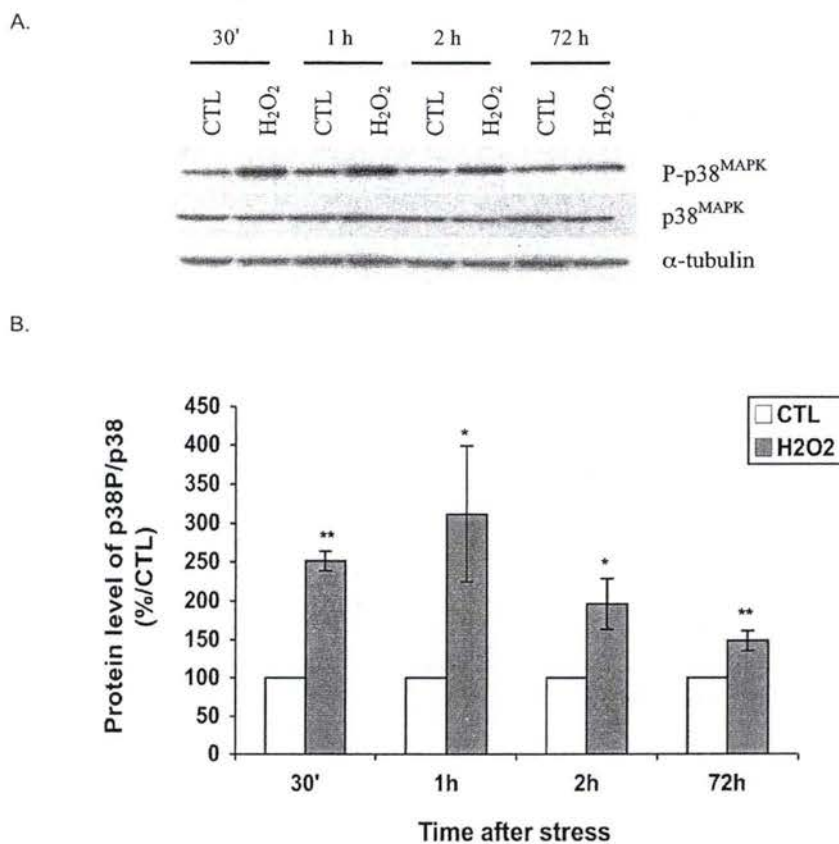
### Extracellular matrix

Modification of expression level of genes involved in cellular morphology and extracellular matrix (ECM) has been reported in replicative senescence [12, 34]. In our model of SIPS, we report an overexpression of *metalloproteinase-1* (MMP-1) at 24 h after  $H_2O_2$  stress, and an overexpression of *metalloproteinase-2 and -14* (MMP-2 and MMP-14) at 72 h after  $H_2O_2$  stress. MMP-2 is known to be activated by MMP-14 and participates in the degradation and remodelling of the ECM [35]. On the other hand, genes which products are involved in the synthesis of ECM, as *collagen 1 alpha 1 and collagen 3 alpha 1* (COL1A1, COL3A1), *fibronectin* (FN) and *osteonectin* (Oste) were down-regulated at 24 h after  $H_2O_2$  stress. If confirmed at protein level, this could result in a shift from a matrix-synthesizing to a matrix-degradation phenotype in HDFs in  $H_2O_2$ -induced premature senescence, as already proposed in replicative senescence [34] and UVB induced premature senescence [13]. The decreased mRNA level of *tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2* (TIMP-1, TIMP-2) at 24 h after  $H_2O_2$  stress, further consolidates this hypothesis.

### Defense system

At 24 h after stress, genes which products are involved in defense against stress like *heat shock protein 70 kD* (HSP70B), *HSP90-alpha* and *heme oxygenase* (HMOX), were overexpressed. *Glutathione peroxidase* (GPX) and *anti-oxidant protein 2* (AOP-2 or peroxiredoxin 6) mRNA levels were increased at 72 h after stress.

Figure 3



**Figure 3.**

Activation of p38<sup>MAPK</sup> in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stressed IMR-90 hTERT HDFs. A, Western-blot analysis of p38<sup>MAPK</sup> and phosphorylated p38<sup>MAPK</sup> on Thr180/Tyr182 at 30 min, 1, 2 and 72 h after exposure of IMR-90 hTERT cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. α-tubulin protein was used as reference level. B, Quantification of the protein level. The results are expressed as percentages of the protein level in the control cells (CTL). Results are given as mean ± s.d. of three independent experiments. White columns: control cells ; grey columns: cells after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at sublethal concentration

### Apoptosis

Pro-apoptotic genes as *Bcl2-associated X protein* (BAX) and *cathepsin D* (CTSD) [36] were overexpressed as well as anti-apoptotic genes as *Bcl2-associated gene* (Bcl-x) and *interleukin 11* (IL-11) genes at 72 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. As the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration used was sublethal, it can suggest that the balance between pro- and anti-apoptotic proteins was not altered in favor of apoptosis. IL-11 is a cytokine which protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death in endothelial cells [37]. The ability of IL-11 to up-regulate the expression of some anti-apoptotic genes as Bcl-2 and Bcl-x [38], might be important in this respect.

A large deal of results obtained with this technology of DNA array have already been confirmed by Real-Time RT-PCR [12, 13, 21]. However, we tested whether similar relative expression levels of 10 genes would be found with Real-Time RT-PCR and this array. We confirmed the differential expression level at 72 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress for *CTGF*, *GADD153*, *IGFBP-3*, *IGFBP-5*, *MMP-2*, and *p21<sup>WAF-1</sup>*. Both techniques showed that *fibronectin*, *HSP27*, *osteonectin* and *TGF-β1* were not differentially expressed in this model (Table 2C).

### Role of p38<sup>MAPK</sup>

#### ***p38<sup>MAPK</sup> is involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence of IMR-90 hTERT cells***

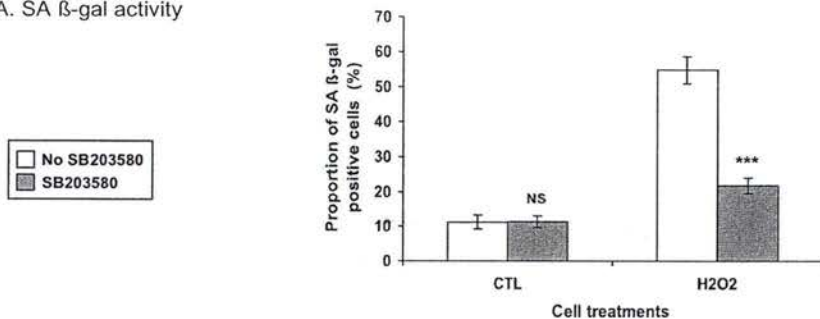
Exposure of cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates various kinases that may modify the cellular responses to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and participates in the induction of premature senescence [39]. We previously reported a Thr180/Tyr182 phosphorylation of p38<sup>MAPK</sup> in IMR-90 HDFs at various times up to 72 h after stress [20]. Phosphorylated p38<sup>MAPK</sup> was also detected in IMR-90 hTERT HDFs after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 200 μM. Indeed Western-blot analysis revealed that p38<sup>MAPK</sup> phosphorylation was increased in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stressed cells at rather short times after stress (30 min, 1 h and 2 h) and at 72 h after stress while the abundance of total p38<sup>MAPK</sup> was similar in all tested conditions (Fig. 3).

In order to determine whether activation of p38<sup>MAPK</sup> participates in the appearance of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence, the cells were incubated with a specific inhibitor of p38<sup>MAPK</sup>, SB203580 at 20 μM before, during and after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A 5.5-fold increase in the proportion of SA β-gal positive IMR-90 hTERT HDFs at 72 h after treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was observed, reaching 54% of positive cells. SB203580 dramatically inhibited the stress-induced increase of the proportion of SA β-gal positive cells, with only a 2-fold increase, reaching 22% of positive cells (Fig. 4A).

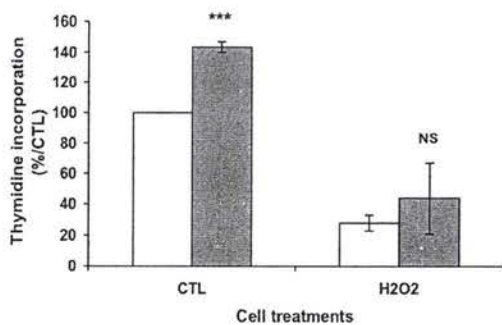
Presence of 20 μM SB203580 did not alter the important decrease of [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation into DNA nor the induction of p21<sup>WAF-1</sup> observed after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 4B

Figure 4

A. SA  $\beta$ -gal activity



B. [ $^3$ H]-thymidine incorporation



C. p21<sup>WAF-1</sup> mRNA level

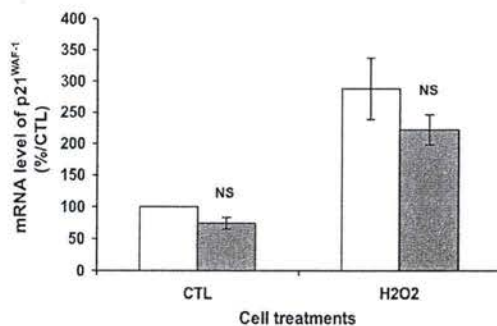


Figure 4.

A, Effect of p38<sup>MAPK</sup> inhibitor SB203580 (20  $\mu$ M) on the percentage of IMR-90 hTERT HDFs positive for SA  $\beta$ -gal activity at 72 h after 2 h of stress with 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. B, Effect of p38<sup>MAPK</sup> inhibitor SB203580 (20  $\mu$ M) on the proliferative potential of IMR-90 hTERT HDFs exposed to a single H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. The incorporation of [ $^3$ H]-thymidine into DNA was measured at 72 h after stress. The results obtained are expressed as percentages of the cpm incorporated by the control cells. C, Effect of p38<sup>MAPK</sup> inhibitor SB203580 (20  $\mu$ M) on the expression level of p21<sup>WAF-1</sup> in IMR-90 hTERT HDFs exposed to a single H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. Total RNA was extracted at 72 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. The GAPDH steady-state mRNA level was used as reference in the Real Time RT-PCR. The results are given as mean  $\pm$  s.d. from three independent experiments. White columns: normal cells ; grey columns: cells treated with 20  $\mu$ M SB203580.

and 4C). Similar results were obtained with wild-type IMR-90 HDFs using p38<sup>MAPK</sup> inhibitor and anti-p38<sup>MAPK</sup> antisense [20].

### **p38<sup>MAPK</sup>-dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-regulated genes**

In IMR-90 wild-type cells in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence [20], as well as in human skin fibroblasts in UVB-induced premature senescence [13], the overexpression of *fibronectin*, *osteonectin* and *apolipoprotein J* is regulated by TGF-β1. Remarkably we did not find an overexpression of any of these three genes and TGF-β1 in IMR-90 hTERT cells in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence with DNA arrays and Real-Time RT-PCR. Given IMR-90 hTERT cells displayed senescence-related morphological changes and SA β-gal, which were previously shown to be p38<sup>MAPK</sup>-dependent in wild-type IMR-90 HDFs [20], we wished to test whether alteration of expression of other senescence-related genes could be controlled by p38<sup>MAPK</sup>. Specific inhibitor of p38<sup>MAPK</sup> and p38<sup>MAPK</sup> siRNA were used. First we used our senescence related DNA array to analyze gene expression modifications in IMR-90 hTERT HDFs incubated or not with 20 μM of SB203580 for 24 and 72 h after stress with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The results suggested that the expression level of 19 and 15 genes was dependent on p38<sup>MAPK</sup> respectively at 24 and 72 h after stress. In agreement with results from studies based on other biological models, the overexpression of *BCL-x* [40], *IL-11* [41], *CTGF* [42], *IGFBP-3* [43], *IGFBP-5* [44] and *MMP-2* [45] was found to be also regulated by p38<sup>MAPK</sup> in IMR-90 hTERT cells in SIPS (Table 3A) at 72 h after stress. At 24 h after stress, *HB-EGF* [46] and *PLAU* [47] were dependent of p38<sup>MAPK</sup>. We showed, for the first time, that expression of *histone 2b* (H2B/S), *Inhibitor of DNA binding-2* (ID2), *AOP2*, *GPX*, *IGFBP-2*, *tissue plasminogen activator* (TPA), and *MMP-14* was p38<sup>MAPK</sup>-dependent.

Interestingly SB203580 attenuated the down-regulation of *fibronectin*, *osteonectin*, and *thrombospondin* (THBS) at 24 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress (Table 3B). Several studies showed that stimulation of normal fibroblasts with TGF-β1 induced overexpression of these three genes through the p38<sup>MAPK</sup>/ATF-2 pathway [20, 48]. The fact that TGF-β1 was not overexpressed in IMR-90 hTERT fibroblasts in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence likely explains why these TGF-β1-dependent genes were not overexpressed in this model. Similar effect of SB203580 was found for tissue plasminogen activator (TPA) which was a novel finding. A correspondence between Real-Time RT-PCR and array data was found in all differentially expressed genes tested at 72 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress ± SB203580 (Table 3C).

To confirm the results obtained with SB203580, we used a specific siRNA to knockdown p38<sup>MAPK</sup> expression. Using Real-Time RT-PCR analysis, we showed that p38<sup>MAPK</sup> siRNA treatment attenuated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced p38<sup>MAPK</sup> expression by 80% at 24 h after stress (Fig. 5A). As shown with SB203580, p38<sup>MAPK</sup> siRNA did not interfere with the stress-induced increase

Table 3

## A. Genes overexpressed

Gene	Name	Genbank	24h after stress		72h after stress	
			SB203580	Student Test	SB203580	Student Test
<b>Apoptosis / Inflammation</b>						
BAX	BCL2-associated X protein	NM_004324			1.42 ± 0.23	NS
BCLX	B-cell lymphoma 2	NM_080593			1.47 ± 0.28	**
IL11	Interleukin 11	NM_000641			1.58 ± 0.23	**
<b>DNA synthesis / Cell cycle regulation</b>						
CCNG	Cyclin G	U53328	2.82 ± 1.78	1.68 ± 0.54	NS	NS
ID2	histone 2b member B/S consensus	NM_080593	2.37 ± 1.09	2.01 ± 0.61	NS	NS
MDM2	Inhibitor of DNA binding 2	M97796	1.77 ± 0.14	0.76 ± 0.14	***	***
ODC	Ornithine decarboxylase 1	NM_002392	1.71			2.95
p21	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	NM_002539	1.90 ± 0.74	1.44 ± 0.86	NS	NS
		U03106	2.88 ± 0.50	3.01 ± 0.24	NS	NS
<b>Defense system / Stress response</b>						
AOP2	Anti-oxidant-protein2	NM_004905			1.55 ± 0.14	***
GADD153	DNA damage inducible transcript3	S40706	6.19 ± 1.40	9.87 ± 2.95	NS	NS
GPX	glutathione peroxidase	M21304			2.66 ± 1.17	NS
HMOX	heme-oxygenase	NM_002133	2.45 ± 0.65	2.44 ± 0.54	NS	*
HSP70B	Heat shock 70 kD	NM_002155	1.88 ± 0.26		1.49 ± 0.22	
HSP90-alpha	Heat shock 90 kD alpha	X15183	1.82 ± 0.29	0.98 ± 0.34	**	**
JNK2	Mitogen activated protein kinase 9	U09759	1.73 ± 0.10	2.06 ± 0.50	NS	NS
<b>Growth factors</b>						
CTGF	Connective tissue growth factor	U14750			1.57 ± 0.21	***
HBEGF	Heparin binding epidermal growth factor	M60278	1.54 ± 0.06	1.05 ± 0.08	*	*
<b>Insulin Growth Factor Binding protein</b>						
IGFBP2	Insulin growth factor binding protein 2	M35410			2.44 ± 0.57	**
IGFBP3	Insulin growth factor binding protein 3	X64875			1.97 ± 0.51	**
IGFBP5	Insulin growth factor binding protein 5	M65062			2.55 ± 1.46	***
<b>Morphology / Cellular adhesion</b>						
SM22	transgelin	M95787			2.01 ± 0.37	***
TPA	Plasminogen activator tissue	NM_000930			1.45 ± 0.32	**
<b>Protein degradation</b>						
CTSD	cathepsin D	NM_001904			1.67 ± 0.38	NS
MMP1	matrix metalloproteinase 1	NM_002421	2.24 ± 0.55	2.55 ± 0.55	NS	NS
MMP14	matrix metalloproteinase 14	NM_004995			1.81 ± 0.33	***
MMP2	matrix metalloproteinase 2	NM_004530			2.23 ± 0.65	*
PLAU	urokinase	NM_002658	1.75 ± 0.32	0.70 ± 0.17	***	***
<b>Protein synthesis</b>						
EF1A	Eukaryotic translation elongation factor	A Y043301	1.89 ± 0.36	1.89 ± 0.35	NS	NS
RPS10	ribosomal-protein S10	NM_001014	1.83 ± 0.38	1.87 ± 0.39	NS	NS

**Table 3A** Effect of p38<sup>MAPK</sup> inhibitor SB203580 (20  $\mu$ M) on the transcriptional level of genes overexpressed at 24 and 72 h after exposure of IMR-90 hTERT HDFs to 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Differential gene expression has been estimated by calculating the ratio of the normalized hybridization intensity values obtained in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ± SB203580 stressed-cells compared to that obtained with the control ± SB203580 cells. The results are given as the mean of the ratios ± s.d. of three independent experiments.



Table 3

## B. Genes down-regulated

Gene	Name	Genbank	24h after stress		72h after stress	
			SB203580	Student Test	SB203580	Student Test
<b>Apoptosis / Inflammation</b>						
CASP8	Caspase 8	X98172				
COX1	Prostaglandin endoperoxidase synthase 1	NM_000962	2.20 ± 0.11	1.08 ± 0.22		***
RANTES	Small inducible cytokine A5	NM_002985	3.04 ± 0.21	2.19 ± 0.15	NS	
<b>DNA synthesis / Cell cycle regulation</b>						
BAT1	Nuclear-RNA-helicase	Z37166	1.56 ± 0.34	1.37 ± 0.27	NS	NS
CCNB1	cyclin B1	NM_031966	3.04	2.49 ± 0.22		15.80
CCND3	cyclin D3	NM_001760	2.17 ± 0.13	1.79 ± 0.19	NS	4.32
CDK2	Cyclin dependent kinase 2	NM_001798	1.44 ± 0.33	2.09 ± 0.21	NS	6.78
CDK4	Cyclin dependent kinase 4	U79269	1.56 ± 0.26	1.22 ± 0.32	NS	6.94
DHFR	Dihydrofolate reductase	NM_000791	6.04	2.64 ± 0.08		3.59
E2F1	E2F transcription factor 1	NM_005225	4.54 ± 0.08	2.86 ± 0.15	*	3.81
H4FM	histone 4 member M consensus	NM_003495	3.13 ± 0.11	2.45 ± 0.16	NS	3.66 ± 0.08
MCM2	Mitotin	D21063	3.33 ± 0.05	2.75 ± 0.16	NS	
PLK	Polo-like kinase	U01038	74.78	7.95 ± 0.05		16.42
POLA2	Polymerase alpha	NM_002689	3.03 ± 0.18	1.95 ± 0.19	NS	2.68
RRM1	ribonucleotide-reductase M1	NM_001033	2.07 ± 0.25	1.51 ± 0.18	NS	2.35
TFAP2A	Transcription factor AP2-alpha	M36711	1.74 ± 0.09	1.07 ± 0.29	NS	2.33 ± 0.10
TK1	thymidine kinase	NM_003258	5.43 ± 0.06	2.73 ± 0.18	*	23.35
TYMS	thymidylate-synthetase	NM_001071	1.98 ± 0.46	1.60 ± 0.41	NS	1.99 ± 0.08
<b>Defense system / Stress response</b>						
ADPRT	polysynthetase	J03473	2.79 ± 0.18	1.52 ± 0.31	*	2.14 ± 0.05
MSRA	methionine-sulfoxide-reductase A1-peptide	AF183420	1.80 ± 0.21	1.37 ± 0.17	NS	1.69 ± 0.10
RRAS	R-ras	NM_006270	1.77 ± 0.08	1.18 ± 0.17	**	2.20 ± 0.08
<b>Growth factors</b>						
CTGF	Connective tissue growth factor	U14750	1.88 ± 0.06	1.15 ± 0.28	*	
IGFBP5	Insulin growth factor binding protein 5	M65062	2.34 ± 0.21	1.07 ± 0.06	**	
<b>Morphology / Cellular adhesion</b>						
COL1A1	Collagen 1 alpha1	NM_000888	1.97 ± 0.26	2.15 ± 0.04	NS	
COL3A1	collagen III alpha1	NM_000090	3.59 ± 0.16	4.89 ± 0.02	NS	
FNI	fibronectin	X02761	2.80 ± 0.10	2.02 ± 0.07	*	
Oste	osteonectin	NM_003118	1.70 ± 0.24	1.07 ± 0.09	**	
SM22	transgelin	M95787	2.65 ± 0.19	1.09 ± 0.31	*	
THBS1	Thrombospondin	X14787	4.09 ± 0.03	2.91 ± 0.03	*	
TSP1	Plasminogen activator tissue	NM_000930	2.08 ± 0.11	1.19 ± 0.28	*	
<b>Protein degradation</b>						
MP1	Metalloproteinase 1	AF061243	1.56 ± 0.19	1.05 ± 0.16	*	
PSMA3	proteasome subunit, alpha type 3	NM_002788				1.98 ± 0.24
PSMD1	proteasome 26S subunit, non-ATPase 1	NM_002807				1.61 ± 0.12
TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	NM_003254	1.53 ± 0.06	1.11 ± 0.19	***	1.51 ± 0.14
TIMP2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	NM_003255	1.91 ± 0.08	1.02 ± 0.24	**	1.41 ± 0.13
UBP2C	Ubiquitin conjugating enzyme E2C	NM_007019	9.50	6.91 ± 0.08		43.33
<b>Energy metabolism</b>						
ETFB	electron-transfer-flavoprotein-beta	NM_001985	1.66 ± 0.29	1.12 ± 0.26	NS	
GP6D	glucose-6-phosphate-dehydrogenase	NM_000402	1.61 ± 0.17	1.19 ± 0.17	NS	

**Table 3B.** Effect of p38<sup>MAPK</sup> inhibitor SB203580 (20 µM) on the transcriptional level of genes down-regulated at 24 and 72 h after exposure of IMR-90 hTERT HDFs to 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Differential gene expression has been estimated by calculating the ratio of the normalized hybridization intensity values obtained in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ± SB203580 stressed-cells compared to that obtained with the control ± SB203580 cells. The results are given as the mean of the ratios ± s.d. of three independent experiments.

**Table 3**

C. Real-Time RT-PCR versus DNA array

Gene	H2O2 72 h		H2O2 + SB203580	
	Real-time	Array	Real-time	Array
CTGF	1,61 ± 0,57	1,57 ± 0,21	0,66 ± 0,09	0,54 ± 0,14
GADD153	2,17 ± 1,12	2,67 ± 1,17	1,44 ± 1,06	2,04 ± 0,61
IGFBP3	1,55 ± 0,33	1,97 ± 0,51	0,99 ± 0,05	0,89 ± 0,09
IGFBP5	1,94 ± 0,21	2,55 ± 1,46	1,30 ± 0,08	1,29 ± 0,27
MMP2	2,21 ± 0,54	2,23 ± 0,65	1,51 ± 0,01	1,43 ± 0,38
TIMP1	2,18 ± 0,14	2,21 ± 0,39	2,80 ± 0,43	2,06 ± 0,50

**Table 3C.** Comparison between the data obtained with Real-Time RT-PCR and the DualChip human aging. Total RNA was extracted at 72 h after exposure of IMR-90 hTERT HDFs to 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . The GAPDH steady-state level was used as reference in the Real-Time RT-PCR. Results are obtained from three independent cell cultures which considers both technical and experimental reproducibility.

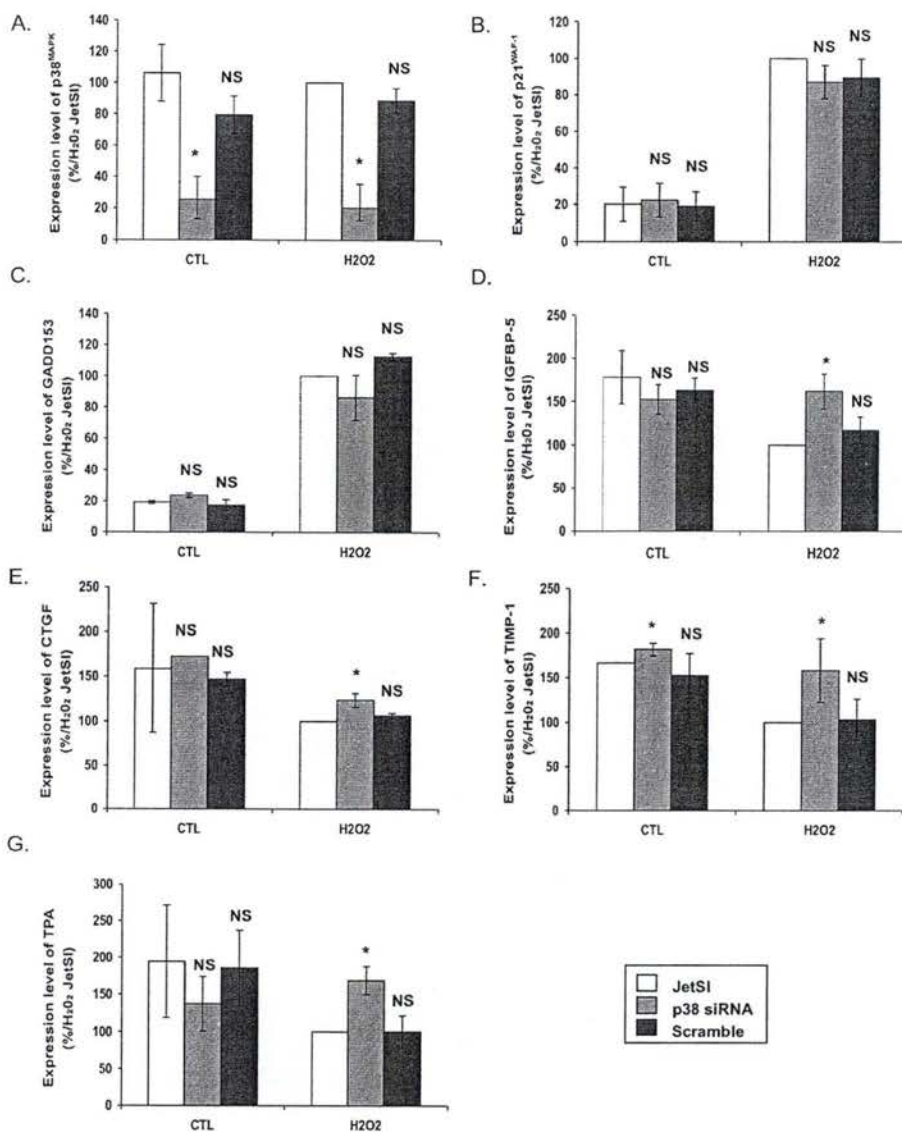
of  $p21^{WAF-1}$  and *GADD153* mRNA level (Fig. 5B to 5C). Still in agreement with results obtained with SB203580, the down-regulation of *CTGF*, *IGFBP-5*, *TPA* and *TIMP-1* was prevented by treatment of cells with  $p38^{MAPK}$  siRNA at 24 h after  $H_2O_2$  stress (Fig. 5D to 5G).

## DISCUSSION

Acute exposure of various strains of HDFs expressing hTERT to  $H_2O_2$  at sublethal concentration induces senescent morphology, SA  $\beta$ -galactosidase activity and causes permanent cell cycle arrest. Ectopic expression of catalytic subunit of human telomerase (hTERT) does not prevent SIPS [18, 19]. This suggests that premature senescence induced by short acute stress is not triggered by critical telomere shortening. We observed no increase of the p53 mRNA and protein level in IMR-90 hTERT cells at 24, 48 and 72 h after exposure to  $H_2O_2$ . A transiently increased DNA-binding activity of p53 was observed from 4 to 24 h after stress. As an explanation of why this activation was transient and disappeared at longer times after stress, our DNA array results showed that *Mdm2* and *Cyclin G* were highly overexpressed at 24 h after stress. Indeed transcription of *Mdm2* is mediated by p53, which in turn binds and promotes p53 degradation *via* the ubiquitin-proteasome pathway [49]. In addition cyclin G is known to be a negative regulator of p53 by recruiting phosphatase 2A and activating *Mdm2* through dephosphorylation [50]. The increased DNA binding activity of p53 from 4 to 24 h after stress could explain the overexpression of *Heparin-Binding Epidermal Growth Factor* (HB-EGF) and  $p21^{WAF-1}$  at 24 h after stress. Expression of HB-EGF was shown to protect cells from  $H_2O_2$ -induced apoptosis through  $p38^{MAPK}$  activation [51].  $p21^{WAF-1}$  is overexpressed at mRNA and protein level in UVB, ethanol, *t*-BHP and  $H_2O_2$ -induced SIPS [10, 12, 13, 18, 26]. The mechanism of transactivation of  $p21^{WAF-1}$  promoter in SIPS remains unknown since p53 DNA binding activity is no more increased favoring the existence of a p53-independent induction of  $p21^{WAF-1}$ , as shown with siRNA experiments.

Large discrepancies in gene expression profiles due to ectopically induced hTERT activity compared to their normal counterparts have already been observed in BJ and hTERT BJ cells [21]. In wild-type IMR-90 HDFs, it has been shown that TGF- $\beta$ 1 is overexpressed at 24, 48 and 72 h after subcytotoxic  $H_2O_2$  stress, which partly controls the appearance of SA  $\beta$ -gal activity, morphological changes and overexpression of *fibronectin*, *osteonectin* and *apolipoprotein J* [10]. In IMR-90 hTERT HDFs, we failed to find any overexpression of TGF- $\beta$ 1 at this times after  $H_2O_2$  stress, as previously shown in hTERT BJ HDFs in premature senescence induced by  $H_2O_2$  [21]. It is likely that overexpression of hTERT could interfere with the transcriptional regulation of TGF- $\beta$ 1 or TGF- $\beta$ 1-related signalling pathways, preventing TGF- $\beta$ 1 overexpression after  $H_2O_2$  stress. Altered regulation of the TGF- $\beta$ 1

**Figure 5**



**Figure 5.**

Effect of p38<sup>MAPK</sup>-specific siRNA on A, p38<sup>MAPK</sup>, B, p21<sup>WAF-1</sup>, C, GADD153, D, IGFBP-5, E, CTGF, F, TIMP-1 and G, TPA steady-state mRNA level. IMR-90 hTERT HDFs were transfected for 4 h with 50 nM of p38<sup>MAPK</sup> siRNA or non targeting siRNA (Scramble) or incubated for 4 h with the transfection reagent (JetSi), and then stressed or not (controls, CTL) with 200 μM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Total RNA was extracted at 24 h after stress and the GAPDH steady-state mRNA level was used as reference in the Real Time RT-PCR. The results obtained are expressed as percentage of the steady-state mRNA level of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stressed cells treated with JetSi (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> JetSi). The results are given as mean ± s.d. of three independent experiments.

pathways due to ectopically originated telomerase activity has already been described, like down-regulation of TGF- $\beta$  receptor II in hTERT BJ human skin fibroblasts [21] and down-regulation of TGF- $\beta$ 2 in bovine adrenocortical cells [52]. On the reverse, down-regulation of TGF- $\beta$  receptor II has been proposed as up-regulating telomerase activity [53]. Autocrine TGF- $\beta$  suppresses telomerase activity and transcription of hTERT in human cancer cells [54]. Similar data were obtained with differentiating trophoblasts [55], retinal pigment epithelial cells [56] and several lines of thyroid carcinoma cells [57]. Expression of a protein belonging to TGF- $\beta$  family, BMP-4, also down-regulated telomerase in A549 lung adenocarcinoma cells [58]. Telomerase activity could down-regulate TGF- $\beta$ 1 or genes involved in activation of TGF- $\beta$ -dependent pathways in IMR-90 hTERT HDFs. This way, TGF- $\beta$ 1 dependent genes *fibronectin*, *osteonectin* and *apolipoprotein J* could not be overexpressed after stress and could even be down-regulated in absence of transactivating factors activated by TGF- $\beta$ 1.

p38<sup>MAPK</sup> has been shown to be activated by phosphorylation on Ser/Thr residue during and after exposure of wild-type IMR-90 HDFs to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at sublethal concentration [20]. In IMR-90 hTERT, we also observed that p38<sup>MAPK</sup> phosphorylation was increased for at least 72 h after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Recently we demonstrated that IMR-90 HDFs in premature senescence induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *de novo* produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for at least 72 h after the stress [59]. This endogenous production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> might explain, in part, why p38<sup>MAPK</sup> remains activated for at least 3 days after stress.

Activation of p38<sup>MAPK</sup> by overexpression of MKK6 can induce a p53-independent cell cycle arrest which becomes permanent and irreversible in association with biochemical features of senescence [60]. It remained to elucidate whether p38<sup>MAPK</sup> was essential for establishment of premature senescence induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in IMR-90 hTERT HDFs. In IMR-90 hTERT and wild-type IMR-90 cells, treatment with the selective p38<sup>MAPK</sup> inhibitor, SB203580, partly inhibited H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced SA  $\beta$ -gal activity. We showed that p38<sup>MAPK</sup> is responsible for the down-regulation of *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1* and *-2* (TIMP-1 and TIMP-2) and several genes involved in cellular morphology and extracellular matrix (*fibronectin*, *osteonectin*, *thrombospondin*) at 24 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. We also showed that p38<sup>MAPK</sup> is involved in the overexpression of *matrix metalloproteinases-2* and *-14* (MMP-2 and MMP-14) at 72 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. If confirmed at protein level, these results could explain how p38<sup>MAPK</sup> participates in morphological changes observed during the establishment of premature senescence induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in hTERT cells. We also observed that the overexpression of several *Insulin-like Growth Factor Binding Proteins* (IGFBP-2, IGFBP-3 and IGFBP-5) at 72 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress was less important in presence of SB203580. Overexpression of IGFBP-3 has recently been shown to be involved in the appearance of SA  $\beta$ -gal activity and growth arrest of WI-38 HDFs in premature senescence induced by ethanol

and *t*-BHP [61]. p38<sup>MAPK</sup> also upregulates two important anti-apoptotic factors (Bcl-x and Interleukin 11) and two genes coding for antioxidant proteins (glutathione peroxidase and anti-oxidant protein 2) which could explain why cells remained alive after stress.

Although the cells treated with SB203580 failed to develop a senescent phenotype, they were growth arrested. Indeed, the low level of [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation, the down-regulation of genes involved in DNA synthesis and cell cycle regulation and the overexpression of p21<sup>WAF-1</sup> were not disturbed by p38<sup>MAPK</sup> inhibitor or p38<sup>MAPK</sup> siRNA after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. This suggests that p38<sup>MAPK</sup> is not involved in stress-induced growth arrest in IMR-90 hTERT HDFs.

In conclusion, this work demonstrates the role of p38<sup>MAPK</sup> in the establishment of premature senescence induced in HDFs expressing telomerase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. We showed that p38<sup>MAPK</sup> is implicated in SA β-gal activity and expression of several senescence and stress-related genes in IMR-90 hTERT HDFs undergoing SIPS, but did not contribute to the cell cycle arrest. These data support the previous idea that the growth arrest and senescent phenotype are somehow distinct processes [62].

### Acknowledgments

S. Zdanov is a recipient of the FRIA, Belgium. O. Toussaint and F. Debacq-Chainiaux are respectively Research Assistant and Research Associate of the FNRS, Belgium. We acknowledge the Région Wallonne/FSE First-Europe projects "Arrayage", "CosmUV" and First-DEI project "Cosmet-X". We acknowledge the Région Wallonne "Réseaux II, Senegene" project, and Nanotoxico project. We also thank the European Commission (Geha Project, LSHM-CT-2004-503270; Link-Age Project, LSHM-CT-2005-523866).

### References

1. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1961. **25**: p. 585-621.
2. Campisi, J., et al., *Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection*. Exp Gerontol, 2001. **36**(10): p. 1619-37.
3. Baur, J.A., et al., *Telomere position effect in human cells*. Science, 2001. **292**(5524): p. 2075-7.
4. Itahana, K., G. Dimri, and J. Campisi, *Regulation of cellular senescence by p53*. Eur J Biochem, 2001. **268**(10): p. 2784-91.

5. Ramirez, P.T., et al., *Expression of cell-cycle mediators in ovarian cancer cells after transfection with p16(INK4a), p21(WAF1/Cip-1), and p53*. *Gynecol Oncol*, 2001. **83**(3): p. 543-8.
6. von Zglinicki, T., A. Burkle, and T.B. Kirkwood, *Stress, DNA damage and ageing -- an integrative approach*. *Exp Gerontol*, 2001. **36**(7): p. 1049-62.
7. Bodnar, A.G., et al., *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells*. *Science*, 1998. **279**(5349): p. 349-52.
8. Brack, C., et al., *EMBO WORKSHOP REPORT: Molecular and cellular gerontology Serpiano, Switzerland, September 18-22, 1999*. *Embo J*, 2000. **19**(9): p. 1929-34.
9. Chen, Q. and B.N. Ames, *Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(10): p. 4130-4.
10. Fripiat, C., et al., *Subcytotoxic H2O2 stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(4): p. 2531-7.
11. Dumont, P., et al., *Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast*. *Free Radic Biol Med*, 2000. **28**(3): p. 361-73.
12. Pascal, T., et al., *Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays*. *FEBS Lett*, 2005. **579**(17): p. 3651-9.
13. Debacq-Chainiaux, F., et al., *Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 4): p. 743-58.
14. Bayreuther, K., et al., *Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(14): p. 5112-6.
15. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
16. Dumont, P., et al., *Growth kinetics rather than stress accelerate telomere shortening in cultures of human diploid fibroblasts in oxidative stress-induced premature senescence*. *FEBS Lett*, 2001. **502**(3): p. 109-12.
17. von Zglinicki, T., *Oxidative stress shortens telomeres*. *Trends Biochem Sci*, 2002. **27**(7): p. 339-44.
18. de Magalhaes, J.P., et al., *Stress-induced premature senescence in BJ and hTERT-BJ1 human foreskin fibroblasts*. *FEBS Lett*, 2002. **523**(1-3): p. 157-62.
19. Gorbunova, V., A. Seluanov, and O.M. Pereira-Smith, *Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human*

- fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis.* J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38540-9.
20. Fripiat, C., et al., *Signal transduction in H2O2-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts.* Free Radic Biol Med, 2002. **33**(10): p. 1334-46.
  21. de Magalhaes, J.P., et al., *Gene expression and regulation in H2O2-induced premature senescence of human foreskin fibroblasts expressing or not telomerase.* Exp Gerontol, 2004. **39**(9): p. 1379-89.
  22. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
  23. Renard, P., et al., *Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NFkappaB.* Nucleic Acids Res, 2001. **29**(4): p. E21.
  24. Salmon, M., et al., *Role of the PLA2-independent peroxiredoxin VI activity in the survival of immortalized fibroblasts exposed to cytotoxic oxidative stress.* FEBS Lett, 2004. **557**(1-3): p. 26-32.
  25. Chen, Q.M., V.C. Tu, and J. Liu, *Measurements of hydrogen peroxide induced premature senescence: senescence-associated beta-galactosidase and DNA synthesis index in human diploid fibroblasts with down-regulated p53 or Rb.* Biogerontology, 2000. **1**(4): p. 335-9.
  26. Chen, Q.M., et al., *Molecular analysis of H2O2-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication.* Biochem J, 1998. **332** (Pt 1): p. 43-50.
  27. Park, J.S., et al., *Functional inactivation of p73, a homolog of p53 tumor suppressor protein, by human papillomavirus E6 proteins.* Int J Cancer, 2001. **91**(6): p. 822-7.
  28. Zimmermann, H., et al., *The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300.* J Virol, 1999. **73**(8): p. 6209-19.
  29. Ronco, L.V., et al., *Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity.* Genes Dev, 1998. **12**(13): p. 2061-72.
  30. Veldman, T., et al., *Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8211-6.
  31. Buckbinder, L., et al., *Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53.* Nature, 1995. **377**(6550): p. 646-9.
  32. Caroni, P. and C. Schneider, *Signaling by insulin-like growth factors in paralyzed skeletal muscle: rapid induction of IGF1 expression in muscle fibers and prevention of*



- interstitial cell proliferation by IGF-BP5 and IGF-BP4.* J Neurosci, 1994. **14**(5 Pt 2): p. 3378-88.
33. Guyton, K.Z., Q. Xu, and N.J. Holbrook, *Induction of the mammalian stress response gene GADD153 by oxidative stress: role of AP-1 element.* Biochem J, 1996. **314** (Pt 2): p. 547-54.
  34. Campisi, J., *The biology of replicative senescence.* Eur J Cancer, 1997. **33**(5): p. 703-9.
  35. Sternlicht, M.D. and Z. Werb, *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 463-516.
  36. Kagedal, K., U. Johansson, and K. Ollinger, *The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress.* Faseb J, 2001. **15**(9): p. 1592-4.
  37. Waxman, A.B., et al., *Interleukin-11 and interleukin-6 protect cultured human endothelial cells from H2O2-induced cell death.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **29**(4): p. 513-22.
  38. Kroemer, G., et al., *The biochemistry of programmed cell death.* Faseb J, 1995. **9**(13): p. 1277-87.
  39. Griendling, K.K., et al., *Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(10): p. 2175-83.
  40. Grethe, S., et al., *p38 MAPK mediates TNF-induced apoptosis in endothelial cells via phosphorylation and downregulation of Bcl-x(L).* Exp Cell Res, 2004. **298**(2): p. 632-42.
  41. Bamba, S., et al., *Regulation of IL-11 expression in intestinal myofibroblasts: role of c-Jun AP-1- and MAPK-dependent pathways.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(3): p. G529-38.
  42. Chowdhury, I. and B. Chaqour, *Regulation of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) gene transcription and mRNA stability in smooth muscle cells. Involvement of RhoA GTPase and p38 MAP kinase and sensitivity to actin dynamics.* Eur J Biochem, 2004. **271**(22): p. 4436-50.
  43. Martin, J.L., S.M. Weenink, and R.C. Baxter, *Insulin-like growth factor-binding protein-3 potentiates epidermal growth factor action in MCF-10A mammary epithelial cells. Involvement of p44/42 and p38 mitogen-activated protein kinases.* J Biol Chem, 2003. **278**(5): p. 2969-76.
  44. Kuemmerle, J.F. and H. Zhou, *Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) stimulates growth and IGF-I secretion in human intestinal smooth muscle by Ras-dependent activation of p38 MAP kinase and Erk1/2 pathways.* J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20563-71.

45. Ruhul Amin, A.R., et al., *SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2 regulates concanavalin A-dependent secretion and activation of matrix metalloproteinase 2 via the extracellular signal-regulated kinase and p38 pathways.* Cancer Res, 2003. **63**(19): p. 6334-9.
46. Ingram, J.L., et al., *Vanadium-induced HB-EGF expression in human lung fibroblasts is oxidant dependent and requires MAP kinases.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **284**(5): p. L774-82.
47. Montero, L. and Y. Nagamine, *Regulation by p38 mitogen-activated protein kinase of adenylylate- and uridylylate-rich element-mediated urokinase-type plasminogen activator (uPA) messenger RNA stability and uPA-dependent in vitro cell invasion.* Cancer Res, 1999. **59**(20): p. 5286-93.
48. Nakagawa, T., et al., *Role of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases in the regulation of thrombospondin-1 by TGF-beta1 in rat proximal tubular cells and mouse fibroblasts.* J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(4): p. 899-904.
49. Oren, M., et al., *Regulation of p53: intricate loops and delicate balances.* Ann N Y Acad Sci, 2002. **973**: p. 374-83.
50. Okamoto, K., et al., *Cyclin G recruits PP2A to dephosphorylate Mdm2.* Mol Cell, 2002. **9**(4): p. 761-71.
51. Han, J.A., et al., *P53-mediated induction of Cox-2 counteracts p53- or genotoxic stress-induced apoptosis.* Embo J, 2002. **21**(21): p. 5635-44.
52. Perrault, S.D., P.J. Hornsby, and D.H. Betts, *Global gene expression response to telomerase in bovine adrenocortical cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **335**(3): p. 925-36.
53. Elkak, A.E., et al., *Is telomerase reactivation associated with the down-regulation of TGF beta receptor-II expression in human breast cancer?* Cancer Cell Int, 2003. **3**(1): p. 9.
54. Yang, H., et al., *Autocrine transforming growth factor beta suppresses telomerase activity and transcription of human telomerase reverse transcriptase in human cancer cells.* Cell Growth Differ, 2001. **12**(2): p. 119-27.
55. Rama, S., Y. Suresh, and A.J. Rao, *Regulation of telomerase during human placental differentiation: a role for TGFbeta1.* Mol Cell Endocrinol, 2001. **182**(2): p. 233-48.
56. Zhao, H., et al., *Effects on telomerase activity and associated-protein of hRPE cells by TGF-beta 1.* Yan Ke Xue Bao, 2003. **19**(1): p. 60-4.
57. Lindkvist, A., et al., *Differential effects of TGF-beta1 on telomerase activity in thyroid carcinoma cell lines.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(3): p. 1625-33.

58. Buckley, S., et al., *BMP4 signaling induces senescence and modulates the oncogenic phenotype of A549 lung adenocarcinoma cells*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. **286**(1): p. L81-6.
59. Zdanov, S., J. Remacle, and O. Toussaint, *Increase production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as premature senescence establishes in human fibroblasts after a short sublethal exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*. in press in NYAS, 2005.
60. Haq, R., et al., *Constitutive p38HOG mitogen-activated protein kinase activation induces permanent cell cycle arrest and senescence*. *Cancer Res*, 2002. **62**(17): p. 5076-82.
61. Pascal, T., et al., *Accumulation of DNA double strand-breaks and role of IGFBP-3 in stress-induced premature senescence*. *Aging cells*, 2005.
62. Wang, Y., A. Meng, and D. Zhou, *Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase uncouples H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescent phenotype and cell cycle arrest in normal human diploid fibroblasts*. *Exp Cell Res*, 2004. **298**(1): p. 188-96.

**Manuscrit 2 : Exposure of human fibroblasts to subcytotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress triggers premature senescence through a Cyclooxygenase-2 dependent signaling pathway**

**(soumis dans le journal "Free Radical Biology & Medicine")**

Dans le cadre de la sénescence induite prématurément par les stress, la cyclooxygénase 2 nous a intéressé pour plusieurs raisons dont, premièrement, son effet anti-prolifératif. En effet, la surexpression de COX-2 induit un arrêt de prolifération chez des cellules mésangiales (Zahner *et al.*, 2002). Deuxièmement, des cellules épithéliales surexprimant COX-2 deviennent résistantes à l'apoptose en augmentant leur niveau de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique (Tsuji *et al.*, 1995). COX-2, outre son implication dans le processus inflammatoire, présente donc des caractéristiques anti-prolifératives et anti-apoptotiques que l'on retrouve chez les cellules en SIPS et en sénescence réplivative. Troisièmement, il a été établi que des fibroblastes de derme surexprimant le facteur de transcription c-Rel, entraînent dans un état de sénescence prématurée suite à la surexpression subséquente de COX-2 (Bernard *et al.*, 2001). D'autre part, de récents travaux montrent que l'inhibition de COX-2 par l'inhibiteur chimique spécifique NS-398, diffère l'entrée des fibroblastes en sénescence réplivative (Han *et al.*, 2004). Toutes ces raisons nous ont poussé à étudier le rôle de COX-2 dans l'apparition des biomarqueurs de la SIPS.

**Niveau d'expression de COX-2 en SIPS**

Nous avons déterminé le niveau d'expression de COX-2 au cours du temps après exposition de fibroblastes IMR-90 hTERT à un stress subcytotoxique sous 200 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le niveau relatif d'ARNm a été mesuré par Real-Time RT-PCR alors que le niveau protéique a été déterminé par Western-blot et par immunofluorescence.

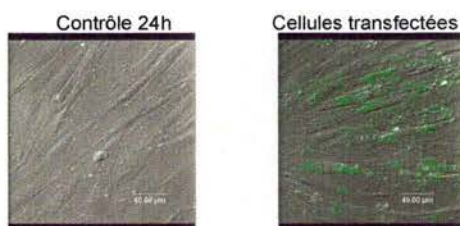
Afin de mesurer l'activité biochimique de COX-2 dans notre modèle, nous avons dosé la production de prostaglandine E2 (PGE<sub>2</sub>) libérée dans le milieu extracellulaire à différents temps, chez les cellules en SIPS par rapport aux cellules contrôles, par la technique ELISA.

**Inhibition de COX-2 et apparition des différents biomarqueurs de la SIPS**

Etant donné que le niveau de COX-2 était augmenté dans nos conditions de stress, nous avons étudié le rôle joué par COX-2 dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence suite à l'inhibition de COX-2 chez les fibroblastes IMR-90 hTERT exposés à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dans ce

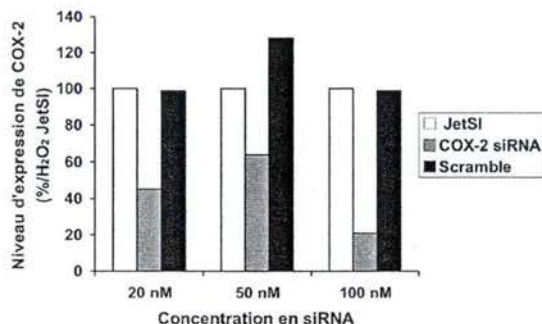
but, deux approches techniques ont été privilégiées. D'une part, nous avons incubé les FHDs IMR-90 hTERT avec un inhibiteur spécifique de COX-2 (NS-398) avant, pendant et après que les cellules aient été soumises à un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le NS-398 (ou N-(2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl) methanesulphonamide) présente une sélectivité cent fois plus élevée envers la COX-2 par rapport à la COX-1 (Futaki *et al.*, 1994). En effet, cette molécule inhibe COX-2 à un IC<sub>50</sub> de 3,8 µM alors qu'il n'a aucun effet sur l'activité de la COX-1 à une concentration de 100 µM (Futaki *et al.*, 1994). Cet inhibiteur inactive COX-2 suivant un mode irréversible et dépendant du temps (Ouellet & Percival., 1995) (Selinsky *et al.*, 2001). Ce mode d'inhibition implique d'abord un mode de liaison réversible qui progresse ensuite, avec le temps vers un mode irréversible. Dans un premier temps, l'inhibiteur se lie dans une cavité hydrophobe située dans le domaine de liaison membranaire de la COX-2 et empêche ainsi la migration de l'acide arachidonique vers le site actif de l'enzyme. Cette étape constitue le mode de liaison rapide et réversible. Ensuite, l'inhibiteur va perturber un réseau de ponts hydrogène impliquant l'Arg 120, la Tyr 355 et l'Arg 513. Ce réseau s'apparente à une porte régulant les entrées et sorties des ligands au sein du site actif cyclooxygénase. Une fois que l'inhibiteur atteint le site actif, il forme un complexe irréversible avec l'enzyme. Cette seconde étape constitue le mode d'inhibition dépendant du temps. Le NS-398, en inhibant le site actif cyclooxygénase de la COX-2, empêche donc la production de prostanoïdes.

D'autre part, nous avons inhibé, de manière transitoire, l'expression de COX-2 par l'utilisation d'ARN interférants. Cette technique nécessite quelques mises au point. Dans un premier temps, nous avons testé la transfection des fibroblastes IMR-90 hTERT par le JetSI (Eurogentec, Belgique), un vecteur de transfection lipidique cationique. Afin de déterminer le taux de transfection de nos cellules, nous avons marqué les siRNA avec de la fluorescéine avant de transfecter nos cellules. La fluorescence émise par les cellules transfectées a ensuite été détectée au microscope confocal après 24 h de transfection. Nous avons constaté que plus de 90% de la population cellulaire a été transfectée par le siRNA complexé au JetSI (Figure 18).



**Figure 18:** Visualisation au microscope confocal de fibroblastes IMR-90 hTERT transfectés en utilisant le JetSI. Les siRNA ont été préalablement marqués à la fluorescéine et les cellules sont observées 24 h après transfection.

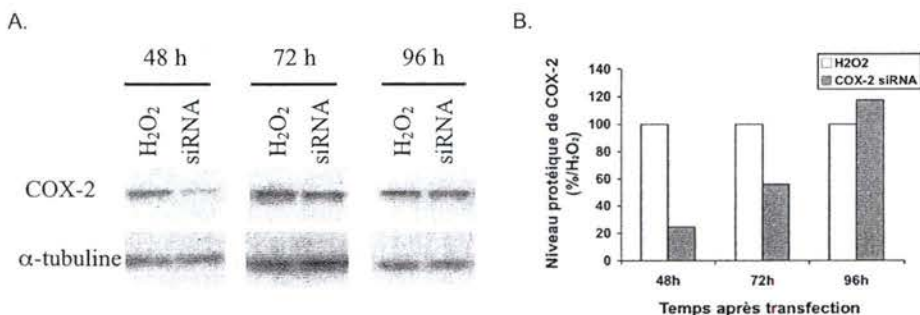
Nous avons ensuite recherché une concentration en siRNA qui induisait une inhibition maximale de l'expression de COX-2 dans les cellules IMR-90 hTERT. Pour ce faire, nous avons déterminé le niveau d'ARNm de COX-2 par Real Time RT-PCR, 48 h après la transfection des fibroblastes IMR-90 hTERT avec des concentrations croissantes en siRNA (20, 50 et 100nM). Nous avons constaté une diminution du niveau d'ARNm de COX-2 plus importante à une concentration en siRNA de 100 nM (figure 19).



**Figure 19 :** Effet du siRNA dirigé contre COX-2 sur le niveau d'expression de COX-2. Les fibroblastes IMR-90 hTERT ont été transfectés en utilisant du JetSI pendant 4 h avec des concentrations croissantes de siRNA. Vingt quatre heures après la transfection, les cellules ont été soumises à un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le niveau relatif d'ARNm de COX-2 a été déterminé par Real Time RT-PCR 48 h après la transfection (= 24 h après le stress).

La dernière mise au point a consisté à déterminer la durée pendant laquelle on observe une inhibition de l'expression de COX-2 par le siRNA. Nous avons donc analysé l'abondance de la protéine COX-2 par Western-blot à différents temps après la transfection des cellules IMR-90 hTERT avec une concentration en siRNA de 100 nM. Nous constatons que l'expression de COX-2 est complètement inhibée par le siRNA après 48 h de transfection mais que l'effet est perdu à 96 h. L'expression de COX-2 est partiellement détectée 72 h après la transfection des cellules avec le siRNA. L'effet inhibiteur du siRNA sur l'expression de la protéine COX-2 est donc transitoire et prend fin entre 72 et 96 h après la transfection des fibroblastes IMR-90 hTERT (Figure 20).

En conclusion, nous avons montré que l'utilisation du JetSI comme agent facilitant la transfection assure un taux de transfection de plus de 90 % et que l'inhibition de l'expression de COX-2 par le siRNA à 100 nM est observée pendant au moins 48 h après la transfection des cellules.



**Figure 20:** Recherche de la durée d'inhibition de l'expression de la protéine COX-2 par le siRNA. Les fibroblastes IMR-90 hTERT ont été transfectés en utilisant le JetSI avec le siRNA à 100 nM et l'abondance de la protéine COX-2 a été détectée par Western-blot sur 30 µg de lysats cellulaires isolés à 48, 72 et 96 h après la transfection des cellules avec le siRNA.

A. Autoradiographies de différentes bandes obtenues par Western-blot

B. Analyse du niveau protéique de COX-2. Les résultats sont normalisés en utilisant l' $\alpha$ -tubuline comme référence.

#### Contrôle du niveau d'expression de COX-2 par p38<sup>MAPK</sup>

Chen et son équipe ont montré que des kératinocytes soumis à un stress sous UVB surexpriment COX-2 *via* un mécanisme dépendant d'ERK et de p38<sup>MAPK</sup> (Chen *et al.*, 2001). Nous avons voulu voir si l'activation de la voie de p38<sup>MAPK</sup> lors de la sénescence induite sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut conduire à une surexpression de COX-2 chez des fibroblastes ayant subi un stress avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dans ce but, nous avons étudié le niveau d'ARNm de COX-2 après un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence ou non d'un inhibiteur spécifique de p38<sup>MAPK</sup>, le SB203580.

#### Implication des facteurs de transcription ATF-2 et p53 en SIPS

L'activation de p38<sup>MAPK</sup> par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut activer à son tour les facteurs de transcription ATF-2 et p53 (Mielke *et al.*, 2000). Nous avons donc voulu savoir si une activation de ces facteurs de transcription était bien responsable de la surexpression de COX-2 et de l'apparition des biomarqueurs de la SIPS. Nous avons, dans un premier temps, étudié l'activité de liaison à l'ADN d'ATF-2 et de p53 à différents temps après un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par une technique colorimétrique. Ensuite, nous avons inhibé, de manière transitoire, l'expression d'ATF-2 et de p53 par l'utilisation d'ARN interférants. Les siRNA dirigés contre ATF-2 et p53 ont été utilisés à une concentration de 50 nM. L'inhibition de l'expression d'ATF-2 et de p53 est observée pendant au moins 48 h après la transfection des cellules.

**Exposure of human fibroblasts to subcytotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress triggers premature senescence through a cyclooxygenase-2 dependent signaling pathway**

Stéphanie Zdanov<sup>a</sup>, Jérôme Marijsse<sup>a</sup>, Florence Debacq-Chainiaux<sup>a</sup>, Coralie Bastin<sup>a</sup>,  
Martine Raes<sup>a</sup>, José Remacle<sup>a</sup>, Olivier Toussaint<sup>ab</sup>

<sup>a</sup> *Research Unit on Cellular Biology (URBC), University of Namur (FUNDP), Rue de Bruxelles, 61 B-5000 Namur, Belgium.*

<sup>b</sup> *Corresponding author: O. Toussaint, Research Unit on Cellular Biology (URBC), University of Namur (FUNDP), Rue de Bruxelles, 61 B-5000 Namur, Belgium.*

*Telephone: +32-81-724132 ; Fax: +32-81-724135 ;*

*E-mail address : [olivier.toussaint@fundp.ac.be](mailto:olivier.toussaint@fundp.ac.be)*

**Running title:** Cyclooxygenase-2 and Stress-induced Premature Senescence



## ABSTRACT

We report that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced premature senescence of IMR-90 hTERT human diploid fibroblasts leads to up-regulation of the inducible cyclooxygenase 2 enzyme (COX-2) and subsequent release of prostaglandin E2. Dissection of the signaling pathways revealed that p38<sup>MAPK</sup> activation and increased DNA binding activity of ATF-2 and p53 mediate COX-2 overexpression. Indeed, using specific p38<sup>MAPK</sup> chemical inhibitor and small interfering RNA specifically targeting ATF-2 and p53, COX-2 expression was abrogated in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stressed cells. In this work, we also demonstrated that selective inhibition of COX-2 by specific siRNA or specific inhibitor, sharply attenuated the percentage of senescent-associated β-galactosidase activity positive cells and attenuated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell cycle arrest. Taken together, these findings clearly indicate that overexpression of COX-2 in IMR-90 hTERT HDFs exposed to a sublethal concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates the appearance of two main biomarkers of premature senescence.

**Keywords :** senescence, oxidative stress, hydrogen peroxide, fibroblasts, cyclooxygenase 2, prostaglandin E2

## List of Abbreviations

ATF-2, activating transcription factor-2; COX-2, cyclooxygenase 2; FCS, fetal calf serum; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; HDFs, human diploid fibroblasts; MAPK, mitogen activated protein kinase; NF-κB, nuclear factor-kappa B; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E2; ROS, reactive oxygen species; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SA β-gal, Senescence associated β-galactosidase; SIPS, Stress induced premature senescence; s.d., standard deviation; siRNA, small interfering RNA

## INTRODUCTION

Most cells cannot divide indefinitely due to replicative senescence. Cellular senescence appears to be a fundamental feature of somatic cells, with the exception of tumor cells and stem cells. Senescent cells display a large and flat morphology, show increased Senescence-Associated  $\beta$ -galactosidase activity (SA  $\beta$ -gal) [1], lose responsiveness to mitogenic hormones [2] and enter into irreversible growth arrest. Stressful conditions including exposure to hyperoxia [3], radioactivity [4], *tert*-butylhydroperoxide [5], ethanol [6], UVB [7], and  $H_2O_2$  [8], can trigger premature senescence. Cells in stress-induced premature senescence (SIPS) remain alive for months [5, 9] and display several features of replicative senescence, among which irreversible growth arrest and SA  $\beta$ -gal.

Cyclooxygenases (COX) catalyze the conversion of arachidonic acid and molecular oxygen into prostaglandin (PG)  $H_2$ , the committed step in prostanoid synthesis including  $PGE_2$  [10]. The two main mammalian isozymes of COX are encoded by distinct genes and exhibit structural and enzymatic similarities. COX-1 is constitutively expressed in many mammalian tissues. In contrast, COX-2 is expressed at very low levels under basal condition and is rapidly induced in response to growth factors [11], oncogenes products [12], various cytokines [13], g-irradiation [14], and hypertonic agents [15]. Recently, a third distinct isozyme, COX-3, as well as two smaller COX-1-derived proteins, have been described [16]. It has been reported that NS-398, a selective COX-2 inhibitor, can prevent cell cycle arrest of fibroblasts [17]. COX-2 is up-regulated in aged cells [18] [19].

In this study, we found that COX-2 was overexpressed in  $H_2O_2$ -induced premature senescence of human diploid IMR-90 fibroblasts (HDFs) immortalized with the catalytic subunit of telomerase (hTERT). Our aim was to investigate the role of COX-2 overexpression in the establishment of  $H_2O_2$ -induced premature senescence of these cells. For this purpose, we used specific COX-2 inhibitor and small interfering RNA (siRNA) technology to study whether inhibition of COX-2 affects the appearance of SA  $\beta$ -gal activity and growth arrest. We also studied the signalling pathways responsible for  $H_2O_2$ -induced COX-2 overexpression

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Cell culture, exposure to $H_2O_2$ , SA $\beta$ -gal activity and [ $^3H$ ]-thymidine incorporation*

Human fetal lung IMR-90 fibroblasts immortalized with the catalytic subunit of telomerase, (hTERT) were a kind gift from Dr. J. G. Valles, Ludwig Institute for Cancer Research, UK. IMR-90 hTERT HDFs were grown in MEM (Invitrogen, UK) supplemented with 10% fetal calf

serum (FCS) (Invitrogen, UK). hTERT IMR-90 HDFs at half confluence were exposed for 2 h to 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (Merck, Germany) diluted in MEM + 10% FCS. After the stress, cells were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and given fresh MEM + 10% FCS. Control cultures followed the same schedule of medium changes without  $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment. The cells were stimulated with 1 ng/ml of  $\text{PGE}_2$  (Alexis, Belgium) which was diluted in MEM + 10% FCS. COX-2 was inhibited using a specific inhibitor, NS-398 (Calbiochem, UK) diluted at 10  $\mu\text{M}$  in MEM + 10% FCS.  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  was inhibited using a specific inhibitor, SB203580 (Alexis Biochemicals, Belgium) diluted at 20  $\mu\text{M}$  in MEM +10% FCS.

At 48 h after the stress, the cells were seeded in 35 mm culture dishes (Falcon, UK) at a density of 700 cells/ $\text{cm}^2$ . SA  $\beta$ -gal was determined 24 h later as described by Dimri *et al.* The population of SA  $\beta$ -gal positive cells was determined by counting 400 cells per dish. The results were given as percentage of the total number of cells counted in each dish and were expressed as mean of triplicates  $\pm$  s.d..

At 24 h after the stress, the cells were seeded in 24-well plates (Cell Cult, UK) at a density of 10,000 cells/well. 1  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]-thymidine (specific activity: 2 Ci/mmol, Du Pont, NEN, USA) was added to the culture medium for 48 h. The incorporated radioactivity was quantified by a scintillation counter (Packard Instrument Company, USA). Results were expressed as mean values  $\pm$  standard deviation (s.d.).

### **Real Time RT-PCR**

Total RNA was extracted from three independent cultures using Total RNAgent extraction kit (Promega, USA). Total RNA (2  $\mu\text{g}$ ) was reversed transcribed using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, UK). Gene specific primers (Table 1) were designed (Primer Express 1.5 Software, PE Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Amplification reaction assays contained 1x SYBR Green PCR Mastermix and primers at optimal concentration (Applied Biosystems, The Netherlands). A hot start at 95°C for 5 minutes was followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 65°C for 1 minute using the ABI PRISM 7000 SDS thermal cycler (Applied Biosystems, The Netherlands). Fluorescence emission was detected for each PCR cycle and the threshold cycle (Ct) values were determined. Values were reported as average of triplicate analysis  $\pm$  s.d..

Genes	Positions (bp)	Sequences
<i>ATF-2</i>	832-858	5'-TTCACCAACCTCAAGTACTGTAATCAC-3'
	920-943	5'-CATGGTTGTCCATTAGGAAGATG-3'
<i>COX-2</i>	111-136	5'-ATTAGCCTGAATGTGCCATAAGACT-3'
	217-230	5'-ACCCACAGTGCITGACACAGAAAT-3'
<i>GAPDH</i>	942-963	5'-ACC CAC TCC TCC ACC TTT GAC-3'
	1033-1053	5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA-3'
<i>p53</i>	1209-1229	5'-AAG AAA CCA CTG GAT GGA GAA-3'
	1263-1283	5'-CAG CTC TCG GAA CAT CTC GAA-3'

**Table 1** Primers used for Real-Time RT-PCR

### **Gene silencing experiments**

Small interfering RNA (siRNA) transfection experiments against COX-2, ATF-2 and p53 were performed using double-stranded RNA synthesized by Dharmacon (siGENOME SMARTpool, Dharmacon, USA). A non-targeting siRNA (Eurogentec, Belgium) was used as control. IMR-90 hTERT cells were transfected with JetSI (Eurogentec, Belgium) at a ratio of 3  $\mu\text{l}/\mu\text{g}$  of siRNA according to the manufacturer's instructions. Transfection efficiency in cells plated on cover-slips was determined using fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled siRNA and evaluated to 90-95% after 24 h by cell counting by a confocal microscopy (Leica, Germany). IMR-90 hTERT cells were plated in 25  $\text{cm}^2$  flasks at 50% confluence 24 h before transfection with siRNA or incubated with JetSI alone. At 24 h after transfection, cells were stressed for 2 h with 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . At 24 h after the stress, extraction of total RNA and Real-Time RT-PCR were performed.

### **Immunofluorescence staining and confocal microscopy**

IMR-90 hTERT HDFs were seeded at 1,000 cells/ $\text{cm}^2$  in MEM + 10% FCS on glass coverslides at 4 h after  $\text{H}_2\text{O}_2$  stress. At 24 h after the stress, the cells were fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde (Merck, Germany) in PBS before three washings with PBS. Cells were permeabilized in PBS + 1% Triton X-100 (Sigma, USA) and then washed twice with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma, USA). The specific rabbit antibody raised against COX-2 (1:500 dilution Santa-Cruz, USA) was added overnight at 4°C in a wet room. The cells were washed twice with PBS + 1% BSA before adding the specific Alexa Fluor-568-conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:1000 dilution, Molecular Probes, USA) diluted in PBS + 1% for 1 h in a wet room at room temperature. The cells were washed three

times in PBS + 1% BSA. To visualize the nucleus, the cells were incubated for 35 minutes at room temperature with TO-PRO-3 (1:80 dilution, Molecular Probes, USA) in PBS + 2 mg/ml RNase (ICN, USA) The coverslips were mounted in Mowiol (Sigma, USA) and observed with a TCS confocal microscope (Leica, Germany) using a constant multiplier.

### ***Western-blot analysis***

Cells were washed once with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed on ice (10 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate and anti-protease complete (Roche, Germany)). After homogenization of the lysates, 30 µg of proteins were electrophoresed on Bis-Tris Gel NuPage 10% (Invitrogen, UK). The proteins were transferred on hybond-P membrane (Amersham Biosciences, Sweden). We used anti-COX-2 antibody (Cayman, UK), anti-phosphorylated-p38<sup>MAPK</sup>, anti-p38<sup>MAPK</sup> (#9211, Cell Signaling Technology, USA) anti- $\alpha$ -tubulin antibody (AM2495-11, Innogenex, USA) and horseradish peroxidase-linked secondary antibodies (Amersham Biosciences, Sweden). The bands were visualized after incubation of chemiluminescent substrates (ECL Advance Detection Kit, Amersham Biosciences, Sweden). Semi-quantification was obtained with the ImageMaster TotalLab software (Pharmacia, Sweden).

### ***PGE<sub>2</sub> measurement***

At the indicated time points after stress, culture medium was collected, dead cells were removed by centrifugation, and PGE<sub>2</sub> concentrations were assayed with the PGE<sub>2</sub> ELISA kit (R&D Systems, UK) according to the manufacturer's instructions.

### ***Detection of transcription factor DNA-binding activity***

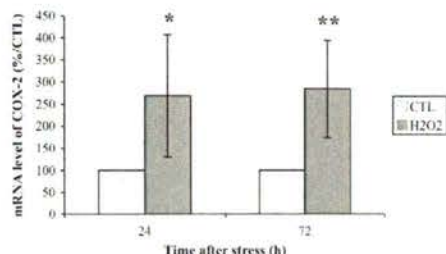
DNA-binding ELISA assays (TransAM kits, ActiveMotif, USA) were based on the use of multi-well plates coated with a cold oligonucleotide containing the consensus binding site for the transcription factor under study. The presence of the DNA-bound transcription factor was detected by specific antibodies and revealed by colorimetry. The specificity and high reproducibility of this type of assay have been previously demonstrated. This assay has also shown to be more sensitive than electrophoretic mobility shift assay [20] and has already been used in senescence-related studies [21]. Nuclear extracts were obtained, according to manufacturer's instructions, at increasing times after a single exposure of IMR-90 hTERT cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 200 µM. Values were reported as average of triplicate analysis  $\pm$  s.d..

### ***Statistical analysis***

Statistical analysis was carried out with the Student's t-test. ns, non significant ( $P > 0.05$ ); \*,  $0.05 > P > 0.01$ ; \*\*,  $0.01 > P > 0.001$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

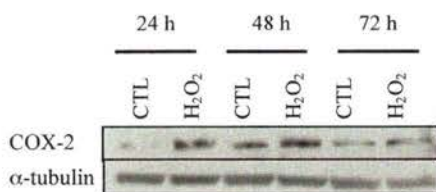
**Figure 1**

**A. COX-2 mRNA level**

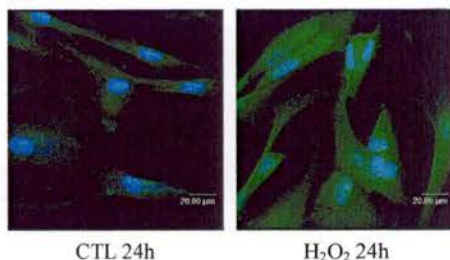


**B. COX-2 protein level**

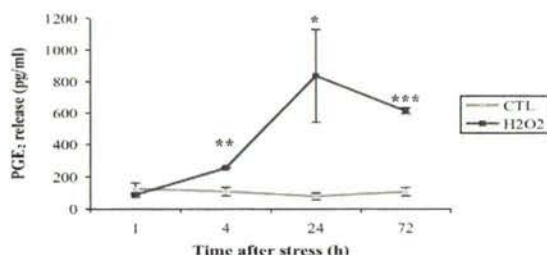
1.



2.



**C. PGE<sub>2</sub> release**



**Figure 1**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 200  $\mu$ M induces COX-2 expression and activity in IMR-90 hTERT HDFs.

(A) COX-2 mRNA level. Total RNA was extracted at 24 and 72 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. The GAPDH steady-state mRNA level was used as reference in the Real-Time RT-PCR. Results are expressed in percentage of the corresponding control as mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments.

(B) COX-2 protein level. (1) The abundance of COX-2 was determined in control or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stressed cells at 24, 48 and 72 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress.  $\alpha$ -tubulin protein was used as reference level. (2) Fluorescence micrographs of COX-2 immunostaining obtained by semi-quantitative confocal microscopy on IMR-90 hTERT HDFs. Controls : CTL COX-2 was detected using a specific anti-COX-2 antibody (green) at 24 h after stress. The nuclei were stained with TO-PRO-3 (blue).

(C) Quantitative detection of PGE<sub>2</sub> production: ELISA assays were performed on cell medium collected at various times after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. Results are expressed in percentage of the corresponding control as mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments.

## RESULTS

### Up-regulation and increased activity of cyclooxygenase-2 in prematurely senescent IMR-90 hTERT fibroblasts

IMR-90 hTERT HDFs were exposed to 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 2 h, which represents subcytotoxic conditions [22], and triggers premature senescence. In order to evaluate COX-2 relative expression level, we performed Real-Time RT-PCR on mRNA extracted at different times after stress. Compared with control cells, a 2.7 and 2.8-fold increase in the mRNA level of COX-2 was obtained, respectively at 24 and 72 h after stress (Fig.1A). As shown in Fig.1B,  $\text{H}_2\text{O}_2$  stress also promoted an important increase of COX-2 protein abundance, starting from a very low basal level. The stress-induced increased COX-2 activity was estimated using a colorimetric ELISA assay for detecting extracellular release of  $\text{PGE}_2$  over a 72 h period after the  $\text{H}_2\text{O}_2$  stress.  $\text{PGE}_2$  release was significantly higher after exposure to  $\text{H}_2\text{O}_2$  compared to the control cells. Respective 2.2-, 9.9-, and 4.1-fold increase in extracellular  $\text{PGE}_2$  concentration was obtained at 4, 24 and 72 h after stress (Fig.1C).

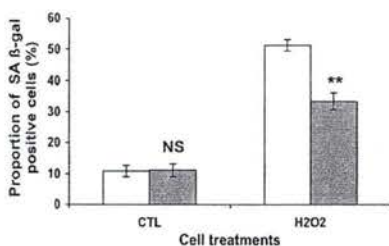
### Inhibition and down-regulation of COX-2 attenuates $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced premature senescence

We investigated whether inhibition of COX-2 activity could attenuate the establishment of  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced premature senescence in IMR-90 hTERT HDFs. The cells were incubated with a specific inhibitor of COX-2, NS-398 (10  $\mu\text{M}$ ), before, during and after exposure to  $\text{H}_2\text{O}_2$ . NS-398 inhibits the cyclooxygenase activity of the COX-2 isoenzyme and thus inhibits prostanoid synthesis [23]. The proportion of SA  $\beta$ -gal positive cells at 72 h after stress reached 51% (Fig.2A). The addition of NS-398 significantly attenuated the stress-induced increase of the proportion of SA  $\beta$ -gal positive HDFs, which remained at 33%. The proliferative potential was estimated by measuring the level of [ $^3\text{H}$ ]-thymidine incorporation into DNA at 72 h after stress. NS-398 at 10  $\mu\text{M}$  significantly moderated the sharp decrease of [ $^3\text{H}$ ]-thymidine incorporation into DNA observed after exposure to  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fig.2B). In complementary experiments, endogenous expression of COX-2 was down-regulated using small interfering RNA (siRNA) at 100 nM/L specifically targeting COX-2. Using Real Time RT-PCR analysis, we confirmed that COX-2 siRNA treatment attenuated  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced COX-2 expression by 66% at 24 h after stress (Fig.3A). Transfected nonsilencing siRNA did not affect COX-2 expression. COX-2 siRNA attenuated  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced SA  $\beta$ -gal activity compared with cells transfected with JetSi reagent alone (Fig.3B). In addition, down-regulation of COX-

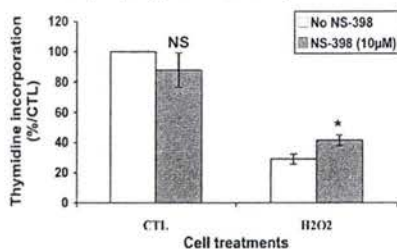


**Figure 2**

**A. SA  $\beta$ -gal activity**



**B. [ $^3$ H]-thymidine incorporation**



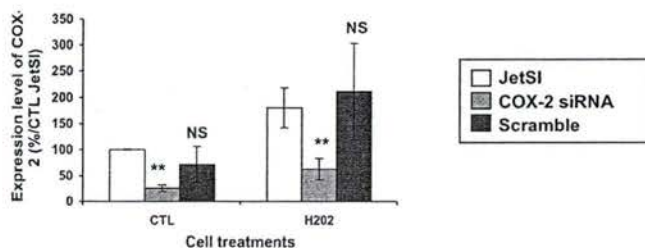
**Figure 2**

COX-2 inhibitor NS-398 attenuates the establishment of premature senescence in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stressed cells. (A) Effect of COX-2 chemical inhibitor NS-398 (10  $\mu$ M) on the percentage of IMR-90 hTERT HDFs positive for SA  $\beta$ -gal activity at 72 h after stress with 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

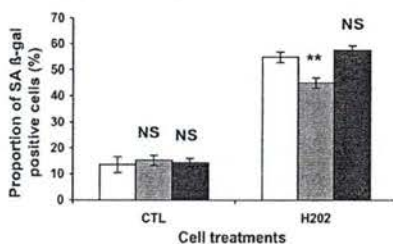
(B) Effect of COX-2 chemical inhibitor NS-398 (10  $\mu$ M) on the proliferative potential of IMR-90 hTERT HDFs exposed to a single H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. The incorporation of [ $^3$ H]-thymidine into DNA was measured between 48 and 72 h after stress. The results obtained are expressed as percentages of the cpm incorporated by the control cells. The results are given as mean  $\pm$  s.d. from three independent experiments.

**Figure 3**

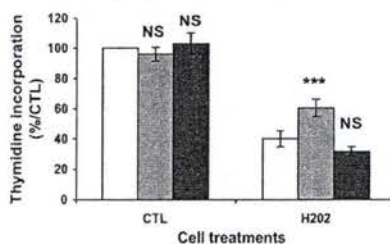
**A. COX-2 mRNA**



**B. SA  $\beta$ -gal activity**



**C. [ $^3$ H]-thymidine incorporation**



**Figure 3**

Down-regulation of COX-2 expression using specific siRNA attenuates the establishment of premature senescence in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stressed cells.

(A) Effect of COX-2-specific siRNA on COX-2 mRNA level.

(B) Effect of COX-2-specific siRNA on the percentage of IMR-90 hTERT HDFs positive for SA  $\beta$ -gal activity at 72 h after stress with 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

(C) Effect of COX-2-specific siRNA on the proliferative potential of IMR-90 hTERT HDFs exposed to a single H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. The incorporation of [ $^3$ H]-thymidine into DNA was measured between 48 and 72 h after stress. The results obtained are expressed as percentages of the cpm incorporated by the control cells. The results are given as mean  $\pm$  s.d. from three independent experiments.

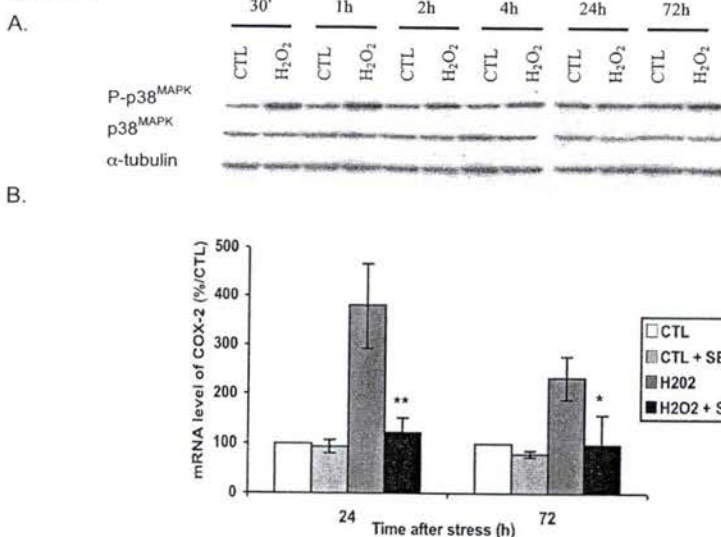
2 prevented partly the stress-induced decrease in proliferative potential (Fig.3C). p21<sup>WAF-1</sup> is an universal inhibitor of cyclin dependent kinases and causes G1 growth arrest. It is up-regulated by p53 after DNA damage and is overexpressed after a single exposure of IMR-90 HDFs to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [24]. We showed that COX-2 inhibition did not affect p21<sup>WAF-1</sup> level (data not shown) suggesting that others factors might contribute to the COX-2 mediated inhibition of proliferation.

### Signalling pathways involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced overexpression of COX-2

We previously reported a Thr180/Tyr182 phosphorylation of p38<sup>MAPK</sup> in IMR-90 hTERT HDFs at various times up to 72 h after stress [22]. This was confirmed herein Fig.4A. In order to explore the role of p38<sup>MAPK</sup> in the induction of COX-2 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence, the cells were incubated with specific inhibitor SB203580 of p38<sup>MAPK</sup> at 20  $\mu$ M before, during and after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Selective inhibition of p38<sup>MAPK</sup> abrogated the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced increase of the COX-2 mRNA level (Fig.4B). These findings are consistent with previous reports showing that activated p38<sup>MAPK</sup> can modulate COX-2 expression in various cell types [25] [26] [27].

p38<sup>MAPK</sup> can modulate gene expression by activating several transcription factors [28], including the oxidative stress-induced transcription factors NF- $\kappa$ B, ATF-2 and p53. The human *cox-2* promoter contains numerous potential binding sites for NF- $\kappa$ B and Jun/ATF [29]. In addition COX-2 induction was shown to be p53-dependent [17]. Using colorimetric ELISA assays, we showed first that the DNA-binding of NF- $\kappa$ B was not altered during the 24 h after a single H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress (data not shown). This is consistent with previous data. Indeed NF- $\kappa$ B is implicated in COX-2 induction in different cell lines, except namely human fibroblasts [30, 31]. Sublethal exposure of IMR-90 hTERT cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resulted in an increase of ATF-2 p53 DNA binding (Fig.5). The DNA-binding activity of ATF-2 raised sharply during the first 8 h after stress and then returned to the basal level (Fig.5A). p53 presented a progressive increase of its DNA-binding activity until 8 h after stress (Fig.5B). Presence of 20  $\mu$ M SB203580 prevented the increased DNA binding activity of ATF-2 and p53. This suggested that p38<sup>MAPK</sup> could induce COX-2 expression through activation of these transcription factors in IMR-90 hTERT HDFs undergoing premature senescence. In order to investigate the transcriptional role of ATF-2 and p53 in the induction of COX-2 at 24 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress, expression of ATF-2 and p53 were down-regulated using small interfering RNA (siRNA) at 50 nM/L. Using Real Time RT-PCR analysis, we confirmed that ATF-2 and p53 siRNA treatment attenuated ATF-2 and p53 mRNA level respectively by 79% and 75% in condition of stress whereas non specific siRNA had no effect (Fig.6A and 7A). We also showed that repression of ATF-2 and p53 prevented the appearance of SA  $\beta$ -

**Figure 4**

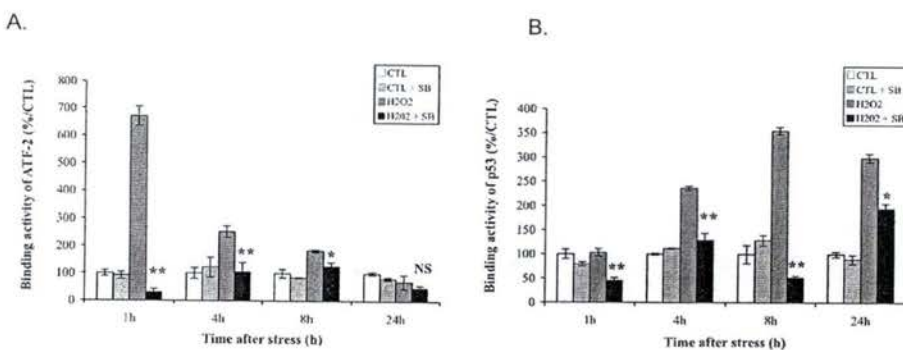


**Figure 4**

(A) Activation of p38<sup>MAPK</sup> in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stressed IMR-90 hTERT HDFs. Western-blot analysis of total p38<sup>MAPK</sup> and phosphorylated p38<sup>MAPK</sup> on Thr180/Tyr182 at 30 min, 1, 2 and 72 h after exposure of IMR-90 hTERT cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.  $\alpha$ -tubulin protein was used as reference level.

(B) Effect of p38<sup>MAPK</sup> inhibitor SB203580 (20  $\mu$ M) on the expression level of COX-2 in IMR-90 hTERT HDFs at 24 and 72 h after exposure to a single H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. Total RNA was extracted at 24 and 72 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. The *GAPDH* mRNA level was used as reference gene. The results are given as mean  $\pm$  s.d. from three independent experiments.

**Figure 5**

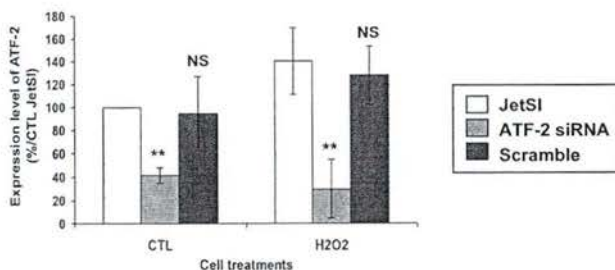


**Figure 5**

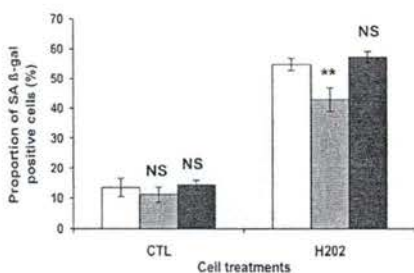
Quantitative detection of DNA binding activity of ATF-2 (A) and p53 (B). Colorimetric assays were performed on 10  $\mu$ g of nuclear proteins extracted at increasing times after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. Results are expressed in percentage of the corresponding control as mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments. White columns: control cells; grey columns: cells after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; black columns: cells after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 20  $\mu$ M SB203580

**Figure 6**

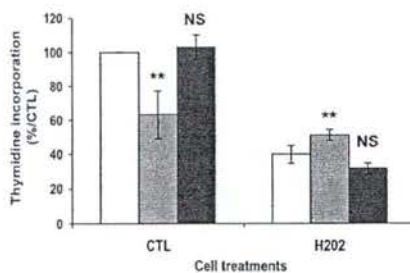
**A. ATF-2 mRNA**



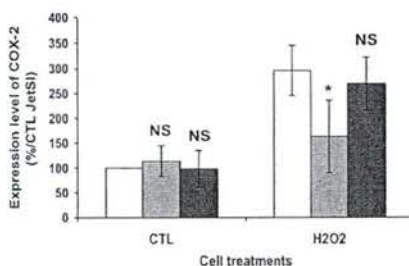
**B. SA  $\beta$ -gal activity**



**C. [ $^3$ H]-thymidine incorporation**



**D. COX-2 mRNA**



**Figure 6**

Down-regulation of ATF-2 using specific siRNA prevents COX-2 overexpression in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stressed cells.

(A) ATF-2-specific siRNA decreases ATF-2 mRNA level at 48 h after transfection.

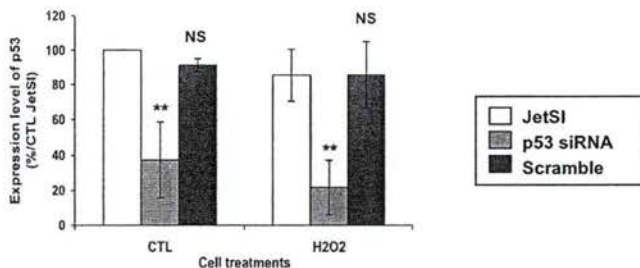
(B) ATF-2-specific siRNA decreases the percentage of IMR-90 hTERT HDFs positive for SA  $\beta$ -gal activity at 72 h after stress with 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

(C) ATF-2-specific siRNA attenuates the decrease of the proliferative potential of IMR-90 hTERT HDFs exposed to a single H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. The incorporation of [ $^3$ H]-thymidine into DNA was measured at 72 h after stress.

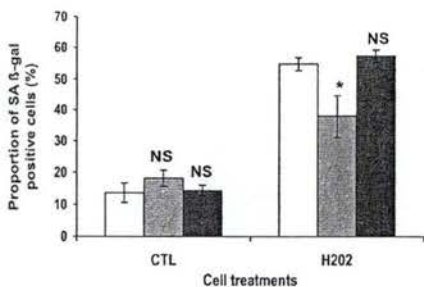
(D) Effect of ATF-2-specific siRNA on COX-2 mRNA level. IMR-90 hTERT HDFs were transfected for 4 h with 50 nM of ATF-2 siRNA or non targeting siRNA or incubated for 4 h with the transfection reagent alone (JetSi), and then stressed or not (controls, CTL) with 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Total RNA was extracted at 24 h after stress and the GAPDH mRNA level was used as reference gene. The results obtained are expressed as percentage of the steady-state mRNA level of cells treated with JetSi alone (CTL JetSi). The results are given as mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments.

**Figure 7**

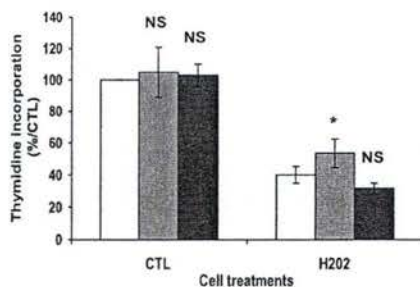
A. p53 mRNA



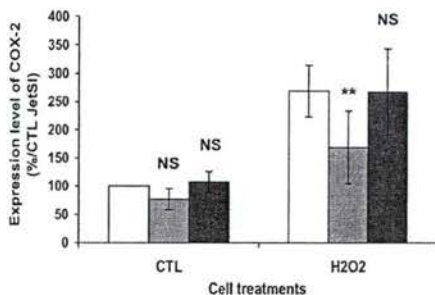
B. SA β-gal activity



C. [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation



D. COX-2 mRNA



**Figure 7**

Down-regulation of p53 using specific siRNA prevents COX-2 overexpression in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stressed cells. (A) p53-specific siRNA decreases p53 mRNA level at 48 h after transfection. (B) p53-specific siRNA decreases the percentage of IMR-90 hTERT HDFs positive for SA β-gal activity at 72 h after stress with 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (C) p53-specific siRNA attenuates the decrease of the proliferative potential of IMR-90 hTERT HDFs exposed to a single H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. The incorporation of [<sup>3</sup>H]-thymidine into DNA was measured at 72 h after stress. (D) Effect of p53-specific siRNA on COX-2 mRNA level. IMR-90 hTERT HDFs were transfected for 4 h with 50 nM of p53 siRNA or non targeting siRNA or incubated for 4 h with the transfection reagent alone (JetSi), and then stressed or not (controls, CTL) with 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Total RNA was extracted at 24 h after stress and the GAPDH mRNA level was used as reference gene. The results obtained are expressed as percentage of the steady-state mRNA level of cells treated with JetSi alone (CTL JetSi). The results are given as mean ± s.d. of three independent experiments.

gal activity and the stress-induced decrease in proliferative potential (Fig6B-C and 7B-C). COX-2 was confirmed as significantly overexpressed in stressed fibroblasts compared to the control cells (Fig.6D and 7D). In cells transfected with ATF-2-siRNA and thereafter stressed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the overexpression of COX-2 was attenuated by 45% compared to control. The p53 siRNA also interfered with the stress-induced overexpression of COX-2. Thus ATF-2 and p53 activation participate in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-triggering induction of COX-2 expression in IMR-90 hTERT HDFs.

## DISCUSSION

Acute exposure of various strains of hTERT expressing HDFs to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at sublethal concentration induces senescent morphology, SA  $\beta$ -gal and causes permanent cell cycle arrest. The mechanisms of SIPS are not yet fully understood. In the present study, we investigated the role of COX-2 in SIPS.

In addition to its role in inflammatory processes, COX-2 has been shown to regulate cell proliferation. Overexpression of COX-2 in mesangial cells induces a reduction in cell proliferation and a cell cycle arrest in the G1/S phase of the cell cycle. In the present study, we investigated the importance of COX-2 in mediating premature senescence. We demonstrate that treatment of IMR-90 hTERT with subcytotoxic concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced premature senescence and increased endogenous COX-2 expression at the transcriptional and protein level. In order to investigate whether COX-2 is a key element in promoting premature senescence, we inhibited COX-2 expression by specific siRNA or specific inhibitor NS-398. We demonstrated that COX-2 repression prevents the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced appearance of the biomarkers of senescence. Taken together, these data indicate that overexpression of COX-2 in IMR-90 hTERT HDFs undergoing SIPS is partly responsible for the appearance of SA  $\beta$ -gal activity and stress-induced cell cycle arrest. The principal function of COX-2 is to catalyze the synthesis of prostanoids like PGE<sub>2</sub>. PGE<sub>2</sub> has been reported to mediate growth arrest [32-34]. Indeed, treatment of fibroblasts with NS-398 prevents the senescence-associated increase of p53 protein. Recently, it has been reported that COX-2 interacts *in vitro* and *in vivo* with p53 and inhibits DNA damage-induced apoptosis through direct regulation of p53 function [35]. The inhibition of cell proliferation by p53 is largely due to its ability to transcriptionally activate genes that directly control cell proliferation such p21<sup>WAF-1</sup>. In this study, the p21<sup>WAF-1</sup> overexpression observed at 24 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress in IMR-90 hTERT HDFs was not attenuated by NS-398 or COX-2 siRNA suggesting that others factors might contribute to this COX-2 mediated inhibition of proliferation. In addition to growth arrest induced by PGE<sub>2</sub> release, an additional mechanism

involving DNA damage formation from COX-2 mediating lipid peroxidation has been recently proposed [36].

We also provide clues for the mechanism of stress-induced overexpression of COX-2 in IMR-90 hTERT HDFs. The expression of COX-2 can be affected by changes in p38<sup>MAPK</sup> activity [25, 37-39]. We observed an increased phosphorylation of p38<sup>MAPK</sup> in stressed IMR-90 hTERT cells. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced COX-2 overexpression was suppressed by SB203580, a specific p38<sup>MAPK</sup> inhibitor. To further elucidate the mechanism by which H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced the transcription of COX-2, we identified transcription factors that were activated by p38<sup>MAPK</sup>. Indeed, we report that induction of COX-2 by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was in part suppressed by specific ATF-2- or p53-siRNA, suggesting that ATF-2 and p53 are important for mediating the induction of COX-2 by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. p53 induces COX-2 expression in various mutant and tumor-derived cell lines [40]. ATF-2 has been shown to trigger the appearance of biomarkers of SIPS by interacting with Rb in normal IMR-90 HDFs [41]. Interestingly, the effect of SB203580 on the DNA binding activity of p53 was strongly reduced at 24 h after stress, suggesting that other factors than p38<sup>MAPK</sup> contribute in increased DNA binding of p53 at longer times after stress. Inhibitor of p38<sup>MAPK</sup> has already been shown to attenuate the growth arrest induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at times lower than 24 h in IMR-90 wild type cells [41].

Under pathological conditions, excessive amounts of reactive oxygen species (ROS) can modify proteins and signaling pathways [42]. COX-2 protein expression has been demonstrated to increase with age [18, 19]. Increased PGE<sub>2</sub> production has been implicated in the pathogenesis of several age-associated diseases, such as Alzheimer's disease [43]. Since H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence correlates with increased COX-2 expression, we can speculate that pro-inflammatory conditions leading to COX-2 overexpression could be responsible for SIPS *in vivo* in HDFs. Along this line, COX-2 transgenic mouse may represent an interesting model for the study of the aging process and the characterization of the molecular mechanisms underlying degenerative diseases.

### Acknowledgments

S. Zdanov is a recipient of the FRIA, Belgium. O. Toussaint and F. Debaq-Chainiaux are respectively Research Assistant and Research Associate of the FNRS, Belgium. We acknowledge the Région Wallonne/FSE First-Europe projects "Arrayage", "CosmUV" and First-DEI project "Cosmet-X". We acknowledge the Région Wallonne "Réseaux II, Senegene" project, and Nanotoxic project. We also thank the European Commission (Geha Project, LSHM-CT-2004-503270; Link-Age Project, LSHM-CT-2005-523866).

## References

1. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
2. Phillips, P.D., R.J. Pignolo, and V.J. Cristofalo, *Insulin-like growth factor-I: specific binding to high and low affinity sites and mitogenic action throughout the life span of WI-38 cells*. J Cell Physiol, 1987. **133**(1): p. 135-43.
3. von Zglinicki, T., et al., *Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence?* Exp Cell Res, 1995. **220**(1): p. 186-93.
4. Bumann, J., et al., *Radiation-induced alterations of the proliferation dynamics of human skin fibroblasts after repeated irradiation in the subtherapeutic dose range*. Strahlenther Onkol, 1995. **171**(1): p. 35-41.
5. Dumont, P., et al., *Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(3): p. 361-73.
6. Pascal, T., et al., *Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays*. FEBS Lett, 2005. **579**(17): p. 3651-9.
7. Debacq-Chainiaux, F., et al., *Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 4): p. 743-58.
8. Fripiat, C., et al., *Subcytotoxic H2O2 stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2531-7.
9. Bayreuther, K., et al., *Differentiation of fibroblast stem cells*. J Cell Sci Suppl, 1988. **10**: p. 115-30.
10. Smith, W.L., R.M. Garavito, and D.L. DeWitt, *Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2*. J Biol Chem, 1996. **271**(52): p. 33157-60.
11. Dubois, R.N., et al., *Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor-alpha and phorbol ester*. J Clin Invest, 1994. **93**(2): p. 493-8.
12. Sheng, H., et al., *Induction of cyclooxygenase-2 by activated Ha-ras oncogene in Rat-1 fibroblasts and the role of mitogen-activated protein kinase pathway*. J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 22120-7.



13. Feng, L., et al., *Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide*. J Clin Invest, 1995. **95**(4): p. 1669-75.
14. Steinauer, K.K., et al., *Radiation induces upregulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) protein in PC-3 cells*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2000. **48**(2): p. 325-8.
15. Yang, T., et al., *MAPK mediation of hypertonicity-stimulated cyclooxygenase-2 expression in renal medullary collecting duct cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 23281-6.
16. Shaftel, S.S., et al., *COX-3: a splice variant of cyclooxygenase-1 in mouse neural tissue and cells*. Brain Res Mol Brain Res, 2003. **119**(2): p. 213-5.
17. Han, J.H., et al., *Selective COX-2 inhibitor, NS-398, inhibits the replicative senescence of cultured dermal fibroblasts*. Mech Ageing Dev, 2004. **125**(5): p. 359-66.
18. Kim, H.J., et al., *The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression: NF-kappaB activation and IkappaBalpha degradation*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(5): p. 683-92.
19. Hayek, M.G., et al., *Enhanced expression of inducible cyclooxygenase with age in murine macrophages*. J Immunol, 1997. **159**(5): p. 2445-51.
20. Renard, P., et al., *Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NFkappaB*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(4): p. E21.
21. de Magalhaes, J.P., et al., *Gene expression and regulation in H2O2-induced premature senescence of human foreskin fibroblasts expressing or not telomerase*. Exp Gerontol, 2004. **39**(9): p. 1379-89.
22. Zdanov, S., et al., *Identification of p38MAPK-dependent Genes Involved in H2O2-induced Premature Senescence of IMR-90 hTERT Human Fibroblasts*. submitted.
23. Warner, T.D., et al., *Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): p. 7563-8.
24. Chen, Q.M., V.C. Tu, and J. Liu, *Measurements of hydrogen peroxide induced premature senescence: senescence-associated beta-galactosidase and DNA synthesis index in human diploid fibroblasts with down-regulated p53 or Rb*. Biogerontology, 2000. **1**(4): p. 335-9.
25. Lasa, M., et al., *Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(12): p. 4265-74.

26. Fiebich, B.L., et al., *Interleukin-1beta induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2) synthesis in human neuroblastoma cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB*. J Neurochem, 2000. **75**(5): p. 2020-8.
27. Rockwell, P., et al., *Redox regulates COX-2 upregulation and cell death in the neuronal response to cadmium*. Cell Signal, 2004. **16**(3): p. 343-53.
28. Mielke, K. and T. Herdegen, *JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system*. Prog Neurobiol, 2000. **61**(1): p. 45-60.
29. Kosaka, T., et al., *Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2*. Eur J Biochem, 1994. **221**(3): p. 889-97.
30. Xie, W., et al., *v-src induction of the TIS10/PGS2 prostaglandin synthase gene is mediated by an ATF/CRE transcription response element*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(10): p. 6531-9.
31. Gorgoni, B., et al., *The transcription factor C/EBPbeta is essential for inducible expression of the cox-2 gene in macrophages but not in fibroblasts*. J Biol Chem, 2001. **276**(44): p. 40769-77.
32. Dubois, R.N., et al., *Cyclooxygenase in biology and disease*. FASEB J, 1998. **12**(12): p. 1063-73.
33. de Silva, K.I., et al., *Prostaglandin E2 mediates growth arrest in NFS-60 cells by down-regulating interleukin-6 receptor expression*. Biochem J, 2003. **370**(Pt 1): p. 315-21.
34. McNulty, R.J., et al., *Indomethacin suppresses the anti-proliferative effects of transforming growth factor-beta isoforms on fibroblast cell cultures*. Biochem J, 1997. **321** (Pt 3): p. 639-43.
35. Choi, E.M., et al., *COX-2 regulates p53 activity and inhibits DNA damage-induced apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **328**(4): p. 1107-12.
36. Lee, S.H., et al., *Cyclooxygenase-2-mediated DNA damage*. J Biol Chem, 2005. **280**(31): p. 28337-46.
37. Gutierrez-Venegas, G., et al., *Role of p38 in nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression, and nitric oxide and PGE2 synthesis in human gingival fibroblasts stimulated with lipopolysaccharides*. Life Sci, 2005. **77**(1): p. 60-73.
38. McGinty, A., et al., *Induction of prostaglandin endoperoxide synthase 2 by mitogen-activated protein kinase cascades*. Biochem J, 2000. **352** Pt 2: p. 419-24.
39. Chen, W., et al., *Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes*. Oncogene, 2001. **20**(29): p. 3921-6.

40. Han, J.A., et al., *P53-mediated induction of Cox-2 counteracts p53- or genotoxic stress-induced apoptosis*. *Embo J*, 2002. **21**(21): p. 5635-44.
41. Fripiat, C., et al., *Signal transduction in H2O2-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts*. *Free Radic Biol Med*, 2002. **33**(10): p. 1334-46.
42. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. *Physiol Rev*, 2002. **82**(1): p. 47-95.
43. Nagano, S., et al., *Peroxidase activity of cyclooxygenase-2 (COX-2) cross-links beta-amyloid (Abeta) and generates Abeta-COX-2 hetero-oligomers that are increased in Alzheimer's disease*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(15): p. 14673-8.

# **Conclusions & Perspectives**

Depuis une dizaine d'années ont émergé différents modèles de stress subcytotoxiques engendrant à long terme l'apparition d'un vieillissement prématuré. Ceux-ci sont actuellement répertoriés sous le terme de sénescence induite prématurément par le stress ou SIPS. Les principaux biomarqueurs de la sénescence qui apparaissent suite à un stress oxydatif subcytotoxique sont la morphologie sénescente, un arrêt prolifératif irréversible en phase G1/S, une diminution de la synthèse d'ADN et une augmentation du nombre de cellules présentant l'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA- $\beta$ -gal). Lorsque nous avons commencé ce travail, nous venions de montrer au laboratoire que les fibroblastes de souche BJ qui expriment la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT), enzyme qui rallonge les télomères dont l'érosion peut-être accélérée par les stress oxydatifs, entrent en SIPS lorsqu'ils sont exposés à l' $H_2O_2$  (de Magalhaes *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent que le raccourcissement des télomères n'est pas indispensable à la mise en place de la SIPS et que d'autres mécanismes doivent y participer. C'est dans ce contexte que nous avons décidé d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de l'apparition de la SIPS chez des FHDs IMR-90 exprimant la télomérase.

### **Mise au point d'un modèle de sénescence induite prématurément par un stress sous peroxyde d'hydrogène chez des fibroblastes immortalisés par la sous-unité catalytique de la télomérase**

Nos premiers travaux ont consisté en la mise au point d'un modèle de stress oxydatif permettant de mimer et d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus du vieillissement. En effet, nous nous sommes intéressés aux effets à long terme d'un stress unique au peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) chez des fibroblastes diploïdes humains (FHDs) IMR-90 immortalisés par la sous-unité catalytique de la télomérase, hTERT. Dans un premier temps, nous devions déterminer la concentration en  $H_2O_2$  capable d'induire l'apparition des biomarqueurs de la sénescence, sans engendrer de cytotoxicité. Nous avons ainsi montré qu'une concentration de 200  $\mu$ M en  $H_2O_2$  était subcytotoxique et qu'elle engendrait l'apparition d'une sénescence prématurée. En effet, une augmentation du pourcentage de cellules positives pour la SA  $\beta$ -galactosidase a été observée chez les fibroblastes IMR-90 hTERT stressés. Cette activité, aisément mise en évidence par une coloration histochimique, est spécifique des cellules sénescents (Dimiri *et al.*, 1995). Elle a également été détectée lors de la sénescence prématurée induite par le t-BHP (Dumont *et al.*, 2000), l'éthanol (Pascal *et al.*, 2005) et les UVB (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005). D'autre part, une diminution du potentiel prolifératif chez les FHDs IMR-90 hTERT soumis à un stress à l' $H_2O_2$  a été mise en évidence *via* l'étude de l'incorporation de thymidine tritiée dans

l'ADN. Lors de la sénescence répliquative, l'inhibiteur de kinase dépendante de cyclines (CDKI) p21<sup>WAF-1</sup>, surexprimé suite à l'activation de p53, empêche la phosphorylation et l'inactivation de pRb (Sherr & Roberts, 1999). De plus, p21<sup>WAF-1</sup> est surexprimé pendant plusieurs semaines après un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alors que le niveau protéique de p53 augmente puis retourne à son niveau basal 44 h après le stress (Chen *et al.*, 1998) (Dumont *et al.*, 2000). Chez les fibroblastes IMR-90 hTERT, p21<sup>WAF-1</sup> est surexprimé aussi bien au niveau ARNm que protéique à 24, 48 et 72 h après le stress alors que le niveau d'expression de p53 ne varie pas. Malgré l'absence de surexpression de p53, nous avons observé une augmentation de son activité de liaison à l'ADN jusqu'à 24 h après le stress subcytotoxique sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Comme cela a déjà été montré, des modifications post-traductionnelles semblent être à l'origine de l'activation de p53 (Brooks & Gu., 2003) lors de la sénescence répliquative (Atadja *et al.*, 1995) (Webley *et al.*, 2000) et lors de stress oxydatifs (Colman *et al.*, 2000). L'utilisation d'ARN interférants dirigés contre p53 nous a appris que le niveau basal d'ARNm de p21<sup>WAF-1</sup> est régulé par p53 alors que sa surexpression en est indépendante à 24 h après le stress. Une telle induction de p21<sup>WAF-1</sup>, indépendante de p53, avait déjà été démontrée. En effet, des fibroblastes IMR-90 dépourvu de p53 suite à l'expression ectopique de la protéine de papillomavirus E6, entrent en sénescence prématurée suite à un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chen *et al.*, 1998). L'induction de p21<sup>WAF-1</sup> ainsi que l'hypophosphorylation de pRb avaient été observées chez ces FHDs IMR-90 + E6 stressés. L'étude du promoteur de p21<sup>WAF-1</sup> a permis de mettre en évidence la présence de sites Sp1 et AP-1 en plus des sites p53. Selon Kardassis, l'interaction de c-Jun ou d'ATF-2 avec le facteur de transcription Sp1 induit la transactivation du promoteur de p21<sup>WAF-1</sup> (Kardassis *et al.*, 1999). D'autre part, il a été montré que la surexpression de p21<sup>WAF-1</sup> observée chez des cellules cancéreuses dépourvues de p53 et stressées sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est dépendante de l'activation d'AP-1 (Chung *et al.*, 2002). Ayant observé une activation d'AP-1 dans notre modèle de SIPS, il serait intéressant de vérifier si AP-1 et ATF-2 participent à l'induction de p21<sup>WAF-1</sup> chez les fibroblastes IMR-90 hTERT.

Lorsque nous avons commencé ce travail, nous savions que le « Transforming Growth-Factor  $\beta$ 1 » (TGF- $\beta$ 1), surexprimé après un stress subcytotoxique sous 150  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les fibroblastes IMR-90, était responsable chez ces cellules, de l'apparition de la morphologie sénescence, de l'activité SA  $\beta$ -gal et de la surexpression de l'ostéonectine, la fibronectine, l'apolipoprotéine J et de SM22 (Frippiat *et al.*, 2001). Des résultats similaires avaient été obtenus lors de la sénescence induite par les UVB chez des FHDs de derme (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005). C'est donc logiquement que nous avons étudié le rôle du TGF- $\beta$ 1 dans l'apparition du phénotype sénescence chez les fibroblastes IMR-90 hTERT. Etonnamment, aucune augmentation du niveau d'ARNm de TGF- $\beta$ 1 ainsi que de la fibronectine et de l'ostéonectine n'a pu être détectée à différents temps après le stress. JP.

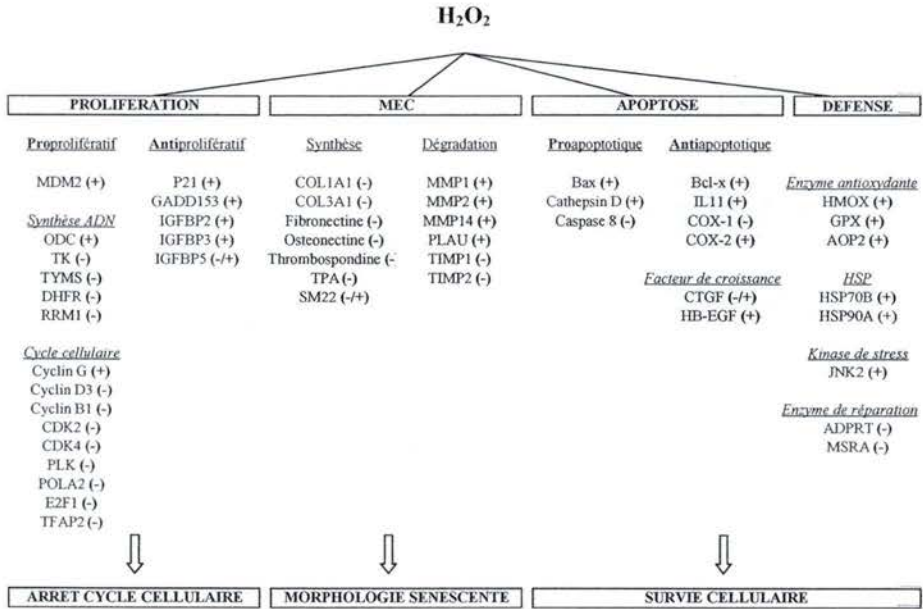
de Magalhaes avait obtenu des résultats semblables chez des FHDs de derme immortalisés par la télomérase (BJ hTERT) (de Magalhaes *et al.*, 2004). Il semble donc que l'expression exogène de hTERT confère aux cellules une résistance face aux effets dirigés par le TGF- $\beta$ 1. Plusieurs arguments vont dans ce sens. En effet, la réactivation de la télomérase chez les cellules épithéliales mammaires empêche le TGF- $\beta$ 1 d'induire l'arrêt de prolifération (Stampfer *et al.*, 2001). D'autre part, la stimulation de cellules cancéreuses humaines avec du TGF- $\beta$ 1 supprime l'activation de la télomérase et réprime l'expression de hTERT (Yang *et al.*, 2001) (Lindkvist *et al.*, 2005). L'utilisation de cellules transformées par un gène hTERT non fonctionnel nous indique que la télomérase doit être capable de maintenir l'intégrité des télomères pour conférer une résistance au TGF- $\beta$ 1. Selon Stampfer *et al.*, l'expression de hTERT modifierait l'abondance de plusieurs protéines impliquées dans la voie de signalisation activée par le TGF- $\beta$ 1 en altérant l'association des télomères avec la matrice nucléaire ou en affectant l'activité de diverses protéines associées aux télomères (Stampfer *et al.*, 2001).

Nous avons donc montré que des fibroblastes de poumon immortalisés avec la sous-unité catalytique hTERT développent les différents biomarqueurs de la sénescence suite à l'exposition à une concentration subcytotoxique d' $H_2O_2$ . La présence de l'activité télomérase chez des fibroblastes n'empêche donc pas l'apparition de la SIPS. Ces résultats, en accord avec ceux obtenus lors d'autres travaux (de Magalhaes *et al.*, 2002) (Gorbunova *et al.*, 2002) (Matuoka *et al.*, 2002) nous indiquent que contrairement à la sénescence répliquative, le raccourcissement des télomères n'est pas indispensable à la mise en place de la SIPS et que d'autres mécanismes doivent y participer. Nous avons également montré que la voie de transduction du signal dirigée par une surexpression du TGF- $\beta$ 1 n'est pas impliquée dans l'apparition du phénotype de SIPS chez les cellules IMR-90 hTERT.

## Etude du rôle de p38<sup>MAPK</sup> dans les changements d'expression génique induits par un stress subcytotoxique à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Sachant que ni le raccourcissement des télomères, ni une surexpression du TGF- $\beta$ 1 ne sont indispensables à la mise en place de la SIPS chez les FHDs IMR-90 hTERT stressés sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nous avons voulu caractériser de façon plus complète l'état de ces cellules en sénescence prématurée induite sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en étudiant leur profil d'expression génique. Ainsi, en collaboration avec la société Eppendorf Array Technologies, nous avons développé et validé un damier à ADN de faible densité nommé "DualChip Human Aging". Celui-ci nous a permis d'étudier le niveau d'expression de 240 gènes impliqués dans l'établissement de la sénescence et la réponse au stress. D'autre part, sachant que p38<sup>MAPK</sup> était activée lors de la sénescence induite sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez les FHDs IMR-90 (Fripiat *et al.*, 2002), il nous semblait intéressant de vérifier si p38<sup>MAPK</sup> était également impliquée dans notre modèle. Nous avons observé une augmentation du niveau de phosphorylation de p38<sup>MAPK</sup> chez les FHDs IMR-90 stressés. Cette activation, qui apparaît directement après le stress, se maintient au moins 72 h après ce même stress. Nous avons également montré que l'inhibition de p38<sup>MAPK</sup> par le SB203580 empêche l'apparition d'une morphologie sénescence et diminue le nombre de cellules présentant une activité SA  $\beta$ -gal lors de la sénescence induite sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Par contre, p38<sup>MAPK</sup> ne semble pas intervenir dans l'arrêt de prolifération observé à 72 h après le stress. En effet, l'inhibition de p38<sup>MAPK</sup> n'a pas eu d'effet sur l'incorporation de thymidine tritiée, suggérant que d'autres mécanismes sont responsables de l'arrêt de croissance. Afin d'élargir nos connaissances concernant le rôle de p38<sup>MAPK</sup> dans notre modèle, nous avons établi et comparé différents profils d'expression génique. Ceux-ci nous ont permis d'identifier plusieurs gènes dont la transcription est contrôlée par p38<sup>MAPK</sup>. Pour une facilité de compréhension, nous avons classé les gènes étudiés selon leur fonction principale connue (Figure 21).





**Figure 21:** Gènes dont l'expression varie lors de la sénescence induite prématurément par un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (+): gènes surexprimés après le stress; (-): gènes réprimés après le stress; (surlignage gris): gènes dont l'expression est dépendante de p38<sup>MAPK</sup>.

### Diminution de la capacité proliférative

Lors de la sénescence répliquative mais aussi suite à des stress oxydatifs subcytotoxiques, une hypophosphorylation de Rb est observée permettant l'interaction de Rb avec le facteur de transcription E<sub>2</sub>F. Cette association est responsable de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Afin de mieux comprendre les grandes lignes de la régulation de cycle cellulaire en sénescence prématurée induite sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nous avons donc étudié le niveau d'ARNm de plusieurs gènes clés. Nous avons montré que suite à un stress subcytotoxique sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les niveaux d'ARNm des cyclines D3, B1, des Cdk2 et 4, de la polymérase A2 et d'E<sub>2</sub>F<sub>1</sub> diminuent en comparaison aux FHDs IMR-90 hTERT non stressés. Nous observons également une diminution du niveau d'ARNm de gènes impliqués dans la synthèse de l'ADN tel que la thymidine kinase (TK), la thymidylate synthétase (TYMS), la dihydrofolate réductase (DHFR) et la ribonucléotide-réductase M1 (RRM1). Ces gènes, indispensables à la progression du cycle cellulaire, sont également réprimés chez les fibroblastes WI-38 sénescents (Cristofalo *et al.*, 1998). Face à la répression de ces gènes pro-prolifératifs, nous mesurons que le niveau d'ARNm de p21<sup>WAF-1</sup>, d'IGFBP-3, d'IGFBP-5 et de Gadd153 augmentent après le stress. Récemment, on a montré que la surexpression d'IGFBP-3 induit l'apparition de l'activité SA β-gal et l'arrêt de croissance chez des fibroblastes WI-38 stressés à l'éthanol et au *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP) (Pascal, soumis pour publication). Gadd153, quant à lui, voit son expression fortement induite en réponse à divers stress cellulaires tel que l'hypoxie (Han *et al.*, 2005) et les stress oxydatifs (Guyton *et al.*, 1996) (Tang *et al.*, 2002) (Lai *et al.*, 2005). Ce facteur de transcription est capable de bloquer le cycle cellulaire. En effet, la microinjection de Gadd153 dans les fibroblastes murins NIH-3T3 induit un arrêt du cycle en fin de phase G1/S (Barone *et al.*, 1994).

A l'exception de la thymidylate synthétase (TYMS) et d'E<sub>2</sub>F<sub>1</sub>, le niveau d'expression des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire n'est pas affecté par l'inhibition de p38<sup>MAPK</sup> chez les FHDs IMR-90 hTERT stressés. Ces résultats suggèrent que p38<sup>MAPK</sup> n'est pas responsable de l'expression de ces gènes, et confirment ainsi les données déjà obtenues concernant le fait que p38<sup>MAPK</sup> n'intervient pas dans l'arrêt prolifératif observé lors de la SIPS.

### Morphologie sénescence

Lors de la sénescence répliquative, la synthèse de plusieurs métalloprotéinases matricielles (MMPs) est augmentée alors que l'expression de protéines dénommées TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) diminue (Mawal-Dewan *et al.*, 2002) (Zeng *et al.*, 1996)

(Bizot-Foulon *et al.*, 1995). Les MMPs sont des endopeptidases (collagénases, élastases, stromélysines, gélatinases) responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC). Une étude *in vivo* réalisée sur des échantillons de peau humaine non exposés au soleil nous apprend qu'une réduction importante de la synthèse de collagène apparaît avec l'âge du donneur (Varani *et al.*, 2000) alors que le niveau d'activité des MMPs est augmenté. Ces changements d'expression contribuent au remodelage de la MEC et permettent d'expliquer en partie les changements morphologiques observés par Bayreuther chez les fibroblastes sénescents (Bayreuther *et al.*, 1988). Qu'en est-il de la sénescence prématurée induite sous  $H_2O_2$  et du rôle de  $p38^{MAPK}$  dans l'établissement d'une morphologie sénescence?

Contrairement aux gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, nous observons que plusieurs gènes impliqués dans la synthèse ou la dégradation de la MEC sont régulés par  $p38^{MAPK}$  chez les fibroblastes IMR-90 hTERT. En effet, nous observons une augmentation dépendante de  $p38^{MAPK}$  du niveau d'ARNm des métalloprotéinases 2 (MMP-2) et 14 (MMP-14) ainsi que de la protéase activatrice de MMPs, PLAU suite à un stress sous  $H_2O_2$ . MMP-2 est une gélatinase capable de dégrader divers composants de la MEC dont les gélatines, l'élastine, la fibronectine, les collagènes I, IV, V, VII, X, XI. MMP14, quant à elle, est une enzyme associée à la membrane plasmique et participe au mécanisme d'activation de la MMP2 (Nagase *et al.*, JBC 1999) (McCawley *et al.*, 2001). Nous avons également montré que de nombreux gènes codant pour des constituants de la MEC voient leur niveau d'expression diminuer chez les fibroblastes IMR-90 hTERT stressés. En effet, nous observons une diminution dépendante de  $p38^{MAPK}$  du niveau d'ARNm de la fibronectine, de l'ostéonectine, de SM22, du tissu plasminogen activator (TPA) et de la thrombospondine après stress. Par contre, l'inhibition de  $p38^{MAPK}$  ne semble pas affecter la répression de l' $\alpha$ -1 procollagène de type I (Col1A1), l' $\alpha$ -1 procollagène de type III (Col3A1), ni la surexpression de la MMP-1. Ces résultats suggèrent que  $p38^{MAPK}$  modifie la balance synthèse/dégradation de la MEC. Il est donc possible que  $p38^{MAPK}$  intervienne dans la perte d'homéostasie de la MEC observée lors de la sénescence répllicative et lors du vieillissement *in vivo*. Une diminution du niveau relatif d'ARNm des inhibiteurs de MMPs, TIMP-1 et TIMP-2 observée lors de la SIPS sous  $H_2O_2$  tend à soutenir cette hypothèse. Il serait donc intéressant de confirmer ces résultats au niveau protéique et de mesurer l'activité enzymatique des MMPs par zymographie.

## Survie cellulaire

Les cellules ont érigé divers systèmes de défense visant à contrôler leur niveau de ROS. Ainsi, il était peu surprenant de constater que de nombreux gènes de réponse aux stress voient leur niveau d'ARNm augmenter après un stress sous  $H_2O_2$ . Parmi ces gènes, on retrouve trois gènes codant pour des protéines antioxydantes: la glutathion peroxydase (GPX), la protéine anti-oxydante 2 (AOP2 ou peroxyredoxine VI) et l'hème oxygénase (HMOX). La glutathion peroxydase décompose l' $H_2O_2$  en utilisant comme donneur d'électron le glutathion, un tripeptide présent en grandes quantités dans les cellules. La protéine anti-oxydante 2, également nommée peroxyredoxine VI, contribue aussi à éliminer les peroxydes. Nous avons montré que l'expression de ces deux enzymes est contrôlée au niveau ARNm par  $p38^{MAPK}$ . L'hème oxygénase-1, quant à elle, contribue à augmenter le niveau de ferritine (Vile *et al.*, 1994). La ferritine, en séquestrant le fer intracellulaire, diminue la capacité du fer à produire des radicaux hydroxyles.

Nous avons également observé la surexpression de deux gènes de la famille des "heat shock proteins", Hsp70 beta et Hsp90 alpha. Ces protéines de choc thermique sont synthétisées en abondance lorsque les dégâts cellulaires sont importants. Elles empêchent les protéines dénaturées de former des agrégats insolubles et les aident à recouvrer leur conformation native et leur fonction normale (Hartl *et al.*, 1996) (Hartl *et al.*, 2002). Les Hsp contribuent ainsi à maintenir les cellules en bon état. Des études sur des mouches transfectées avec le gène codant pour l'Hsp70 montrent un lien direct entre les Hsp et la longévité. En effet, la durée de vie de ces mouches est significativement accrue (Tatar *et al.*, 1997).

Nous constatons que plusieurs gènes pro ou anti-apoptotiques voient leur expression varier suite à un stress chez les FHDs IMR-90 hTERT. En effet, les gènes pro-apoptotiques BAX et la cathépsine D (Kagedal *et al.*, 2001) sont surexprimés après un stress sous  $H_2O_2$  ainsi que les gènes anti-apoptotiques Bcl-X et l'interleukine 11 (IL-11). La concentration en  $H_2O_2$  utilisée dans ce travail étant subcytotoxique, un équilibre entre les signaux pro et anti-apoptotique semble donc être instauré. De plus, il a été montré que l'expression de hTERT chez des FHDs IMR-90 protège ces cellules contre l'apoptose. En effet, le processus de réparation dirigé par la télomérase (ajout de répétitions télomériques à la fin des chromosomes) serait capable de masquer partiellement les dommages à l'ADN à la machinerie apoptotique mais serait toutefois incapable de réparer les dommages globaux de l'ADN et donc n'empêcherait pas les cellules d'entrer en SIPS (Gorbunova *et al.*, 2002). Nous montrons également que  $p38^{MAPK}$  est responsable de la répression de la caspase 8 ainsi que de la surexpression de Bcl-x et de IL-11. IL-11 est une cytokine qui confère une

protection cellulaire à différents tissus tel que le poumon. En effet, les poumons de souris surexprimant IL-11 sont plus résistants face aux effets toxiques de l'hyperoxie (Waxman *et al.*, 1998). De plus, il a été montré que IL-11 empêche les cellules endothéliales d'entrer en apoptose suite à un stress cytotoxique sous  $H_2O_2$  (Waxman *et al.*, 2003). Selon Waxman, la capacité de IL-11 d'inhiber la protéine p53 (Du *et al.*, 1997) et de réguler l'expression du gène anti-apoptotique Bcl-x (Schwarze *et al.*, 1995) expliquerait en partie le rôle cytoprotecteur de cette cytokine.

Nous avons donc montré que l'activation de  $p38^{MAPK}$  chez les FHDs IMR-90 hTERT en sénescence induite sous  $H_2O_2$  est responsable de la surexpression de plusieurs gènes codant pour des enzymes antioxydantes, des protéines de choc thermique, des cytokines et des facteurs anti-apoptotiques.  $p38^{MAPK}$  participe donc à la mise en place de la réponse au stress oxydatif et par conséquent à la survie cellulaire.

## Etude du rôle de COX-2 dans l'apparition du phénotype sénescence

Au moment où nous avons commencé ce travail, il était établi que des fibroblastes de derme surexprimant le facteur de transcription c-Rel, entraient dans un état de sénescence prématurée suite à la surexpression subséquente de la cyclooxygénase 2 (COX-2) (Bernard *et al.*, 2001). D'autre part, des travaux récents réalisés par Han *et al* montrent que l'inhibition de COX-2 par l'inhibiteur chimique spécifique NS-398, retarde l'entrée des fibroblastes en sénescence (Han *et al.*, 2004). Suite à ces observations, nous nous sommes demandés si COX-2 était surexprimée chez des fibroblastes IMR-90 hTERT après un stress subcytotoxique sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et si elle pouvait induire l'apparition de l'activité SA  $\beta$ -gal et l'arrêt prolifératif.

Nous avons montré que la quantité d'ARNm et protéique de COX-2 augmentait à 24 h après le stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour se maintenir à un niveau élevé pendant plus de 72 h après le stress. Nous avons également observé une nette augmentation de la quantité de PGE<sub>2</sub> libérée dans le milieu extracellulaire de 24 à 72 h après le stress, témoignant de l'activité biochimique de COX-2 dans notre modèle. Pour ces raisons, nous avons testé si la neutralisation de COX-2 pouvait empêcher l'apparition des biomarqueurs de la sénescence induite prématurément par les stress. Dans ce but, deux approches techniques ont été privilégiées. D'une part, nous avons incubé les FHDs IMR-90 hTERT avec un inhibiteur spécifique de COX-2 (NS-398) avant, pendant et après que les cellules aient été soumises à un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. D'autre part, nous avons inhibé, de manière transitoire, l'expression de COX-2 par l'utilisation d'ARN interférants. Quelque soit l'approche utilisée, nous avons montré que l'apparition des biomarqueurs de la sénescence est beaucoup moins marquée, que ce soit au niveau de l'activité SA  $\beta$ -gal ou de l'arrêt prolifératif. Par contre, la neutralisation de COX-2 n'a pas eu d'effet sur le niveau d'expression de p21<sup>WAF-1</sup>. Ce dernier résultat va à l'encontre de l'hypothèse du contrôle de la surexpression de p21<sup>WAF-1</sup> par COX-2. Il est donc plausible que plusieurs voies participent à l'arrêt du cycle cellulaire observé suite à un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Selon cette hypothèse, on aurait d'une part, l'activation de p21<sup>WAF-1</sup> indépendante de p53 et conduisant à l'hypophosphorylation de Rb, et d'autre part, l'activation de COX-2 menant également à l'arrêt prolifératif. Les voies de signalisation par lesquelles COX-2 induit l'arrêt prolifératif des fibroblastes IMR-90 hTERT n'ont pas été explorées dans ce travail. Toutefois, plusieurs pistes sont à envisager comme par exemple celle de la protéine kinase A (PKA). L'activation de la PKA est liée à COX-2 et plus particulièrement à la PGE<sub>2</sub>. En effet, en se liant à son récepteur de type EP, la PGE<sub>2</sub> va induire une augmentation de la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) via l'activation de l'adénylate cyclase (Narumiya *et al.*, 1999) (Crider *et al.*, 2000) (Hoshino *et*

*al.*, 2003). L'AMPc est un messager secondaire indispensable à l'activation de la PKA. Chez les cellules lymphocytaires, l'activation de la PKA par la forskoline, induit un arrêt du cycle cellulaire en fin de phase G1. Celui-ci apparaît suite à la surexpression de p27<sup>Waf-1</sup> et à la répression de la cycline D3 (Van Oirschot *et al.*, 2001). Chez les FHDs IMR-90 hTERT soumis à un stress subcytotoxique sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la cycline D3 est réprimée. De plus, la PKA est activée suite à un stress oxydatif comme cela a été démontré dans les cellules neuronales (Echeverria *et al.*, 2005). Cela signifie donc que la PGE<sub>2</sub> libérée jusqu'à 72 h après le stress pourrait activer la voie de la PKA conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire chez les FHDs IMR-90 hTERT.

Face à ceci, il a été montré que l'expression et l'activité de COX-2 augmentent lors de la sénescence répliquative (Hayek *et al.*, 1997) (Kim *et al.*, 2000) (Han *et al.*, 2004). Selon Han *et al.*, l'inhibition de COX-2 par le NS-398 empêche la surexpression de p53 et la répression de PCNA (Han *et al.*, 2004). PCNA est un cofacteur de l'ADN polymérase et est donc essentiel à la prolifération cellulaire (Zhang *et al.*, 1993). D'autre part, la surexpression de COX-2 chez les cellules mésangiales induit l'augmentation du niveau protéique de p21<sup>WAF-1</sup> et p27<sup>KIP-1</sup> ainsi que du facteur de transcription p53 (Zahner *et al.*, 2002). Ces différentes voies représentent donc un intérêt tout particulier et permettraient d'expliquer en partie l'arrêt de prolifération induit par la COX-2 chez les FHDs soumis à un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### *Comment COX-2 est-elle activée suite à un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ?*

L'étude transcriptomique réalisée en condition de stress et en présence ou non de l'inhibiteur de p38<sup>MAPK</sup> nous a appris que l'expression de COX-2 est dépendante de p38<sup>MAPK</sup> chez les fibroblastes IMR-90 hTERT. Cette relation entre p38<sup>MAPK</sup> et COX-2 avait déjà été mise en évidence par plusieurs auteurs (Lasa *et al.*, 2000) (Fiebich *et al.*, 2000) (Rockwell *et al.*, 2004). Nous avons également montré que p38<sup>MAPK</sup> phosphoryle et active les facteurs de transcription ATF-2 et p53 chez les FHDs IMR-90 hTERT soumis à un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'utilisation d'ARN interférants dirigés contre ces facteurs de transcription a permis de mettre en évidence leur implication dans la surexpression de COX-2 suite à un stress. Un effet activateur d'ATF-2 et de p53 sur l'expression de COX-2 avait déjà été observé (Han *et al.*, 2002). De plus, l'inhibition d'ATF-2 et de p53 empêche l'apparition des biomarqueurs de la SIPS. Notons que la protection engendrée par ces ARN interférants contre l'arrêt prolifératif est partielle confirmant que d'autres mécanismes sont aussi responsables de cet arrêt, comme l'inhibition progressive d'E2F par Rb suite à la surexpression de p21<sup>WAF-1</sup>. Le fait que la surexpression de p21<sup>WAF-1</sup> est indépendante de p53 et d'ATF-2 dans notre modèle de SIPS renforce cette idée. En conclusion, nous avons montré que p38<sup>MAPK</sup> est phosphorylée

suite à un stress subcytotoxique sous  $H_2O_2$ . Cette activation conduit à la surexpression de COX-2 *via* l'activation des facteurs de transcription ATF-2 et p53.

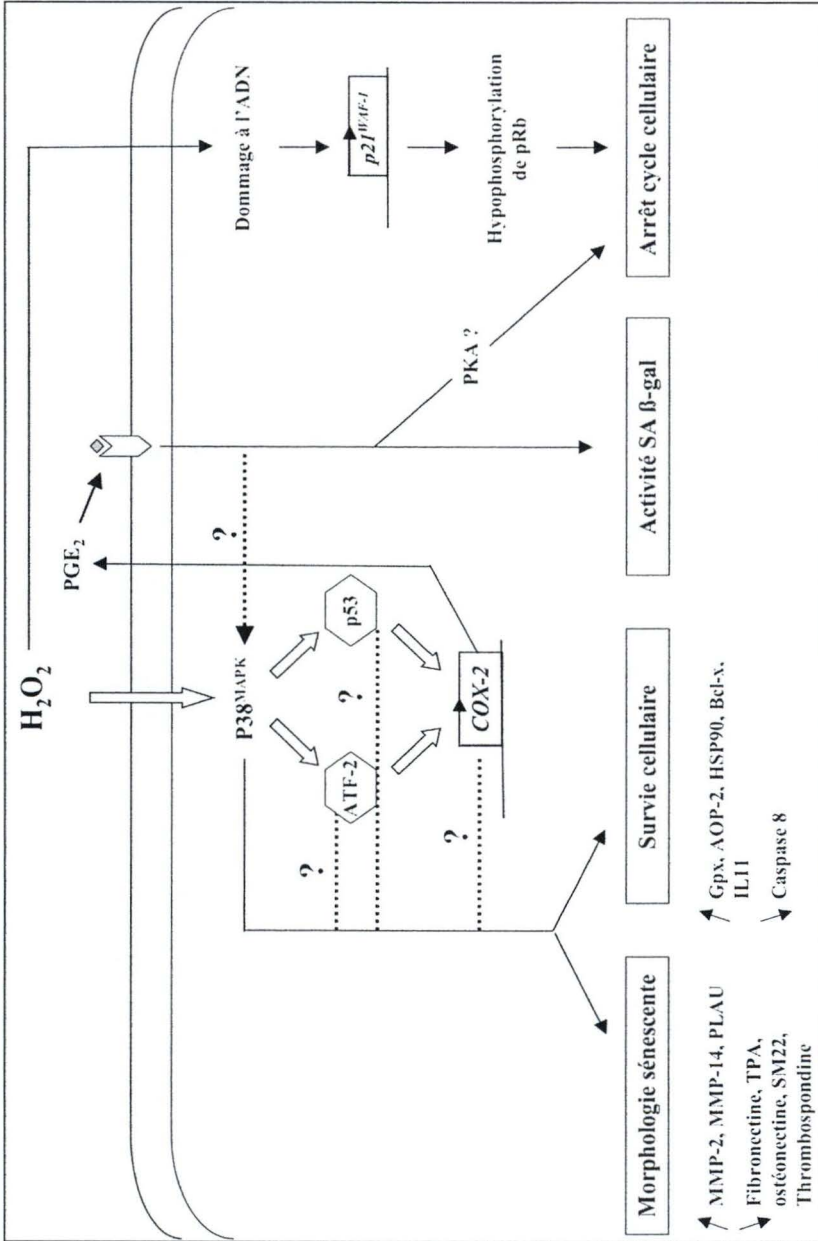


## Relation entre COX-2 et la voie de p38<sup>MAPK</sup>

A travers notre travail, nous avons suggéré une relation étroite entre p38<sup>MAPK</sup> et COX-2. Nous avons démontré que p38<sup>MAPK</sup> est responsable de la surexpression de COX-2 suite à un stress subcytotoxique sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Inversement, l'équipe de Faour a montré que COX-2, via la synthèse de PGE<sub>2</sub>, pouvait activer la voie de p38<sup>MAPK</sup> chez des fibroblastes stimulés avec de l'interleukine 1 (IL-1) (Faour *et al.*, 2001). D'autre part, l'ajout de PGE<sub>2</sub> dans le milieu extracellulaire induit l'expression de COX-2 chez des cellules musculaires lisses (Bradbury *et al.*, 2003). Il serait donc intéressant d'étudier la relation PGE<sub>2</sub>-p38<sup>MAPK</sup> dans notre modèle de stress. Si une activation de p38<sup>MAPK</sup> est observée suite à la libération de PGE<sub>2</sub> dans le milieu de culture, cela suppose un système de boucle où p38<sup>MAPK</sup> serait à la fois responsable de la surexpression de COX-2 et la cible de celui-ci. Cette boucle rétroactive permettrait d'expliquer pourquoi COX-2 et p38<sup>MAPK</sup> restent activés jusqu'à 72 h après le stress et donnerait également des indices quant au caractère irréversible de la SIPS. D'autres liens entre p38<sup>MAPK</sup> et COX-2 restent possibles et méritent d'être explorés. A travers le premier manuscrit, nous avons clairement montré que p38<sup>MAPK</sup>, en régulant l'expression de certains gènes, participe à la survie cellulaire ainsi qu'au remodelage de la MEC apparaissant lors de la sénescence induite sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Parmi les gènes dont l'expression est contrôlée par p38<sup>MAPK</sup>, plusieurs peuvent également être régulé par COX-2. En effet, Choi et son équipe ont récemment montré que l'activation de COX-2 en réponse à IL-1 $\beta$  induit la surexpression de la MMP-2 chez des chondrocytes humains (Choi *et al.*, 2004). De plus, l'inhibition de COX-2 empêche l'expression de diverses MMPs au niveau de plusieurs souches de cellules cancéreuses (Pan *et al.*, 2001) (Dohadwala *et al.*, 2002) (Wagenaar-Miller *et al.*, 2003). A côté de cela, plusieurs équipes ont montré que COX-2, tout comme p38<sup>MAPK</sup>, protège les cellules contre l'apoptose (Tsuji & Dubois., 1995) (Hoshino *et al.*, 2003) (Choi *et al.*, 2005). Selon Han *et al.*, la surexpression de COX-2 chez des fibroblastes stressés sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> régulerait l'expression des gènes anti-apoptotiques Bcl-x et Bcl-2 et empêcherait l'activation de la caspase 3 (Han *et al.*, 2002). Il serait donc intéressant de vérifier si les gènes dont l'expression est dépendante de p38<sup>MAPK</sup> en condition de stress, voient leur niveau d'expression varier lorsque l'on inhibe l'activité de COX-2. Si cela est confirmé, cela sous-entendrait que l'activation de p38<sup>MAPK</sup> chez les FHDs IMR-90 hTERT en SIPS régulerait l'expression de plusieurs gènes suite à la surexpression de COX-2.

Notre travail permet de proposer un modèle moléculaire d'établissement de la sénescence induite prématurément par un stress sous peroxyde d'hydrogène (Figure 22). p38<sup>MAPK</sup>, phosphorylé et activé suite à un stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, contrôle l'expression de plusieurs gènes

codant pour des MMPs, des constituants de la MEC, des enzymes antioxydantes, des protéines de choc thermique, des cytokines et des facteurs anti-apoptotiques. Ces changements d'expression suggèrent que p38<sup>MAPK</sup> participe au remodelage de la MEC et à la mise en place de la réponse au stress oxydatif. p38<sup>MAPK</sup> est également responsable de la surexpression de COX-2 suite à l'activation des facteurs de transcription ATF-2 et p53. Une fois surexprimé et activé, COX-2 induit l'apparition de la SA  $\beta$ -gal et l'arrêt du cycle cellulaire via la synthèse de PGE<sub>2</sub>. En outre, la PGE<sub>2</sub> est capable de maintenir à long terme l'activation de p38<sup>MAPK</sup>, établissant ainsi une boucle fermée entre COX-2 et p38<sup>MAPK</sup> (Faour *et al.*, 2001). Enfin, nous avons également montré que p21<sup>WAF-1</sup>, dont la surexpression est indépendante de p53, participe également à l'arrêt de prolifération observé chez les cellules en sénescence prématurée induite sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figure 22:** Voie proposée de régulation de l'apparition des biomarqueurs de la sénescence prématurée induite suite à un stress subcytotoxique sous  $H_2O_2$ .

## SIPS, inflammation et vieillissement

Depuis quelques années, il est devenu évident que l'arrêt du cycle cellulaire induit par des télomères courts n'est pas le seul inducteur d'un phénotype sénescence. En effet, la sénescence peut être induite par la surexpression d'oncogènes, par des stress oxydatifs, par des dommages à l'ADN ou par des changements au niveau de la chromatine (Toussaint *et al.*, 2000). La question sous jacente à ces données est la suivante: Comment ces différents processus contribuent-ils au vieillissement de l'organisme? Selon certains auteurs, la sénescence répliquative participerait au vieillissement des tissus à potentiel prolifératif élevé tel que les endothéliums et les tissus lymphoïdes. Avec l'âge, un déclin dans la réponse proliférative des lymphocytes T a été observées *in vivo* et *in vitro* (Makinodan *et al.*, 1998) (Weng *et al.*, 1998). Ce déclin se manifeste chez les personnes âgées par une fragilité excessive face aux infections (Pawelec *et al.*, 1998) (Lloberas *et al.*, 2002). En ce qui concerne les fibroblastes, il est plus que probable qu'ils n'atteignent jamais la limite de leur capacité proliférative *in vivo*. Une population de fibroblastes provenant d'individus âgés réalise encore 10 à 20 passages en culture suggérant que cette population dispose toujours de 20 à 40 % de son potentiel prolifératif de départ (Campisi *et al.*, 1996). La sénescence induite prématurément par des stress semble donc être la principale cause des changements observés lors du vieillissement *in vivo*. Le fait que la sénescence prématurée causée par un stress oxydatif est indépendante du raccourcissement des télomères facilite cette vue (de Magalhaes *et al.*, 2002) (Gorbunova *et al.*, 2002) (Matuoka *et al.*, 2002).

Au cours de notre vie, nos cellules sont confrontées à des stress oxydatifs d'une intensité anormalement élevée. Par exemple, nos pneumocytes peuvent être stressés par la pollution atmosphérique, l'ozone, la fumée de tabac. Nos cellules cutanées sont soumises aux rayonnements ultraviolets. Des circonstances particulières telles que l'ischémie-reperfusion, la surconsommation d'alcool, de fer et de graisses polyinsaturées génèrent également des stress oxydatifs (Toussaint *et al.*, 2002). Tous ces stress sont susceptibles d'engendrer des processus d'inflammation qui semblent quant à eux fortement liés à la SIPS. En effet, une proportion plus importante de fibroblastes en SIPS a été observée près de sites d'inflammation d'ulcères de la jambe (Mendez *et al.*, 1998). Dans les fluides de ces ulcères, on trouve des concentrations élevées en cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$  et tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Mendez *et al.*, 1998). Il a été observé *in vitro* que la stimulation répétée de FHDs de souche WI-38 au moyen de IL-1 $\alpha$  et de TNF- $\alpha$  provoque l'apparition des biomarqueurs de la SIPS (Dumont *et al.*, 2000). Ces cytokines ont été décrites comme favorisant la dégradation de la matrice extracellulaire. En effet, l'activation de COX-2 en réponse à des stimuli pro-inflammatoires induit la surexpression de diverses

métalloprotéinases (Choi *et al.*, 2004). Il est donc possible que ces cytokines interviennent dans la perte d'homéostasie de la matrice extracellulaire observée lors du vieillissement *in vivo* de certains types cellulaires ou de certains tissus, tel que le tissu conjonctif.

L'augmentation de la production de molécules inflammatoires lors du vieillissement est un phénomène communément appelé "Inflammaging" (Franceschi *et al.*, 2000) (De Martinis *et al.*, 2005). Cet état se caractérise par une réponse inflammatoire chronique s'accompagnant d'une destruction tissulaire et d'une tentative de réparation des dommages. Celui-ci est associé à de nombreuses conditions pathologiques tel que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, l'athérosclérose, le diabète de type II ou encore le cancer.

Selon certains auteurs, les personnes âgées dont l'état inflammatoire serait contrôlé, auraient une qualité de vie élevée et une santé fonctionnelle correcte. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré un lien direct entre la longévité et le polymorphisme des cytokines, suggérant que les individus génétiquement prédisposés à produire de faibles quantités de cytokines inflammatoires et des quantités importantes de cytokines anti-inflammatoires auraient une espérance de vie plus élevée (Bonafe *et al.*, 2001) (Lio *et al.*, 2004) (Caruso *et al.*, 2005). La prise de molécules anti-inflammatoires constituerait donc un des traitements pour empêcher ou retarder les manifestations cliniques des maladies liées au vieillissement.

# **Bibliographie**

- Abate C, Patel L, Rauscher FJ, 3rd, Curran T. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 1990;249(4973):1157-61.
- Adamson GM, Harman AW. Comparison of the susceptibility of hepatocytes from postnatal and adult mice to hepatotoxins. *Biochem Pharmacol* 1988;37(21):4183-90.
- Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(24):13742-7.
- Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(21):10114-8.
- Anderson MT, Staal FJ, Gitler C, Herzenberg LA. Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF-kappa B signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(24):11527-31.
- Appleby SB, Ristimaki A, Neilson K, Narko K, Hla T. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J* 1994;302 (Pt 3):723-7.
- Ashida M, Bito T, Budiyo A, Ichihashi M, Ueda M. Involvement of EGF receptor activation in the induction of cyclooxygenase-2 in HaCaT keratinocytes after UVB. *Exp Dermatol* 2003;12(4):445-52.
- Atadja P, Wong H, Garkavtsev I, Veillette C, Riabowol K. Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(18):8348-52.
- Bauerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996;87(1):13-20.
- Barone MV, Crozat A, Tabaei A, Philipson L, Ron D. CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G1/S arrest. *Genes Dev* 1994;8(4):453-64.
- Bayreuther K, Rodemann HP, Francz PI, Maier K. Differentiation of fibroblast stem cells. *J Cell Sci Suppl* 1988;10:115-30.
- Beal MF. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002;32(9):797-803.
- Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998;78(2):547-81.
- Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(5):961-76.
- Bernard D, Quatannens B, Begue A, Vandenbunder B, Abbadie C. Antiproliferative and antiapoptotic effects of c-rel may occur within the same cells via the up-regulation of manganese superoxide dismutase. *Cancer Res* 2001;61(6):2656-64.
- Bizot-Foulon V, Bouchard B, Hornebeck W, Dubertret L, Bertaux B. Uncoordinate expressions of type I and III collagens, collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 along in vitro proliferative life span of human skin fibroblasts. Regulation by all-trans retinoic acid. *Cell Biol Int* 1995;19(2):129-35.
- Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991;350(6319):569-73.
- Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001;106(6):661-73.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into

normal human cells. *Science* 1998;279(5349):349-52.

Bonafe M, Olivieri F, Cavallone L, et al. A gender-dependent genetic predisposition to produce high levels of IL-6 is detrimental for longevity. *Eur J Immunol* 2001;31(8):2357-61.

Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 1990;186:343-55.

Bourgain FM, Katinka MD. Telomeres inhibit end to end fusion and enhance maintenance of linear DNA molecules injected into the *Paramecium primaurelia* macronucleus. *Nucleic Acids Res* 1991;19(7):1541-7.

Brack C, Lithgow G, Osiewacz H, Toussaint O. EMBO WORKSHOP REPORT: Molecular and cellular gerontology Serpiano, Switzerland, September 18-22, 1999. *Embo J* 2000;19(9):1929-34.

Bradbury DA, Newton R, Zhu YM, El-Haroun H, Corbett L, Knox AJ. Cyclooxygenase-2 induction by bradykinin in human pulmonary artery smooth muscle cells is mediated by the cyclic AMP response element through a novel autocrine loop involving endogenous prostaglandin E2, E-prostanoid 2 (EP2), and EP4 receptors. *J Biol Chem* 2003;278(50):49954-64.

Brooks CL, Gu W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15(2):164-71.

Brooks PM, Day RO. COX-2 inhibitors. *Med J Aust* 2000;173(8):433-6.

Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, et al. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *Embo J* 1999;18(23):6845-54.

Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1977;180(2):248-57.

Campisi J. Replicative senescence: an old lives' tale? *Cell* 1996;84(4):497-500.

Cand F, Verdetti J. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. *Free Radic Biol Med* 1989;7(1):59-63.

Caruso C, Candore G, Colonna-Romano G, Lio D, Franceschi C. Inflammation and life-span. *Science* 2005;307(5707):208-9; author reply -9.

Chainiaux F, Magalhaes JP, Eliaers F, Remacle J, Toussaint O. UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34(11):1331-9.

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979;59(3):527-605.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(21):13926-31.

Chen J, Brodsky SV, Goligorsky DM, et al. Glycated collagen I induces premature senescence-like phenotypic changes in endothelial cells. *Circ Res* 2002;90(12):1290-8.

Chen Q, Ames BN. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(10):4130-4.

Chen QM, Bartholomew JC, Campisi J, Acosta M, Reagan JD, Ames BN. Molecular analysis of H2O2-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1



arrest but not cell replication. *Biochem J* 1998;332 (Pt 1):43-50.

Chen QM, Prowse KR, Tu VC, Purdom S, Linskens MH. Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp Cell Res* 2001;265(2):294-303.

Chen W, Tang Q, Gonzales MS, Bowden GT. Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes. *Oncogene* 2001;20(29):3921-6.

Choi EM, Heo JI, Oh JY, et al. COX-2 regulates p53 activity and inhibits DNA damage-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328(4):1107-12.

Choi YA, Lee DJ, Lim HK, et al. Interleukin-1beta stimulates matrix metalloproteinase-2 expression via a prostaglandin E2-dependent mechanism in human chondrocytes. *Exp Mol Med* 2004;36(3):226-32.

Chung YW, Jeong DW, Won JY, Choi EJ, Choi YH, Kim IY. H(2)O(2)-induced AP-1 activation and its effect on p21(WAF1/CIP1)-mediated G2/M arrest in a p53-deficient human lung cancer cell. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293(4):1248-53.

Collado M, Medema RH, Garcia-Cao I, et al. Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J Biol Chem* 2000;275(29):21960-8.

Colman MS, Afshari CA, Barrett JC. Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress. *Mutat Res* 2000;462(2-3):179-88.

Conrad MN, Wright JH, Wolf AJ, Zakian VA. RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell* 1990;63(4):739-50.

Conrad PW, Rust RT, Han J, Millhorn DE, Beitner-Johnson D. Selective activation of p38alpha and p38gamma by hypoxia. Role in regulation of cyclin D1 by hypoxia in PC12 cells. *J Biol Chem* 1999;274(33):23570-6.

Crider JY, Griffin BW, Sharif NA. Endogenous EP4 prostaglandin receptors coupled positively to adenylyl cyclase in Chinese hamster ovary cells: pharmacological characterization. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000;62(1):21-6.

Cristofalo VJ, Lorenzini A, Allen RG, Torres C, Tresini M. Replicative senescence: a critical review. *Mech Ageing Dev* 2004;125(10-11):827-48.

Cristofalo VJ, Sharf BB. Cellular senescence and DNA synthesis. Thymidine incorporation as a measure of population age in human diploid cells. *Exp Cell Res* 1973;76(2):419-27.

Cristofalo VJ, Volker C, Francis MK, Tresini M. Age-dependent modifications of gene expression in human fibroblasts. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1998;8(1):43-80.

Cross AR, Jones OT. Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta* 1991;1057(3):281-98.

Cryer B, Kimmey MB. Gastrointestinal side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1998;105(1B):20S-30S.

Cuenda A, Alonso G, Morrice N, et al. Purification and cDNA cloning of SAPKK3, the major activator of RK/p38 in stress- and cytokine-stimulated monocytes and epithelial cells. *Embo J* 1996;15(16):4156-64.

Cuenda A, Cohen P. Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway

are required for C2C12 myogenesis. *J Biol Chem* 1999;274(7):4341-6.

Cuenda A, Rouse J, Doza YN, et al. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* 1995;364(2):229-33.

Cui Y, Kim DS, Park SH, et al. Involvement of ERK AND p38 MAP kinase in AAPH-induced COX-2 expression in HaCaT cells. *Chem Phys Lipids* 2004;129(1):43-52.

d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003;426(6963):194-8.

Damalas A, Kahan S, Shtutman M, Ben-Ze'ev A, Oren M. Deregulated beta-catenin induces a p53- and ARF-dependent growth arrest and cooperates with Ras in transformation. *Embo J* 2001;20(17):4912-22.

de Magalhaes JP, Chainiaux F, de Longueville F, et al. Gene expression and regulation in H2O2-induced premature senescence of human foreskin fibroblasts expressing or not telomerase. *Exp Gerontol* 2004;39(9):1379-89.

de Magalhaes JP, Chainiaux F, Remacle J, Toussaint O. Stress-induced premature senescence in BJ and hTERT-BJ1 human foreskin fibroblasts. *FEBS Lett* 2002;523(1-3):157-62.

De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Lett* 2005;579(10):2035-9.

Debacq-Chainiaux F, Borlon C, Pascal T, et al. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J Cell Sci* 2005;118(Pt 4):743-58.

Demple B, Amabile-Cuevas CF. Redox redux: the control of oxidative stress responses. *Cell* 1991;67(5):837-9.

Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, et al. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 1995;267(5198):682-5.

Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 1994;8(21):2540-51.

Dimri GP, Itahana K, Acosta M, Campisi J. Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 2000;20(1):273-85.

Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(20):9363-7.

Dohadwala M, Batra RK, Luo J, et al. Autocrine/paracrine prostaglandin E2 production by non-small cell lung cancer cells regulates matrix metalloproteinase-2 and CD44 in cyclooxygenase-2-dependent invasion. *J Biol Chem* 2002;277(52):50828-33.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82(1):47-95.

Du X, Liu Q, Yang Z, et al. Protective effects of interleukin-11 in a murine model of ischemic bowel necrosis. *Am J Physiol* 1997;272(3 Pt 1):G545-52.

DuBois RN, Awad J, Morrow J, Roberts LJ, 2nd, Bishop PR. Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor-alpha and phorbol ester. *J Clin Invest* 1994;93(2):493-8.

DuBois RN, Shao J, Tsujii M, Sheng H, Beauchamp RD. G1 delay in cells overexpressing

prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cancer Res* 1996;56(4):733-7.

Dulic V, Kaufmann WK, Wilson SJ, et al. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 1994;76(6):1013-23.

Dumont P, Balbeur L, Remacle J, Toussaint O. Appearance of biomarkers of in vitro ageing after successive stimulation of WI-38 fibroblasts with IL-1alpha and TNF-alpha: senescence associated beta-galactosidase activity and morphotype transition. *J Anat* 2000;197 Pt 4:529-37.

Dumont P, Burton M, Chen QM, et al. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med* 2000;28(3):361-73.

Dumont P, Chainiaux F, Eliaers F, et al. Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and tert-butylhydroperoxide. *Cell Stress Chaperones* 2002;7(1):23-35.

Dumont P, Royer V, Pascal T, et al. Growth kinetics rather than stress accelerate telomere shortening in cultures of human diploid fibroblasts in oxidative stress-induced premature senescence. *FEBS Lett* 2001;502(3):109-12.

Echeverria V, Clerman A, Dore S. Stimulation of PGE receptors EP2 and EP4 protects cultured neurons against oxidative stress and cell death following beta-amyloid exposure. *Eur J Neurosci* 2005;22(9):2199-206.

Enslin H, Raingeaud J, Davis RJ. Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem* 1998;273(3):1741-8.

Epstein CJ, Avraham KB, Lovett M, et al. Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity: animal model of dosage effects in Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(22):8044-8.

Evans CH, Georgescu HI. Observations on the senescence of cells derived from articular cartilage. *Mech Ageing Dev* 1983;22(2):179-91.

Fahn HJ, Wang LS, Hsieh RH, et al. Age-related 4,977 bp deletion in human lung mitochondrial DNA. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(4 Pt 1):1141-5.

Faour WH, He Y, He QW, et al. Prostaglandin E(2) regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 mRNA through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-1 beta-treated human synovial fibroblasts. *J Biol Chem* 2001;276(34):31720-31.

Feng J, Funk WD, Wang SS, et al. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995;269(5228):1236-41.

Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 1995;95(4):1669-75.

Fiebich BL, Muesch B, Boehringer M, Hull M. Interleukin-1beta induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2) synthesis in human neuroblastoma cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB. *J Neurochem* 2000;75(5):2020-8.

Filser N, Margue C, Richter C. Quantification of wild-type mitochondrial DNA and its 4.8-kb deletion in rat organs. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;233(1):102-7.

Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15(2):247-54.

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408(6809):239-47.

Fiorucci S, de Lima OM, Jr., Mencarelli A, et al. Cyclooxygenase-2-derived lipoxin A4 increases gastric resistance to aspirin-induced damage. *Gastroenterology* 2002;123(5):1598-606.

Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000;908:244-54.

Friguet B. Protein repair and degradation during aging. *ScientificWorldJournal* 2002;2:248-54.

Friguet B, Bulteau AL, Chondrogianni N, Conconi M, Petropoulos I. Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. *Ann N Y Acad Sci* 2000;908:143-54.

Friguet B. Le vieillissement moléculaire et cellulaire et ses futurs enjeux. *L'actualité chimique* 2003; 103-107.

Frippiat C, Chen QM, Zdanov S, Magalhaes JP, Remacle J, Toussaint O. Subcytotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem* 2001;276(4):2531-7.

Frippiat C, Dewelle J, Remacle J, Toussaint O. Signal transduction in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2002;33(10):1334-46.

Fu Y, Liu HW, Forsythe SM, et al. Mutagenesis analysis of human SM22: characterization of actin binding. *J Appl Physiol* 2000;89(5):1985-90.

Fujii J, Ikeda Y. Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. *Redox Rep* 2002;7(3):123-30.

Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001;294(5548):1871-5.

Futaki N, Takahashi S, Yokoyama M, Arai I, Higuchi S, Otomo S. NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. *Prostaglandins* 1994;47(1):55-9.

Garavito RM. The cyclooxygenase-2 structure: new drugs for an old target? *Nat Struct Biol* 1996;3(11):897-901.

Garcia AJ, Vega MD, Boettiger D. Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation. *Mol Biol Cell* 1999;10(3):785-98.

Gasparini L, Ongini E, Wenk G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Alzheimer's disease: old and new mechanisms of action. *J Neurochem* 2004;91(3):521-36.

Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002;109 Suppl:S81-96.

Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 1999;5(6):698-701.

Gilson E, Laroche T, Gasser SM. Telomeres and the functional architecture of the nucleus. *Trends Cell Biol* 1993;3(4):128-34.

Goedert M, Cuenda A, Craxton M, Jakes R, Cohen P. Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *Embo J* 1997;16(12):3563-71.

Goeptar AR, Scheerens H, Vermeulen NP. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol* 1995;25(1):25-65.

- Good L, Dimri GP, Campisi J, Chen KY. Regulation of dihydrofolate reductase gene expression and E2F components in human diploid fibroblasts during growth and senescence. *J Cell Physiol* 1996;168(3):580-8.
- Gorbunova V, Seluanov A, Pereira-Smith OM. Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *J Biol Chem* 2002;277(41):38540-9.
- Gorbunova V, Seluanov A, Pereira-Smith OM. Evidence that high telomerase activity may induce a senescent-like growth arrest in human fibroblasts. *J Biol Chem* 2003;278(9):7692-8.
- Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 1985;43(2 Pt 1):405-13.
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 1999;97(4):503-14.
- Griswold CM, Matthews AL, Bewley KE, Mahaffey JW. Molecular characterization and rescue of acatalasemic mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1993;134(3):781-8.
- Gutteridge JM. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun* 1993;19(3):141-58.
- Guyton KZ, Xu Q, Holbrook NJ. Induction of the mammalian stress response gene GADD153 by oxidative stress: role of AP-1 element. *Biochem J* 1996;314 (Pt 2):547-54.
- Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993;57(5 Suppl):715S-24S; discussion 24S-25S.
- Han JA, Kim JI, Ongusaha PP, et al. P53-mediated induction of Cox-2 counteracts p53- or genotoxic stress-induced apoptosis. *Embo J* 2002;21(21):5635-44.
- Han JH, Roh MS, Park CH, et al. Selective COX-2 inhibitor, NS-398, inhibits the replicative senescence of cultured dermal fibroblasts. *Mech Ageing Dev* 2004;125(5):359-66.
- Han XJ, Chae JK, Lee MJ, You KR, Lee BH, Kim DG. Involvement of GADD153 and cardiac ankyrin repeat protein in hypoxia-induced apoptosis of H9c2 cells. *J Biol Chem* 2005;280(24):23122-9.
- Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V. Dependence of H2O2 formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr* 1997;29(1):89-95.
- Harizi H, Juzan M, Grosset C, Rashedi M, Gualde N. Dendritic cells issued in vitro from bone marrow produce PGE(2) that contributes to the immunomodulation induced by antigen-presenting cells. *Cell Immunol* 2001;209(1):19-28.
- Harley CB, Kim NW. Telomerase and cancer. *Important Adv Oncol* 1996:57-67.
- Harley CB, Vaziri H, Counter CM, Allsopp RC. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol* 1992;27(4):375-82.
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11(3):298-300.
- Harman D. Aging and oxidative stress. *J Int Fed Clin Chem* 1998;10(1):24-7.
- Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996;381(6583):571-9.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded

protein. *Science* 2002;295(5561):1852-8.

Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 1990;346(6287):866-8.

Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997;387(6630):296-9.

Hayek MG, Mura C, Wu D, et al. Enhanced expression of inducible cyclooxygenase with age in murine macrophages. *J Immunol* 1997;159(5):2445-51.

Hayflick L. The cellular basis for biological aging. In *Handbook of the biology of aging*, C.E. Finch, Hayflick, L., ed. (New-York, Von Nostrand R.) pp. 159. 1977.

Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961;25:585-621.

Hazzalin CA, Cano E, Cuenda A, Barratt MJ, Cohen P, Mahadevan LC. p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient. *Curr Biol* 1996;6(8):1028-31.

Herwig S, Strauss M. The retinoblastoma protein: a master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis. *Eur J Biochem* 1997;246(3):581-601.

Hla T, Bishop-Bailey D, Liu CH, Schaeffers HJ, Trifan OC. Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31(5):551-7.

Honda S, Matsuo M. Shortening of the in vitro lifespan of human diploid fibroblasts exposed to hyperbaric oxygen. *Exp Gerontol* 1983;18(5):339-45.

Hornsby PJ, Gill GN. Characterization of adult bovine adrenocortical cells throughout their life span in tissue culture. *Endocrinology* 1978;102(3):926-36.

Hoshino T, Tsutsumi S, Tomisato W, Hwang HJ, Tsuchiya T, Mizushima T. Prostaglandin E2 protects gastric mucosal cells from apoptosis via EP2 and EP4 receptor activation. *J Biol Chem* 2003;278(15):12752-8.

Huang C, Ma WY, Maxiner A, Sun Y, Dong Z. p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *J Biol Chem* 1999;274(18):12229-35.

Humphreys DT, Carver JA, Easterbrook-Smith SB, Wilson MR. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *J Biol Chem* 1999;274(11):6875-81.

Hunot S, Vila M, Teismann P, et al. JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(2):665-70.

Jiang XR, Jimenez G, Chang E, et al. Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat Genet* 1999;21(1):111-4.

Jiang Y, Chen C, Li Z, et al. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* 1996;271(30):17920-6.

Jouzeau JY, Daouphars M, Benani A, and Netter P. Pharmacology and classification of cyclooxygenase inhibitor. *Gastroenterol Clin Biol* 2004;28:7-17.

Kabuyama Y, Homma MK, Sekimata M, Homma Y. Wavelength-specific activation of MAP kinase family proteins by monochromatic UV irradiation. *Photochem Photobiol* 2001;73(2):147-52.

- Kagedal K, Johansson U, Ollinger K. The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *Faseb J* 2001;15(9):1592-4.
- Kardassis D, Papakosta P, Pardali K, Moustakas A. c-Jun transactivates the promoter of the human p21(WAF1/Cip1) gene by acting as a superactivator of the ubiquitous transcription factor Sp1. *J Biol Chem* 1999;274(41):29572-81.
- Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9(2):240-6.
- Karlseder J, Smogorzewska A, de Lange T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* 2002;295(5564):2446-9.
- Kim HJ, Kim KW, Yu BP, Chung HY. The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression: NF-kappaB activation and I kappa Balpha degradation. *Free Radic Biol Med* 2000;28(5):683-92.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266(5193):2011-5.
- Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:239-67.
- Koong AC, Chen EY, Giaccia AJ. Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Res* 1994;54(6):1425-30.
- Kosaka T, Miyata A, Ihara H, et al. Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem* 1994;221(3):889-97.
- Kouzarides T. Transcriptional control by the retinoblastoma protein. *Semin Cancer Biol* 1995;6(2):91-8.
- Kulju KS, Lehman JM. Increased p53 protein associated with aging in human diploid fibroblasts. *Exp Cell Res* 1995;217(2):336-45.
- Kumazaki T, Kobayashi M, Mitsui Y. Enhanced expression of fibronectin during in vivo cellular aging of human vascular endothelial cells and skin fibroblasts. *Exp Cell Res* 1993;205(2):396-402.
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 20):3613-22.
- Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001;81(2):807-69.
- La Thangue NB. DP and E2F proteins: components of a heterodimeric transcription factor implicated in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6(3):443-50.
- Lai WL, Wong NS. ROS mediates 4HPR-induced posttranscriptional expression of the Gadd153 gene. *Free Radic Biol Med* 2005;38(12):1585-93.
- Lasa M, Mahtani KR, Finch A, Brewer G, Saklatvala J, Clark AR. Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade. *Mol Cell Biol* 2000;20(12):4265-74.
- Lavoie JN, Lambert H, Hickey E, Weber LA, Landry J. Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Mol Cell Biol* 1995;15(1):505-16.
- Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA. Gene expression profile of aging and its retardation

- by caloric restriction. *Science* 1999;285(5432):1390-3.
- Lendvay TS, Morris DK, Sah J, Balasubramanian B, Lundblad V. Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics* 1996;144(4):1399-412.
- Levine M, Tjian R. Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 2003;424(6945):147-51.
- Lezza AM, Boffoli D, Scacco S, Cantatore P, Gadaleta MN. Correlation between mitochondrial DNA 4977-bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205(1):772-9.
- Lin A, Minden A, Martinetto H, et al. Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* 1995;268(5208):286-90.
- Lindkvist A, Franzen S, Ren ZP, Heldin NE, Paulsson-Karlsson Y. Differential effects of TGF-beta1 on telomerase activity in thyroid carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338(3):1625-33.
- Lindsey J, McGill NI, Lindsey LA, Green DK, Cooke HJ. In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutat Res* 1991;256(1):45-8.
- Lindvall C, Hou M, Komurasaki T, et al. Molecular characterization of human telomerase reverse transcriptase-immortalized human fibroblasts by gene expression profiling: activation of the epiregulin gene. *Cancer Res* 2003;63(8):1743-7.
- Lio D, Candore G, Crivello A, et al. Opposite effects of interleukin 10 common gene polymorphisms in cardiovascular diseases and in successful ageing: genetic background of male centenarians is protective against coronary heart disease. *J Med Genet* 2004;41(10):790-4.
- Liou JY, Deng WG, Gilroy DW, Shyue SK, Wu KK. Colocalization and interaction of cyclooxygenase-2 with caveolin-1 in human fibroblasts. *J Biol Chem* 2001;276(37):34975-82.
- Liu VW, Zhang C, Nagley P. Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing. *Nucleic Acids Res* 1998;26(5):1268-75.
- Liu W, Reinmuth N, Stoeltzing O, et al. Cyclooxygenase-2 is up-regulated by interleukin-1 beta in human colorectal cancer cells via multiple signaling pathways. *Cancer Res* 2003;63(13):3632-6.
- Lloberas J, Celada A. Effect of aging on macrophage function. *Exp Gerontol* 2002;37(12):1325-31.
- Lowe SW, Sherr CJ. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13(1):77-83.
- Lu G, Tsai AL, Van Wart HE, Kulmacz RJ. Comparison of the peroxidase reaction kinetics of prostaglandin H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1999;274(23):16162-7.
- Ma W, Wlaschek M, Brenneisen P, et al. Human dermal fibroblasts escape from the long-term phenocopy of senescence induced by psoralen photoactivation. *Exp Cell Res* 2002;274(2):299-309.
- Makinodan T. Studies on the influence of age on immune response to understand the biology of immunosenescence. *Exp Gerontol* 1998;33(1-2):27-38.
- Masoro EJ. Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol* 2000;35(3):299-305.
- Matuoka K, Chen KY. Telomerase positive human diploid fibroblasts are resistant to replicative senescence but not premature senescence induced by chemical reagents. *Biogerontology*



2002;3(6):365-72.

Mawal-Dewan M, Lorenzini A, Frisoni L, Zhang H, Cristofalo VJ, Sell C. Regulation of collagenase expression during replicative senescence in human fibroblasts by Akt-forkhead signaling. *J Biol Chem* 2002;277(10):7857-64.

Maytin EV, Ubeda M, Lin JC, Habener JF. Stress-inducible transcription factor CHOP/gadd153 induces apoptosis in mammalian cells via p38 kinase-dependent and -independent mechanisms. *Exp Cell Res* 2001;267(2):193-204.

McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 2001;13(5):534-40.

McClintock B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 1941;26:234-82.

McDermott EP, O'Neill LA. Ras participates in the activation of p38 MAPK by interleukin-1 by associating with IRAK, IRAK2, TRAF6, and TAK-1. *J Biol Chem* 2002;277(10):7808-15.

McGettigan P, Henry D. Current problems with non-specific COX inhibitors. *Curr Pharm Des* 2000;6(17):1693-724.

Medrano EE, Im S, Yang F, Abdel-Malek ZA. Ultraviolet B light induces G1 arrest in human melanocytes by prolonged inhibition of retinoblastoma protein phosphorylation associated with long-term expression of the p21Waf-1/SDI-1/Cip-1 protein. *Cancer Res* 1995;55(18):4047-52.

Melov S, Ravenscroft J, Malik S, et al. Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* 2000;289(5484):1567-9.

Mendez MV, Stanley A, Park HY, Shon K, Phillips T, Menzoian JO. Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence. *J Vasc Surg* 1998;28(5):876-83.

Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 1997;90(4):785-95.

Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG) among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(18):7049-53.

Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science* 1999;286(5440):774-9.

Michishita E, Nakabayashi K, Suzuki T, et al. 5-Bromodeoxyuridine induces senescence-like phenomena in mammalian cells regardless of cell type or species. *J Biochem (Tokyo)* 1999;126(6):1052-9.

Mielke K, Brecht S, Dorst A, Herdegen T. Activity and expression of JNK1, p38 and ERK kinases, c-Jun N-terminal phosphorylation, and c-jun promoter binding in the adult rat brain following kainate-induced seizures. *Neuroscience* 1999;91(2):471-83.

Mielke K, Herdegen T. JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog Neurobiol* 2000;61(1):45-60.

Mihm S, Galter D, Droge W. Modulation of transcription factor NF kappa B activity by intracellular glutathione levels and by variations of the extracellular cysteine supply. *Faseb J* 1995;9(2):246-52.

Mishima K, Handa JT, Aotaki-Keen A, Luty GA, Morse LS, Hjelmeland LM. Senescence-associated beta-galactosidase histochemistry for the primate eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*

1999;40(7):1590-3.

Mockett RJ, Orr WC, Rahmandar JJ, et al. Overexpression of Mn-containing superoxide dismutase in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Arch Biochem Biophys* 1999;371(2):260-9.

Mockett RJ, Sohal RS, Orr WC. Overexpression of glutathione reductase extends survival in transgenic *Drosophila melanogaster* under hyperoxia but not normoxia. *Faseb J* 1999;13(13):1733-42.

Morales CP, Gandia KG, Ramirez RD, Wright WE, Shay JW, Spechler SJ. Characterisation of telomerase immortalised normal human oesophageal squamous cells. *Gut* 2003;52(3):327-33.

Morel Y, Barouki R. Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. *Medecine/Science* 1998; 14:713-21.

Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 1989;59(3):521-9.

Morita I, Schindler M, Regier MK, et al. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1995;270(18):10902-8.

Mueller SN, Rosen EM, Levine EM. Cellular senescence in a cloned strain of bovine fetal aortic endothelial cells. *Science* 1980;207(4433):889-91.

Muller HJ. "The remaking of chromosomes". *Collecting Net* 1938;13:182-98.

Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274(31):21491-4.

Narita M, Nunez S, Heard E, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 2003;113(6):703-16.

Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999;79(4):1193-226.

Ni H, Wang XS, Diener K, Yao Z. MAPKAPK5, a novel mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase, is a substrate of the extracellular-regulated kinase (ERK) and p38 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;243(2):492-6.

Nugent CI, Lundblad V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev* 1998;12(8):1073-85.

Ogryzko VV, Hirai TH, Russanova VR, Barbie DA, Howard BH. Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol Cell Biol* 1996;16(9):5210-8.

Oh CW, Bump EA, Kim JS, Janigro D, Mayberg MR. Induction of a senescence-like phenotype in bovine aortic endothelial cells by ionizing radiation. *Radiat Res* 2001;156(3):232-40.

Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 2000;12(1):1-13.

Ookawara T, Imazeki N, Matsubara O, et al. Tissue distribution of immunoreactive mouse extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol* 1998;275(3 Pt 1):C840-7.

Orr WC, Sohal RS. The effects of catalase gene overexpression on life span and resistance to oxidative stress in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Arch Biochem Biophys* 1992;297(1):35-41.

Orr WC, Sohal RS. Effects of Cu-Zn superoxide dismutase overexpression on life span and

resistance to oxidative stress in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Arch Biochem Biophys* 1993;301(1):34-40.

Orr WC, Sohal RS. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 1994;263(5150):1128-30.

Ouellet M, Percival MD. Effect of inhibitor time-dependency on selectivity towards cyclooxygenase isoforms. *Biochem J* 1995;306 (Pt 1):247-51.

Palmero I, McConnell B, Parry D, et al. Accumulation of p16INK4a in mouse fibroblasts as a function of replicative senescence and not of retinoblastoma gene status. *Oncogene* 1997;15(5):495-503.

Pan MR, Chuang LY, Hung WC. Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 expression via repression of transcription in lung cancer cells. *FEBS Lett* 2001;508(3):365-8.

Pang CY, Lee HC, Yang JH, Wei YH. Human skin mitochondrial DNA deletions associated with light exposure. *Arch Biochem Biophys* 1994;312(2):534-8.

Parkes TL, Elia AJ, Dickinson D, Hilliker AJ, Phillips JP, Boulianne GL. Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. *Nat Genet* 1998;19(2):171-4.

Parks D, Bolinger R, Mann K. Redox state regulates binding of p53 to sequence-specific DNA, but not to non-specific or mismatched DNA. *Nucleic Acids Res* 1997;25(6):1289-95.

Pascal T, Debacq-Chainiaux F, Chretien A, et al. Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays. *FEBS Lett* 2005;579(17):3651-9.

Petersen S, Saretzki G, von Zglinicki T. Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. *Exp Cell Res* 1998;239(1):152-60.

Petropoulos I, Mary J, Perichon M, Friguet B. Rat peptide methionine sulphoxide reductase: cloning of the cDNA, and down-regulation of gene expression and enzyme activity during aging. *Biochem J* 2001;355(Pt 3):819-25.

Pichler RH, Bassuk JA, Hugo C, et al. SPARC is expressed by mesangial cells in experimental mesangial proliferative nephritis and inhibits platelet-derived-growth-factor-mediated mesangial cell proliferation in vitro. *Am J Pathol* 1996;148(4):1153-67.

Price MA, Cruzalegui FH, Treisman R. The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate Ternary Complex Factors and c-fos transcription in response to UV light. *Embo J* 1996;15(23):6552-63.

Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 1995;270(13):7420-6.

Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derjard B, Davis RJ. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 1996;16(3):1247-55.

Raz A, Wyche A, Siegel N, Needleman P. Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin-1. *J Biol Chem* 1988;263(6):3022-8.

Reichert J, Schachtschabel DO. Energetic stress induces premature aging of diploid human fibroblasts (WI-38) in vitro. *Arch Gerontol Geriatr* 2001;32(3):219-31.

- Reynolds CH, Nebreda AR, Gibb GM, Utton MA, Anderton BH. Reactivating kinase/p38 phosphorylates tau protein in vitro. *J Neurochem* 1997;69(1):191-8.
- Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975;6(3):331-43.
- Rheinwald JG, Hahn WC, Ramsey MR, et al. A two-stage, p16(INK4A)- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status. *Mol Cell Biol* 2002;22(14):5157-72.
- Ristimaki A, Garfinkel S, Wessendorf J, Maciag T, Hla T. Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 alpha. Evidence for post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* 1994;269(16):11769-75.
- Robles SJ, Adami GR. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 1998;16(9):1113-23.
- Rockwell P, Martinez J, Papa L, Gomes E. Redox regulates COX-2 upregulation and cell death in the neuronal response to cadmium. *Cell Signal* 2004;16(3):343-53.
- Rodemann HP, Bayreuther K, Francz PI, Dittmann K, Albiez M. Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro. *Exp Cell Res* 1989;180(1):84-93.
- Roth GS, Lane MA, Ingram DK, et al. Biomarkers of caloric restriction may predict longevity in humans. *Science* 2002;297(5582):811.
- Ruan H, Tang XD, Chen ML, et al. High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(5):2748-53.
- Saretzki G, Feng J, von Zglinicki T, Villeponteau B. Similar gene expression pattern in senescent and hyperoxic-treated fibroblasts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1998;53(6):B438-42.
- Saretzki G, Sitte N, Merkel U, Wurm RE, von Zglinicki T. Telomere shortening triggers a p53-dependent cell cycle arrest via accumulation of G-rich single stranded DNA fragments. *Oncogene* 1999;18(37):5148-58.
- Schenk H, Klein M, Erdbrugger W, Droge W, Schulze-Osthoff K. Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(5):1672-6.
- Schwarze MM, Hawley RG. Prevention of myeloma cell apoptosis by ectopic bcl-2 expression or interleukin 6-mediated up-regulation of bcl-xL. *Cancer Res* 1995;55(11):2262-5.
- Selinsky BS, Gupta K, Sharkey CT, Loll PJ. Structural analysis of NSAID binding by prostaglandin H2 synthase: time-dependent and time-independent inhibitors elicit identical enzyme conformations. *Biochemistry* 2001;40(17):5172-80.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997;88(5):593-602.
- Seto NO, Hayashi S, Tener GM. Overexpression of Cu-Zn superoxide dismutase in *Drosophila* does not affect life-span. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(11):4270-4.
- Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1(1):72-6.
- Sheng H, Shao J, Kirkland SC, et al. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1997;99(9):2254-9.

Sheng H, Williams CS, Shao J, Liang P, DuBois RN, Beauchamp RD. Induction of cyclooxygenase-2 by activated Ha-ras oncogene in Rat-1 fibroblasts and the role of mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 1998;273(34):22120-7.

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

Shimasaki H, Nozawa T, Privett OS, Anderson WR. Detection of age-related fluorescent substances in rat tissues. *Arch Biochem Biophys* 1977;183(2):443-51.

Sigal SH, Rajvanshi P, Gorla GR, et al. Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *Am J Physiol* 1999;276(5 Pt 1):G1260-72.

Sitte N, Huber M, Grune T, et al. Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts. *Faseb J* 2000;14(11):1490-8.

Sitte N, Merker K, Von Zglinicki T, Davies KJ, Grune T. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II—aging of nondividing cells. *Faseb J* 2000;14(15):2503-10.

Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280(1):C53-60.

Smith T, Leipprandt J, DeWitt D. Purification and characterization of the human recombinant histidine-tagged prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Arch Biochem Biophys* 2000;375(1):195-200.

Sohal RS. The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status. *Aging (Milano)* 1993;5(1):3-17.

Sohal RS, Brunk UT. Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and aging. *Adv Exp Med Biol* 1989;266:17-26; discussion 7-9.

Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer, II, Smith WL. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem* 1998;273(16):9886-93.

Stadtman ER. Role of oxidized amino acids in protein breakdown and stability. *Methods Enzymol* 1995;258:379-93.

Stampfer MR, Garbe J, Levine G, Lichtsteiner S, Vasserot AP, Yaswen P. Expression of the telomerase catalytic subunit, hTERT, induces resistance to transforming growth factor beta growth inhibition in p16INK4A(-) human mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(8):4498-503.

Staveley BE, Phillips JP, Hilliker AJ. Phenotypic consequences of copper-zinc superoxide dismutase overexpression in *Drosophila melanogaster*. *Genome* 1990;33(6):867-72.

Stein GH, Dulic V. Molecular mechanisms for the senescent cell cycle arrest. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1998;3(1):14-8.

Stewart SA, Ben-Porath I, Carey VJ, O'Connor BF, Hahn WC, Weinberg RA. Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence. *Nat Genet* 2003;33(4):492-6.

Storz G, Tartaglia LA, Ames BN. The OxyR regulon. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1990;58(3):157-61.

Sun J, Tower J. FLP recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies. *Mol Cell Biol*

1999;19(1):216-28.

Suzuki T, Minagawa S, Michishita E, et al. Induction of senescence-associated genes by 5-bromodeoxyuridine in HeLa cells. *Exp Gerontol* 2001;36(3):465-74.

Takai H, Smogorzewska A, de Lange T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* 2003;13(17):1549-56.

Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *J Natl Cancer Inst* 1998;90(20):1529-36.

Tan Y, Rouse J, Zhang A, Cariaty S, Cohen P, Comb MJ. FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *Embo J* 1996;15(17):4629-42.

Tang JR, Nakamura M, Okura T, et al. Mechanism of oxidative stress-induced GADD153 gene expression in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290(4):1255-9.

Tatar M, Khazaeli AA, Curtsinger JW. Chaperoning extended life. *Nature* 1997;390(6655):30.

Tesco G, Vergelli M, Grassilli E, et al. Growth properties and growth factor responsiveness in skin fibroblasts from centenarians. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244(3):912-6.

Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279(6):L1005-28.

Tice RR, Schneider EL, Kram D, Thorne P. Cytokinetic analysis of the impaired proliferative response of peripheral lymphocytes from aged humans to phytohemagglutinin. *J Exp Med* 1979;149(5):1029-41.

Toussaint O, Houbion A, Remacle J. Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. II. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture. *Mech Ageing Dev* 1992;65(1):65-83.

Toussaint O, Medrano EE, von Zglinicki T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* 2000;35(8):927-45.

Toussaint O, Remacle J, Dierick JF, et al. Approach of evolutionary theories of ageing, stress, senescence-like phenotypes, calorie restriction and hormesis from the view point of far-from-equilibrium thermodynamics. *Mech Ageing Dev* 2002;123(8):937-46.

Toussaint O, Remacle J, Dierick JF, et al. From the Hayflick mosaic to the mosaics of ageing. Role of stress-induced premature senescence in human ageing. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34(11):1415-29.

Tresini M, Mawal-Dewan M, Cristofalo VJ, Sell C. A phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor induces a senescent-like growth arrest in human diploid fibroblasts. *Cancer Res* 1998;58(1):1-4.

Trielli MO, Andreassen PR, Lacroix FB, Margolis RL. Differential Taxol-dependent arrest of transformed and nontransformed cells in the G1 phase of the cell cycle, and specific-related mortality of transformed cells. *J Cell Biol* 1996;135(3):689-700.

Trifan OC, Smith RM, Thompson BD, Hla T. Overexpression of cyclooxygenase-2 induces cell cycle arrest. Evidence for a prostaglandin-independent mechanism. *J Biol Chem* 1999;274(48):34141-7.

Tsuboi K, Sugimoto Y, Ichikawa A. Prostanoid receptor subtypes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:535-56.

- Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995;83(3):493-501.
- van Oirschot BA, Stahl M, Lens SM, Medema RH. Protein kinase A regulates expression of p27(kip1) and cyclin D3 to suppress proliferation of leukemic T cell lines. *J Biol Chem* 2001;276(36):33854-60.
- Vane JR. COX-2 inhibitors: background knowledge for clinical use. Introduction. *Inflamm Res* 1998;47 Suppl 2:S77.
- Varani J, Warner RL, Gharaee-Kermani M, et al. Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *J Invest Dermatol* 2000;114(3):480-6.
- Vaziri H, Benchimol S. From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp Gerontol* 1996;31(1-2):295-301.
- Vile GF, Basu-Modak S, Waltner C, Tyrrell RM. Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(7):2607-10.
- Volkert MR, Landini P. Transcriptional responses to DNA damage. *Curr Opin Microbiol* 2001;4(2):178-85.
- Volonte D, Galbiati F, Pestell RG, Lisanti MP. Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr(14)) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress. *J Biol Chem* 2001;276(11):8094-103.
- Volonte D, Zhang K, Lisanti MP, Galbiati F. Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. *Mol Biol Cell* 2002;13(7):2502-17.
- von Zglinicki T. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000;908:99-110.
- von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 2002;27(7):339-44.
- von Zglinicki T, Saretzki G, Docke W, Lotze C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res* 1995;220(1):186-93.
- Wagenaar-Miller RA, Hanley G, Shattuck-Brandt R, et al. Cooperative effects of matrix metalloproteinase and cyclooxygenase-2 inhibition on intestinal adenoma reduction. *Br J Cancer* 2003;88(9):1445-52.
- Wahl GM, Carr AM. The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat Cell Biol* 2001;3(12):E277-86.
- Wang X, Flynn A, Waskiewicz AJ, et al. The phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF4E in response to phorbol esters, cell stresses, and cytokines is mediated by distinct MAP kinase pathways. *J Biol Chem* 1998;273(16):9373-7.
- Wang XS, Diener K, Manthey CL, et al. Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997;272(38):23668-74.
- Wang XZ, Ron D. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science* 1996;272(5266):1347-9.
- Waxman AB, Einarsson O, Seres T, et al. Targeted lung expression of interleukin-11 enhances

- murine tolerance of 100% oxygen and diminishes hyperoxia-induced DNA fragmentation. *J Clin Invest* 1998;101(9):1970-82.
- Waxman AB, Mahboubi K, Knickelbein RG, et al. Interleukin-11 and interleukin-6 protect cultured human endothelial cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29(4):513-22.
- Webley K, Bond JA, Jones CJ, et al. Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. *Mol Cell Biol* 2000;20(8):2803-8.
- Webster NR, Nunn JF. Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *Br J Anaesth* 1988;60(1):98-108.
- Weinberg RA. E2F and cell proliferation: a world turned upside down. *Cell* 1996;85(4):457-9.
- Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, et al. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat Genet* 1997;17(4):498-502.
- Weng NP, Hathcock KS, Hodes RJ. Regulation of telomere length and telomerase in T and B cells: a mechanism for maintaining replicative potential. *Immunity* 1998;9(2):151-7.
- Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* 2000;355(9204):646-8.
- Wiman KG. p53: emergency brake and target for cancer therapy. *Exp Cell Res* 1997;237(1):14-8.
- Wolf FI, Torsello A, Covacci V, et al. Oxidative DNA damage as a marker of aging in WI-38 human fibroblasts. *Exp Gerontol* 2002;37(5):647-56.
- Wong H, Riabowol K. Differential CDK-inhibitor gene expression in aging human diploid fibroblasts. *Exp Gerontol* 1996;31(1-2):311-25.
- Wu D, Mura C, Beharka AA, et al. Age-associated increase in PGE<sub>2</sub> synthesis and COX activity in murine macrophages is reversed by vitamin E. *Am J Physiol* 1998;275(3 Pt 1):C661-8.
- Xu D, Neville R, Finkel T. Homocysteine accelerates endothelial cell senescence. *FEBS Lett* 2000;470(1):20-4.
- Yang H, Kyo S, Takatura M, Sun L. Autocrine transforming growth factor beta suppresses telomerase activity and transcription of human telomerase reverse transcriptase in human cancer cells. *Cell Growth Differ* 2001;12(2):119-27.
- Yao KS, Xanthoudakis S, Curran T, O'Dwyer PJ. Activation of AP-1 and of a nuclear redox factor, Ref-1, in the response of HT29 colon cancer cells to hypoxia. *Mol Cell Biol* 1994;14(9):5997-6003.
- Yen TC, King KL, Lee HC, Yeh SH, Wei YH. Age-dependent increase of mitochondrial DNA deletions together with lipid peroxides and superoxide dismutase in human liver mitochondria. *Free Radic Biol Med* 1994;16(2):207-14.
- Yeo EJ, Hwang YC, Kang CM, et al. Senescence-like changes induced by hydroxyurea in human diploid fibroblasts. *Exp Gerontol* 2000;35(5):553-71.
- Zahner G, Wolf G, Ayoub M, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits platelet-derived growth factor-induced mesangial cell proliferation through induction of the tumor suppressor gene p53 and the cyclin-dependent kinase inhibitors p21waf-1/cip-1 and p27kip-1. *J Biol Chem* 2002;277(12):9763-71.
- Zeng G, Millis AJ. Differential regulation of collagenase and stromelysin mRNA in late passage



cultures of human fibroblasts. *Exp Cell Res* 1996;222(1):150-6.

Zhan Q, Lord KA, Alamo I, Jr., et al. The gadd and MyD genes define a novel set of mammalian genes encoding acidic proteins that synergistically suppress cell growth. *Mol Cell Biol* 1994;14(4):2361-71.

Zhang H, Xiong Y, Beach D. Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Biol Cell* 1993;4(9):897-906.

# **Annexe**

Annexe: Liste de gènes représentés sur le damier à ADN "Dualchip Human Aging"

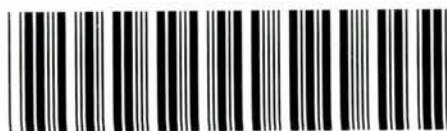
Symbol	Gene	Fonction générale
ADAM1	A disintegrin and metalloproteinase domain 1	Matrice extracellulaire
ADPRT	polysynthetase	Réparation ADN
ANX1	Annexin1	Différentiation (Kératinocyte)
AOP2	Anti-oxidant-protein2	Système de défense
APOE	ApolipoproteinE	Matrice extracellulaire
APOJ	ApolipoproteinJ	Système de défense
AREG	Amphiregulin	Facteur de croissance
ATM	Ataxia telangiectasia mutated	Cycle cellulaire/ duplication ADN
BAT1	Nuclear-RNA-helicase	Réparation ADN
BAX	BCL2-associated X protein	Apoptose (+)
BCL2	B-cell lymphoma2	Apoptose (-)
BCLX	BCLX	Apoptose (-)
BMP2	Bone morphogenetic protein2	Apoptose
BRCA2	Breast cancer2	Cycle cellulaire/ duplication ADN
CANX	calnexin	Cycle cellulaire/ duplication ADN
CASP7	caspase7	Apoptose (+)
CASP8	Caspase8	Apoptose (+)
CCNA1	cyclinA1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
23kd	23KDa Highly basic protein	HouseKeeping gene
CCNB1	cyclinB1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
CCND1	cyclinD1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
CCND2	cyclinD2	Cycle cellulaire/ duplication ADN
CCND3	cyclinD3	Cycle cellulaire/ duplication ADN
CCNE1	CyclinE	Cycle cellulaire/ duplication ADN
CCNF	CyclinF	Cycle cellulaire/ duplication ADN
CCNG	CyclinG	Apoptose
CCNH	cyclinH	Cycle cellulaire/ duplication ADN
CDC42	Cell division cycle42	Morphologie
CDK2	Cyclin dependent kinase2	Cycle cellulaire/ duplication ADN
CDK4	Cyclin dependent kinase4	Cycle cellulaire/ duplication ADN
CENPA	centromere-protein-A	Organisation chromosomique
CENPF	mitosin	Organisation chromosomique
C-FOS	c-fos	Cycle cellulaire/ duplication ADN
CKB	creatin-kinase-brain	Métabolisme énergétique
COL15A1	collagenXV-alpha1	Matrice extracellulaire
COL1A1	Collagen1-alpha1	Matrice extracellulaire
Aldo	Aldolase A	HouseKeeping gene
COL3A1	collagenIII-alpha1	Matrice extracellulaire
COL6A2	collagenVI-alpha2	Matrice extracellulaire
COX1	Prostaglandin endoperoxidase synthase1	Inflammation
COX2	Prostaglandin endoperoxidase synthase2	Inflammation
Tubu	Alpha-tubulin	HouseKeeping gene
CROC1A	Ubiquitin conjugating enzyme E2 variant1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
CST6	cystatin-M	Matrice extracellulaire
CTGF	Connective tissue growth factor	Cycle cellulaire/ duplication ADN
CTSD	cathepsinD	Matrice extracellulaire
CTSH	cathepsinH	Matrice extracellulaire
CTSS	cathepsinS	Matrice extracellulaire
CTSZ	cathepsinZ	Matrice extracellulaire
CYT2A	Keratin2	Différentiation (Kératinocyte)
DHFR	Dihydrofolate reductase	Cycle cellulaire/ duplication ADN
DPT	dermatopontin	Matrice extracellulaire
DSG1	desmoglein1	Différentiation (Kératinocyte)
E2F1	E2F transcription factor1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
E2F5	E2F transcription factor5	Cycle cellulaire/ duplication ADN
EAR1	Nuclear receptor subfamily1, group D, member 1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
EF1A	Eukaryotic translation elongation factor-alpha1	Organisation chromosomique
EGR1	Early growth response1	Système de défense
EGR2	Early growth response2	Cycle cellulaire/ duplication ADN
EGR3	Early growth response3	Système de défense
EIF-4A	Eukaryotic translation initiation factor 4A	Traduction
ACTB	Beta-Actin	HouseKeeping gene
ELN	elastin	Matrice extracellulaire
EPC1	Enhancer of polycomb1	Cycle cellulaire/ duplication ADN

ETFB	electron-transfert-flavoprotein-beta	Métabolisme énergétique
EWSR1	Ewing sarcoma breakpoint region1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
FE65	Fe65	Apoptose
FES	Feline sarcoma oncogene	Cycle cellulaire/ duplication ADN
FLG	flaggrin	Différentiation (Kératinocyte)
FMOD	fibromodulin	Matrice extracellulaire
FN1	fibronectin	Matrice extracellulaire
G6PD	glucose-6-phosphate-dehydrogenase	Métabolisme énergétique
GAA	glucosidase-II-precursor	Métabolisme énergétique
GADD153	DNA damage inducible transcript3	Réparation ADN
GLB1	Beta1-galactosidase	Différentiation (Kératinocyte)
GMCSF	Colony stimulating factor2	Facteur de croissance
GPX	glutathione peroxidase	Système de défense
GRB2	Growth factor receptor-bound protein2	Système de défense
GSTP1	Glutathione S-transferase pi	Système de défense
GSTT1	Glutathione S-transferase theta1	Système de défense
H2B/S	histone2b member B/S consensus	Cycle cellulaire/ duplication ADN
H4FM	histone4 member M consensus	Cycle cellulaire/ duplication ADN
HBEGF	Heparin binding epidermal GF transcript	Facteur de croissance
HLF	Hepatic leukemia factor	Système de défense
HMOX	heme-oxygenase	Système de défense
HSP27	Heat shock 27kD protein1	Système de défense
HSP40	Heat shock 40kD protein1	Système de défense
HSP70	Heat shock 70kD protein1	Système de défense
HSP70B	Heat shock 70kD protein6	Système de défense
cyc	Cyclophilin 33A	HouseKeeping gene
HSP90-alpha	Heat shock 90kD protein1 alpha	Système de défense
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule1	Matrice extracellulaire
ID1	Inhibitor of DNA binding1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
ID2	Inhibitor of DNA binding2	Cycle cellulaire/ duplication ADN
IFNG	Interferon gamma	Cytokine
IGF1	Insulin like growth factor1	Facteur de croissance
IGF1R	Insulin like growth factor1 receptor	Facteur de croissance
IGFBP2	Insulin growth factor binding protein2	Facteur de croissance
IGFBP3	Insulin growth factor binding protein3	Facteur de croissance
IGFBP5	Insulin growth factor binding protein5	Facteur de croissance
IL10	Interleukin 10	Cytokine
IL11	Interleukin 11	Cytokine
IL11RA	Interleukin 11-receptor-alpha	Cytokine
IL12	Interleukin 12	Cytokine
IL15	Interleukin 15	Cytokine
GAPD	Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase	HouseKeeping gene
IL1A	Interleukin1 alpha	Cytokine
IL1B	Interleukin1 beta	Cytokine
IL2	Interleukin 2	Cytokine
IL3	Interleukin 3	Cytokine
IL4	Interleukin 4	Cytokine
IL6	Interleukin 6	Cytokine
IL8	Interleukin 8	Cytokine
INT6	Translation initiation factor3 subunit6	Morphologie
IVL	invokucin	Différentiation (Kératinocyte)
JNK1	Mitogen activated protein kinase8	Système de défense
JNK2	Mitogen activated protein kinase9	Système de défense
JNKK1	Mitogen activated protein kinase kinase 4	Système de défense
JUND	Jun D proto-oncogene	Système de défense
KNLSL5	mitotic-kinesin-like-protein1	Organisation chromosomique
KNLSL6	mitotic-centromere-associated-kinesin	Organisation chromosomique
KRT1	keratin1	Différentiation (Kératinocyte)
HK1	Hexokinase 1	HouseKeeping gene
KRT10	keratin10	Différentiation (Kératinocyte)
KRT14	keratin14	Différentiation (Kératinocyte)
KRT16	keratin16	Différentiation (Kératinocyte)
KRT17	keratin17	Différentiation (Kératinocyte)
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HouseKeeping gene
KRT19	Keratin19	Différentiation (Kératinocyte)
KRT6A	Keratin6	Différentiation (Kératinocyte)
MAX	MAX protein	Cycle cellulaire/ duplication ADN
MCM2	Méiotin	Réparation ADN
MDM2	MDM2	Cycle cellulaire/ duplication ADN

MEK1	Mitogen activated protein kinase kinase1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
MEK2	Mitogen activated protein kinase kinase2	Cycle cellulaire/ duplication ADN
MMP1	matrix metalloproteinase 1	Matrice extracellulaire (Dégradation)
MMP10	matrix metalloproteinase 10	Matrice extracellulaire (Dégradation)
MMP11	matrix metalloproteinase 11	Matrice extracellulaire (Dégradation)
MMP12	matrix metalloproteinase 12	Matrice extracellulaire (Dégradation)
MMP13	matrix metalloproteinase 13	Matrice extracellulaire (Dégradation)
MMP14	matrix metalloproteinase 14	Matrice extracellulaire (Dégradation)
MMP15	matrix metalloproteinase 15	Matrice extracellulaire (Dégradation)
MMP2	matrix metalloproteinase 2	Matrice extracellulaire (Dégradation)
MMP3	matrix metalloproteinase 3	Matrice extracellulaire (Dégradation)
MMP7	matrix metalloproteinase 7	Matrice extracellulaire (Dégradation)
MDH	Malate dehydrogenase 1	HouseKeeping gene
MP1	Metalloprotease1	Matrice extracellulaire (Dégradation)
MSRA	methionine-sulfoxide-reductase A/peptide	Réparation protéines
MT2A	metallothionein 2A	Système de défense
MVK	mevalonate-kinase	Transduction du signal
MYBL2	b-myb	Cycle cellulaire/ duplication ADN
MYC	c-myc	Cycle cellulaire/ duplication ADN
NCK1	NCK adaptor protein1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
NF1	neurofibromin1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
NGFR	nerve growth factor receptor	Système de défense
ODC	Ornithine decarboxylase1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
OPG	osteoprotegerin	Matrice extracellulaire
OPN	osteopontin	Migration
Oste	osteonectin	Matrice extracellulaire
p16	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A	Cycle cellulaire (-)
p21	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	Cycle cellulaire (-)
p27	Cyclin dependent kinase inhibitor 1B	Cycle cellulaire (-)
p35	CDK 5 regulatory subunit1	Cycle cellulaire (-)
p53	Tumor protein p53	Cycle cellulaire (-)
p57	Cyclin dependent kinase inhibitor 1C	Cycle cellulaire (-)
PAI1	plasminogen activator inhibitor type1	Matrice extracellulaire
PAI2	plasminogen activator inhibitor type2/Urokinase inhibitor	Matrice extracellulaire
PAK	P21 activated kinase1	Morphologie
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	Cycle cellulaire/ duplication ADN
PKM2	pyruvate-kinase-muscle	Métabolisme énergétique
PLAU	urokinase	Matrice extracellulaire
PLAUR	urokinase-receptor	Matrice extracellulaire
PLK	Polo-like kinase	Cycle cellulaire/ duplication ADN
PLA2	Phospholipase A2	HouseKeeping gene
POLA2	Polymerase alpha	Cycle cellulaire/ duplication ADN
PRSS11	Protease serine11	Dégradation protéique
PSMA2	proteasome subunit, alpha type, 2	Dégradation protéique
PSMA3	proteasome subunit, alpha type, 3	Dégradation protéique
PSMC6	proteasome 26S subunit, non-ATPase, 6	Dégradation protéique
PSMD1	proteasome 26S subunit, non-ATPase, 1	Dégradation protéique
PSMD11	proteasome 26S subunit, non-ATPase, 11	Dégradation protéique
PSMD12	proteasome 26S subunit, non-ATPase, 12	Dégradation protéique
RAF1	c-raf-1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
RANTES	Small inducible cytokine A5	cytokine
RB1	Retinoblastome1	Cycle cellulaire (-)
RET	ret protooncogene	Cycle cellulaire/ duplication ADN
ROR1	R AR related orphan receptorA	Cycle cellulaire/ duplication ADN
RPL3	60S-ribosomal-proteinL3	Traduction
S9	Ribosomal Proteine S9	HouseKeeping gene
RPS10	ribosomal-protein S10	Traduction
RRAS	R-ras	Cycle cellulaire/ duplication ADN
RRM1	ribonucleotide-reductase M1	Cycle cellulaire/ duplication ADN
S100A10	Calpactin1	Differentiation (Kératinocyte)
S100A11	Calgizzarin	Differentiation (Kératinocyte)
S100A8	calprotectin	Inflammation
SHC	SHC transforming protein1	Apoptose
SLK	Ste-20-related serine/threonine kinase	Apoptose
SLP2	Stomatin like protein2	Cycle cellulaire/ duplication ADN
SM22	transgelin	Developpement muscle
SMAD1	Mother against decapentalplegic homol1	Morphologie
SNCG	synuclein	Cycle cellulaire/ duplication ADN
SDS	Serine Dehydratase	HouseKeeping gene

SOD2	Superoxide dismutase2	Système de défense
SPRR1B	comifin	Différentiation (Kératinocyte)
SRI	sorcin	Système de défense
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5A	Cycle cellulaire/ duplication ADN
TBXA2R	Thromboxane-A2-receptor	Cycle cellulaire/ duplication ADN
TERC	telomerase-RNA	Cycle cellulaire/ duplication ADN
TERT	telomerase-reverse transcriptase	Cycle cellulaire/ duplication ADN
TFAP2A	Transcription factor AP2-alpha	Cycle cellulaire/ duplication ADN
TFAP2B	Transcription factor AP2-beta	Cycle cellulaire/ duplication ADN
TFAP2C	Transcription factor AP2-gamma	Cycle cellulaire/ duplication ADN
TGFA	TGF-alpha	Facteur de croissance
TGFB1	TGF-beta1	Facteur de croissance
TGFBR2	TGF-beta-R2	Facteur de croissance
TGM1	transglutaminase1	Différentiation (Kératinocyte)
TH	Tyrosine-hydroxylase	Traduction
THBS1	Thrombospondin	Matrice extracellulaire
TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinase1	Matrice extracellulaire
TIMP2	Tissue inhibitor of metalloproteinase2	Matrice extracellulaire
TK1	thymidine-kinase	Cycle cellulaire/ duplication ADN
TNFA	tumor necrosis factor alpha	Apoptose/inflammation
TFR	Transferrin receptor	HouseKeeping gene
TNFB	tumor necrosis factor beta	Apoptose/inflammation
TNFRSF1A	TNF-alpha-R1	Apoptose/inflammation
TNFRSF1B	TNF-alpha-RII	Apoptose/inflammation
TYMS	thymidylate-synthetase	Cycle cellulaire/ duplication ADN
UBE2C	Ubiquitin conjugating enzyme E2C/ubiquitin carrier	Dégradation protéique
VEGFC	Vascular endothelial growth factor C	Cycle cellulaire/ duplication ADN
VEGFR1	Vascular endothelial growth factor receptor1	Cycle cellulaire/ duplication ADN

f



20.026.464

