Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

**DOCTEUR EN SCIENCES**

# Etude des mécanismes moléculaires de la sénescence cellulaire induite prématurément par un stress subcytotoxique oxydatif sous peroxyde d'hydrogène

Frippiat, Christophe

*Award date:*
2002

*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.

Download date: 02. May. 2026

Facultés
Universitaires
Notre-Dame
de la Paix

# Etude des mécanismes moléculaires de la sénescence cellulaire induite prématurément par un stress subcytotoxique oxydatif sous peroxyde d'hydrogène

Faculté des Sciences

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Dissertation présentée par
Christophe FRIPPIAT
en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences

2002

2002/

PRESSES UNIVERSITAIRES DE NAMUR

FT B 3 / 2002 / 16

FACULTES
UNIVERSITAIRES
N.-D. DE LA PAIX
NAMUR

Bibliothèque

**Presses universitaires de Namur & Christophe Frippiat**
**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 : 2-87037-372-2**

VM G021

FUNDP
Facultés des Sciences
Laboratoire de Biochimie et de Biologie Cellulaire

Rue de Bruxelles, 61
B-5000 Namur
Belgique

# Etude des mécanismes moléculaires de la sénescence cellulaire induite prématurément par un stress subcytotoxique oxydatif sous peroxyde d'hydrogène

Christophe Frippiat

**Promoteur : Dr. O. Toussaint**

Dissertation présentée
pour l'obtention du diplôme de
Docteur en sciences

LBS 94247 38

*Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de biologie cellulaire et de biochimie, au sein des Facultés Universitaires Notre -Dame de la Paix de Namur sous la direction des Professeurs Remacle J. et Raes M. Je tiens à les remercier pour avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de cette thèse.*

*Je remercie plus particulièrement Olivier Toussaint pour sa disponibilité et son aide constante. Je lui suis profondément reconnaissant pour m'avoir encadré et encouragé lors de ce parcours. Le côtoyer tous les jours aura été particulièrement stimulant et aura permis de nombreux échanges d'idées, de points de vue sans oublier de quelques blagues bien senties.*

*Je remercie vivement Monsieur le Docteur Flamion., Madame Abbadie et Madame Butler-Browne pour l'honneur qu'ils me font en jugeant ce travail.*

*Je voudrais également exprimer mon amitié à l'ensemble de l'équipe des GRAS.Pat, Thierry, Jean-Jean, Véro, Steph., je pense qu'il sera difficile de retrouver une équipe aussi soudée sachant aussi bien jouer au volley que manier autant de techniques de biomol.*
*Vous connaître m'aura apporté beaucoup au niveau humain mais aussi dans la connaissance des restaurants namurois. Ils sont rares ceux qui n'ont pas appris à connaître notre bonne humeur.*

*J'aimerais aussi remercier tous les anciens qui peu à peu ont construit ce laboratoire et y font régner une bonne ambiance inimitable.*

*Un grand merci aux filles du bureau pour avoir accueilli le gamin.*

*Merci à toi Janique qui m'a soutenu et encouragé. Nombreux sont les samedis et dimanches où tu m'as attendu, où tu m'as aidé à finir une manip. à temps. Finalement, le labo. C'est aussi une sorte d'agence matrimoniale.*

*A ma famille pour sa patiente relecture de mes déblatérations scientifiques parfois incompréhensibles.*

*Plus de quatre ans après mon arrivée au sein du labo., je ne regrette rien grace à vous tous qui avez rendu ce travail un vrai plaisir.*

*Finalement, les remerciements, c'est beaucoup plus gai à écrire qu'une conclusion !*

*Ah oui, j'oublie notre mécène à beaucoup, le FRIA qui encourage et soutient la recherche fondamentale et sans lequel rien ne serait arrivé.*

# Study of the molecular mechanisms of the premature senescence induced by subcytotoxic oxidative stress with hydrogen peroxide

Frippiat Christophe

Summary :

Exposure of human dipoid fibroblasts to subcytotoxic oxidative stress induces the appearance of several biomarkers of replicative senescence like senescent-associated ß-galactosidase SA ß-gal), senescent morphology, cell cycle arrest and retinoblastoma protein (Rb) hypophosphorylation. This led to the concept of stress-induced premature senescence (SIPS).

In this work, we have studied the molecular mechanisms responsible for the appearance of several biomarkers of the replicative senescence after stress like SA ß-galactosidase, senescent morphology, cell cycle arrest and overexpression of fibronectin, osteonectin, apolipoprotein J and SM22.

We showed that treatment of IMR-90 HDFs with $H_2O_2$ at subcytotoxic level leads to the activation of the $p38^{Mapk}$ signalling cascade, activation of transcription factor ATF-2, which in turn induces the overexpression and the release of TGF-ß1 protein in the culture medium.
Then TGF-ß1 released in the medium keeps $p38^{Mapk}$ activated. Concomitantly, the retinoblastoma protein (Rb) becomes hypophosphorylated and physically binds ATF-2. This second step is responsible for the appearance of the biomarkers of senescence. Neutralization of the TGF-ß1 release, using antibodies added in the medium, or the degradation of Rb due to overexpression of the papillomavirus protein E7 allows to block the appearance of SA-ß-galactosidase activity, senescent-morphology and the overexpression of the four genes cited above but not the cell cycle arrest.

This work provides a strong basis for the explanation on how human diploid fibroblasts undergo stress-induced premature senescence after exposure to subcytotoxic $H_2O_2$ stress.

# Etude des mécanismes moléculaires de la sénescence cellulaire induite prématurément par un stress subcytotoxique oxydatif sous peroxyde d'hydrogène

Frippiat Christophe

Résumé :

L'exposition de fibroblastes humains diploïdes à des stress oxydatifs subcytotoxiques induit l'apparition de certains biomarqueurs de la sénescence réplicative tels que l'activité ß-galactosidase associée à la sénescence (SA ß-galactosidase), la morphologie sénescente, un arrêt du cycle cellulaire et l'hypophosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb). Cette observation a conduit au concept de sénescence induite prématurément par les stress (SIPS).

Dans ce travail, nous avons étudié les mécanismes moléculaires responsables de l'apparition de ces biomarqueurs de la sénescence réplicative suite à ces stress. Nous avons tenté de comprendre les mécanismes conduisant à l'apparition de la SA ß-galactosidase, la morphologie sénescente, l'arrêt du cycle cellulaire et la surexpression de l'ostéonectine, de la fibronectine, de l'apolipoprotéine J et de SM22.

Nous montrons que le traitement des fibroblastes humains diploïdes IMR-90 avec une dose subcytotoxique d'$H_2O_2$ active la cascade de la MAP kinase p38, ce qui active ensuite le facteur de transcription ATF-2. ATF-2 activé déclenche alors la surexpression et la libération dans le milieu de culture de TGF-ß1. Ce TGF-ß1 présent dans le milieu de culture maintient l'activation de la voie de p38. En même temps, Rb devient hypophosphorylée et se lie à ATF-2. Cette seconde étape est responsable de l'apparition des biomarqueurs de la sénescence suite au stress. La neutralisation du TGF-ß1 libéré dans le milieu de culture, par des anticorps ajoutés dans la milieu de culture, ou la dégradation de Rb due à la surexpression de l'oncoprotéine E7 du papillomavirus humain 16 permet de bloquer l'apparition de la SA ß-galactosidase, de la morphologie sénescente et la surexpression des 4 gènes cités ci-dessus.

Ce travail fournit donc une base pour expliquer comment des fibroblastes diploïdes humains entrent en sénescence induite prématurément par les stress sous $H_2O_2$ à une concentration subcytotoxique.

# Table des matières

# Introduction

**Chapitre 1: La sénescence réplicative** ..... 3

1.1 Définition et historique ..... 3

1.2 Le phénotype sénescent ..... 4

1.2.1 Modification de la morphologie cellulaire associée à la sénescence ..... 5
1.2.2 Potentiel prolifératif ..... 7
1.2.3 Modification histochimique: l'activité ß-galactosidase associée à la sénescence ..... 8
1.2.4 Altération du génome mitochondrial ..... 9
1.2.5 Variation de l'expression génique ..... 10
1.2.6 Raccourcissement télomérique ..... 11

1.3 régulation du cycle cellulaire chez les cellules sénescentes ..... 13

1.3.1 Expression des gènes de réponses immédiates ..... 13
1.3.2 Gènes exprimés en milieu de phase G1 (Mid-G1) ..... 14
1.3.3 Gènes transcrits lors de la transition G1/S et nécessaires à l'entrée en phase S (Late G1, G1/S) ..... 14
1.3.4 Les complexes cycline-CdK (Cyclin-dependent Kinase) ..... 15
1.3.4.1 Complexes cycline/CdK impliqués dans la régulation des différentes étapes du cycle cellulaire ..... 16
1.3.4.2 Les complexes cycline/CdK chez les cellules sénescentes ..... 17
1.3.5 Les inhibiteurs de complexes cycline-Cdk ..... 18
1.3.5.1 La famille Ink-4 ..... 18
1.3.5.2 La famille de p21 SDI/CPI/Waf ..... 19
1.3.6 p53 et la protéine du rétinoblastome (Rb) ..... 20
1.3.6.1 p53 ..... 20
1.3.6.2 Rb ..... 21

**Chapitre 2: Relation entre le vieillissement et la sénescence réplicative** ..... 24

**Chapitre 3: Théories de la sénescence réplicative et du vieillissement** ..... 26

3.1 Théorie télomérique de la sénescence réplicative ..... 26

3.2 Théorie stochastique des radicaux libres ..... 28

3.2.1 Radicaux dérivés de l'oxygènes ..... 28
3.2.2 Corrélation entre la production de ROI et la durée de vie ..... 30
3.2.2.1 Restriction calorique et ROIs ..... 30
3.2.3 Corrélation entre l'efficacité des mécanismes de défenses contre les ROI et la longévité ..... 31
3.2.3.1 Effet du vieillissement sur l'efficacité du système antioxydant ..... 32
3.2.4 Accumulation de déchets et de dégâts d'origines radicalaires ..... 32
3.2.4.1 La lipofuscine ..... 32
3.2.4.2 Accumulation de dommages à l'ADN ..... 33
3.2.4.3 Accumulation de protéines modifiées ..... 33

3.3 Télomères ou radicaux libres comme cause de la sénescence cellulaire?..... 34

3.4 Sénescence Induite Prématurément par les Stress (SIPS) ..... 35

3.4.1 Effets de stress oxydatifs subcytotoxiques sur le vieillissement des fibroblastes humains en culture..... 35
3.4.1.1 Variation de la pression partielle en oxygène..... 35
3.4.1.2 Utilisation du tert-butylhydroperoxyde..... 36
3.4.1.3 Exposition a du peroxyde d'hydrogène à des doses subcytotoxiques..... 37

**Chapitre 4 : Voies de transduction du signal déclenchées par le TGF-ß1**..... 40

4.1 La famille du TGF-ß: historique, description et fonction..... 40

4.2 Transduction du signal TGF-ß1..... 41

4.2.1 La voie des Smads..... 41
4.2.2 Voie des mitogen activated protein kinase..... 42

**But du travail**..... 45

# Résultats

**Chapitre 1: Niveau d'expression de gènes-clés dans la régulation du cycle cellulaire en SIPS: les CdKIs, les cyclines, cdKs, p53 et Rb**..... 49

1.1 Article 1: Cell cycle regulation in $H_2O_2$-induced premature senescence of human diploid fibroblasts and regulatory control exerted by the papillomavirus E6 and E7 proteins..... 49

1.2 Article 2: Down-regulation and decreased activity of cyclin-dependent kinase 2 in $H_2O_2$-induced premature senescence..... 64

**Chapitre 2: Vieillissement prématuré et TGF-ß1**..... 74

2.1 Article 3: Subcytotoxic $H_2O_2$ stress triggers a release of transforming growth factor ß1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts..... 75

2.1.1 Apparition de différents biomarqueurs de la sénescence suite à une stimulation sous TGF-ß1..... 75
2.1.2 Niveau d'expression du TGF-ß1 en SIPS..... 75

2.1.3 Neutralisation du TGF-ß1 et apparition des différents biomarqueurs de la sénescence ..... 75
2.1.4 Contrôle du niveau d'expression du TGF-ß1 par Rb ..... 76

**Chapitre 3: Transduction du signal TGF-ß1 et relation entre Rb et le TGF-ß1** ..... 84

3.1 Article 4: Signal transduction in $H_2O_2$-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts ..... 84

3.1.1 Identification de la voie de transduction du signal TGF-ß1 ..... 84
3.1.2 Implication du facteur de transcription ATF-2 en SIPS ..... 85
3.1.3 Interaction physique entre ATF-2 et Rb ..... 85

# Conclusion

**Chapitre 1: Régulation de la phosphorylation de Rb et rôle d'E2F en SIPS** ..... 100

1.1 Contrôle de la phosphorylation de Rb ..... 100

1.2 Contrôle de la surexpression de 4 gènes associés à la sénescence par Rb et p53 ..... 104

1.3 Rôle d'E2F en SIPS ..... 106

**Chapitre 2: Effet du TGF-ß1 sur l'apparition des biomarqueurs caractérisant la SIPS** ..... 108

**Chapitre 3: Voie d'action du TGF-ß1 et relation TGF-ß1-Rb** ..... 111

3.1 Comment le TGF-ß1 régule-t'il l'apparition des biomarqueurs de la sénescence en SIPS ? ..... 111

3.2 Relation entre Rb et la voie de $p38^{MAPK}$ ..... 113

**Chapitre 4: Sénescence induite prématurément par les stress sénescence réplicative et vieillissement *in vivo*** ..... 116

4.1 Cadre théorique : effets des stress sur le comportement cellulaire ..... 116

4.2 Deux types de sénescences? ..... 118

4.3 Le raccourcissement télomèrique et la SIPS ..... 120

4.4 Les cellules en SIPS peuvent-elles affecter le vieillissement tissulaire ..... 121

4.5 Les mots de la fin ..... 122

Bibliographie ..... 124

Annexe..... 144

# Abréviations

## Liste des abréviations

| | |
|---|---|
| 8-OH-dG | 8-hydroxydéoxyguanosine |
| ADN | acide déoxyribonucléique |
| ADNc | acide déoxyribonucléique complémentaire |
| ADNmt | ADN mitochondrial |
| AL | Ad Libitum |
| apo J | apolipoprotéine J |
| ARNm | acide ribonucléique messager |
| ATF-2 | activating transcription factor-2 |
| ATP | adénosine triphosphate |
| bHLH | basic-helix-loop-helix |
| BMP | bone morphogenic protein |
| bp | paire de base |
| CAK | CdK activating kinase |
| CdK | kinase dependente de cycline |
| CdKI | inhibiteur de CdK |
| CHO | ovaire d'hamster chinois |
| CPD | cumulative population doubling |
| DHFR | dihydrofolate réductase |
| DR | diet restriction |
| DRS | direct repeat sequences |
| EGF | epidermal growth factor |
| ERK | extracellular signal regulated kinase |
| FHDs | fibroblastes humains diploïdes |
| GDF | growth and differentiation factor |
| GPX | gluthation peroxidase |
| GSH | gluthation réduite |
| GSSG | gluthation oxydé |
| HDACs | histone dé-acétylase |
| $H_2O_2$ | peroxyde d'hydrogène |
| HPV | papillomavirus humain |
| hrs | heures |
| IGF | insuline like growth factor |
| IGF-BP | protéine de liaison à l'insuline like growth factor |
| IL | interleukine |
| JNK | jun amino terminal kinase |
| kb | kilobase |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase |
| MAPKKK | MKK kinase |
| MDM2 | mouse double minute 2 |
| MF | fibroblastes mitotiques |
| MKK | MAPK kinase |
| $NAD(P)^+$ | nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme oxydée) |
| NAD(P)H | nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite) |
| $NAD^+$ | nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée) |
| NADH | nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite) |
| $O_2$ | oxygène moléculaire |

| | |
|---|---|
| oxo$^{8}$Gua | 8-oxoguanine |
| PARP | poly (ADP-ribose) polymérase |
| PBN | α-phényl-t-butyl-nitrone |
| PCNA | proliferating cell nuclear antigen |
| PCR | réaction de polymérisation en chaîne |
| PDGF | platelet-derived growth factor |
| PI-3 kinase | phosphoinositide 3 kinase |
| PK | protéine kinase |
| PMF | fibroblastes post-mitotiques |
| Rb | protéine du rétinoblastome |
| ROI | espèce radicalaire dérivée de l'oxygène |
| RNR | ribonucléotide réductase |
| RT-PCR | transcription inverse suivie d'une PCR |
| SA ß-gal | senescence-associated-ß-galactosidase |
| SAPK | stress activated protein kinase |
| SIPS | stress induced premature senescence |
| SOD | superoxyde dismutase |
| SPARC | secreted protein acidic and rich in cysteine |
| SRE | serum responsive element |
| SRF | serum reponsive factor |
| SV40 | simian virus 40 |
| t-BHP | tert-butylhydroperoxyde |
| TF | facteur de transcription |
| TGF-ß | transforming growth-factor ß |
| TGF-ß RII | récepteur de type II au TGF-ß |
| TK | thymidine synthase |
| TM | machinerie transcriptionelle |
| TNF | tumor necrosis factor |
| TRF | fragment de restriction terminal |
| TS | thymidilate synthase |
| UV | ultra-violet |
| X-gal | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl ß-D-galactopyranosine |
| X.O. | xanthine oxydase |
| WS | syndrome de Werner |

# Introduction

# Chapitre 1: La sénescence réplicative.

## 1.1. Définition et historique.

Dès la fin du XIXe siècle, le postulat d'une relation entre le vieillissement de l'organisme et le vieillissement cellulaire a fait son apparition. Weismann, en effet, postulait déjà que des tissus ou organes blessés ne pourraient pas indéfiniment se réparer d'eux-mêmes car la capacité proliférative cellulaire est limitée. Il y aurait donc une relation entre la perte du potentiel prolifératif cellulaire et le vieillissement de l'organisme (Weismann, 1889).
Au début du XXe siècle, une nouvelle technique fit son apparition, révolutionna la biologie et permit l'exploitation du concept de la relation du vieillissement cellulaire comme cause du vieillissement de l'individu. Il s'agit de la culture cellulaire.

La première expérience réalisée fut celle d'Alexis Carrel. Celle-ci a eu un impact profond dans l'étude du vieillissement, mettant à mal l'hypothèse de Weismann. Carrel suggéra que les cellules sont immortelles et se divisent de manière infinie une fois retirées de l'organisme (Carrel, 1912). En effet, il parvint à maintenir en culture des cellules de cœur de poulet pendant 35 ans, de 1911 à 1946, durée de temps nettement supérieure à la longueur de vie du poulet. Des efforts répétés afin de vérifier les travaux de Carrel restèrent vains. Plusieurs dizaines d'années plus tard, différentes explications furent proposées. Entre autres, il a été suggéré que les milieux de culture constitués d'extraits d'embryons contenaient des cellules vivantes, qu'il était techniquement impossible à l'époque de retirer des extraits d'embryons. Ainsi, à chaque renouvellement de milieu, l'expérimentateur introduisait de nouvelles cellules dans la culture (Hayflick, 1977). Toutefois, l'idée que les cellules soient immortelles semblait passée dans les connaissances acquises et incontestables.
Il fallut donc attendre 1961 et de nombreuses expériences pour que Hayflick et Moorhead montrent que des fibroblastes de poumon fœtal humain, placés en culture, sont mortels.
Ils divisèrent la durée de vie de ces cellules en trois phases. La phase I correspond à la mise en culture des cellules à partir du tissu d'origine. Les cellules migrent à partir de l'explant et colonisent toute la surface de la boîte de culture. La phase II débute lorsque les cellules sont repiquées pour la première fois. Cette phase se caractérise par une prolifération rapide et vigoureuse. Durant la phase III, un déclin lent et progressif de la vitesse de croissance est observé. Enfin, toute division cellulaire cesse. C'est ce que l'on a appelé plus tard la sénescence réplicative. Ce stade non prolifératif se termine après une période plus ou moins longue par la mort des cellules (Hayflick, 1965; Hayflick and Moorehead, 1961) (Fig.1).

Toutefois, de nombreuses critiques ont été émises supposant que le vieillissement cellulaire observé par Hayflick n'est dû qu'à des erreurs de manipulations. Afin de déterminer si erreur il y avait, Hayflick et Moorhead ont mélangé et mis en culture

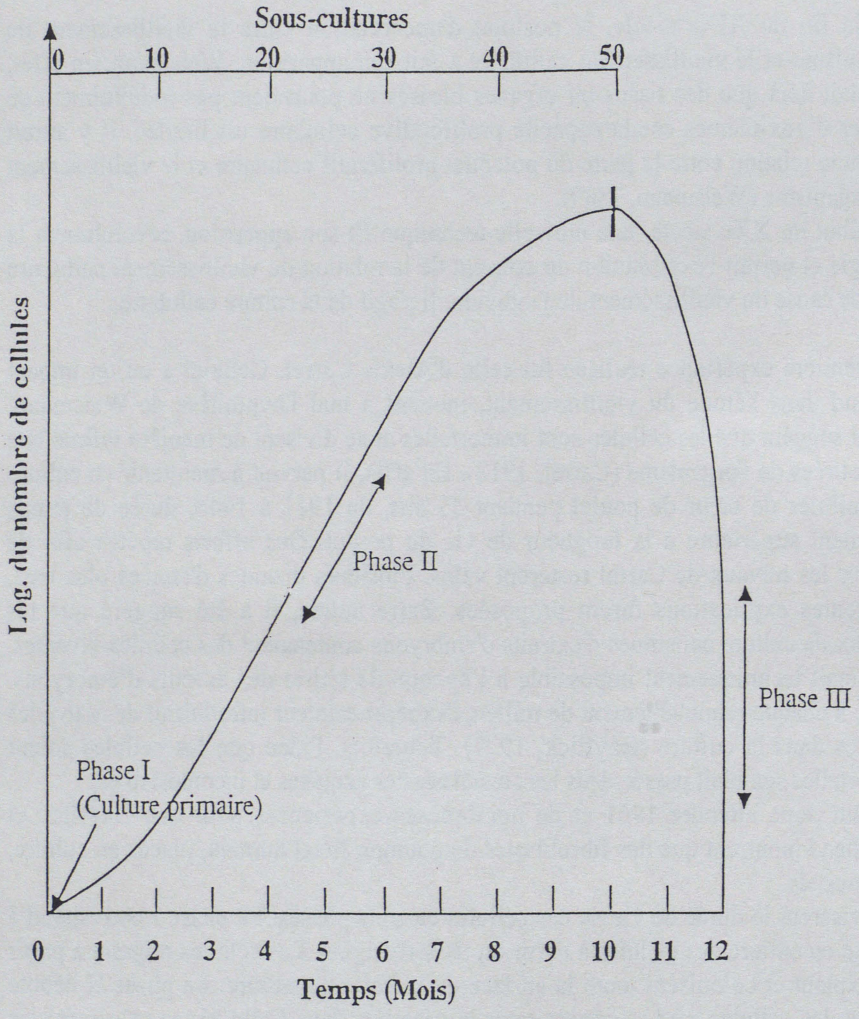



Fig. 1: Diagramme montrant les trois phases successives de la vie d'une culture de fibroblastes normaux (d'après Hayflick, 1977). La phase I se caractérise par la mise en culture d'un explant, la migration des cellules vers l'extérieur et l'établissement d'une première population de cellules. La phase II débute dès le premier repiquage et se caractérise par un taux de croissance exponentiel. Un ralentissement du rythme de croissance survient ensuite, suivi par un arrêt définitif des divisions cellulaires. Cet état de sénescence réplicative se termine, après une période plus ou moins longue, par la mort des cellules (phase III).

des cellules humaines mâles ayant déjà effectué 40 passages en culture et des cellules humaines femelles ayant réalisé 10 passages en culture. Sachant qu'il est facile de distinguer les cellules mâles des cellules femelles via le caryotype, ils ont pu déterminer la durée de vie de chacun des "types" cellulaires mis en culture dans des conditions parfaitement identiques. En parallèle, des cultures de cellules non-mélangées ont été maintenues. Après 10 doublements de population cumulatifs (CPD: cumulative population doubling), ils constatèrent que les cellules mâles mélangées ou non ayant atteint les 50 passages en culture meurent tandis que les cellules femelles poursuivent leur division pour encore 30 passages en culture. Ces expériences ont montré que les cellules normales vieillissent en culture et qu'il ne s'agit pas d'un artéfact technique (Hayflick, 1970).

Toutefois, aucune preuve ne venait montrer l'existence du vieillissement cellulaire au sein de l'organisme. C'est pourquoi Hayflick et Moorhead ont conçu une expérience de transplantation. Si l'on prélève un morceau de peau à une souris âgée et que l'on greffe celui-ci sur une souris jeune, alors si les cellules sont immortelles, on doit pouvoir greffer de multiples fois ce morceau de peau sur plusieurs souris dès que la précédente devient âgée. La greffe doit donc survivre à son propriétaire légitime et aux souris greffées.
Pour pouvoir distinguer aisément le greffon, Hayflick et Moorhead ont greffé un morceau de peau de souris mâle sur des souris femelles compatibles.
Réalisant cette expérience, la réponse fut claire. Des cellules normales transplantées dans des souris femelles sont mortelles comme les cellules de la souris hôte (Hayflick, 1996).

Une nouvelle façon de voir le vieillissement était née. Dès lors, pour comprendre le vieillissement de l'organisme, la sénescence réplicative a été étudiée, donnant naissance à la cytogérontologie.

1. 2 Le phénotype sénescent.

Les cellules sénescentes qui ont atteint la limite de leur potentiel prolifératif restent viables et métaboliquement actives durant de longues périodes allant jusqu'à 1 an. Ces cellules ne sont pas figées et maintiennent leur capacité de synthèse d'ARN et de protéines et répondent encore à la plupart des signaux venant de leur environnement (Pour une revue:(Campisi, 1999)).

Les cellules sénescentes conservent une majorité de leurs caractéristiques de cellules pré-sénescentes. Les cellules pré-sénescentes et sénescentes expriment de nombreux gènes en commun et différents gènes restent inductibles par des stimuli externes malgré la sénescence réplicative (Hornsby et al., 1986; Rittling et al., 1986; Seshadri and Campisi, 1990). Toutefois, de nombreuses caractéristiques permettent de les

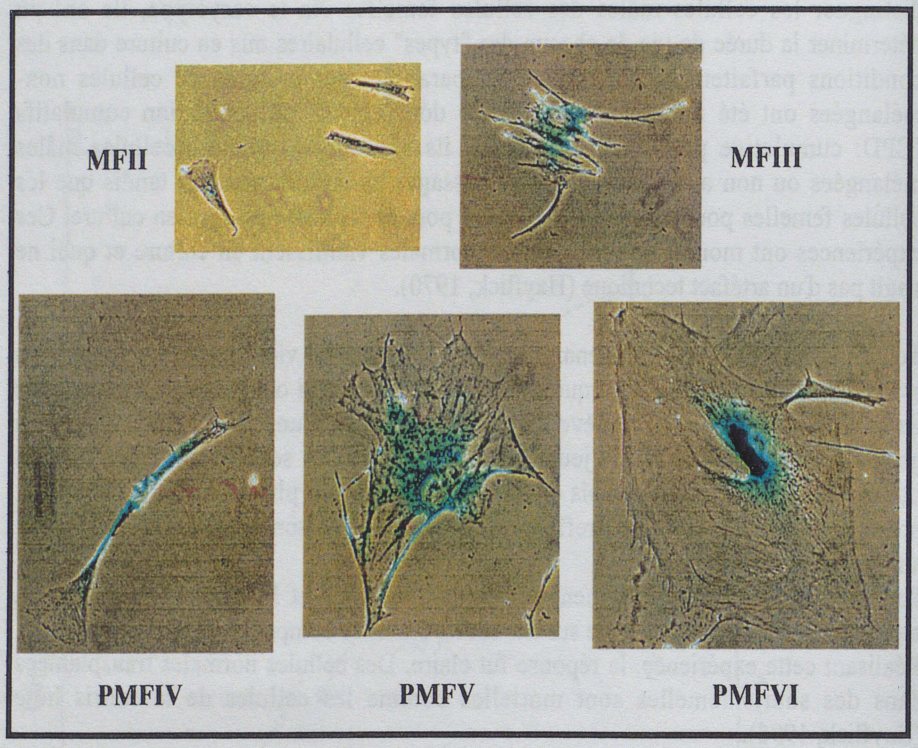



**Fig. 2 :** Photographies montrant les morphotypes MFII, MFIII, PMFIV, PMFV, PMFVI après réalisation du marquage histochimique pour l'activité β-galactosidase associée à la sénescence. Les morphotypes post-mitotiques (PMFIV, PMFV, PMFVI) sont presque toujours positifs, tandis que très peu de MFII le sont. Le MFIII, dernier morphotype mitotique, représente un stade intermédiaire : 50 % de ces cellules sont positives pour cette activité enzymatique (Grossissement 400 X). Vu leur rareté dans des cultures habituelles, les morphotypes MF1 et PMF IV ne sont pas représentés ici.

distinguer (Pour une revue: (Campisi, 1999)). Ces différences sont appelées "biomarqueurs" de la sénescence réplicative.
Il est à noter que pris seul, chacun de ces biomarqueurs ne peut suffire pour distinguer une cellule pré-sénescente d'une cellule sénescente. En effet, si on prend l'exemple d'un arrêt prolifératif, des cellules non-sénescentes peuvent elles aussi présenter ce "biomarqueur" sous diverses conditions de culture comme par exemple des stress de différentes natures ou un manque de facteurs de croissance.

Nous allons maintenant présenter brièvement les biomarqueurs les plus connus.

### 1.2.1. Modification de la morphologie cellulaire associée à la sénescence.

Le vieillissement *in vitro* des fibroblastes humains diploïdes (FHDs: Fibroblastes Humains Diploïdes) est caractérisé par de profonds changements morphologiques. La taille des cellules augmente et leur forme se diversifie (Bayreuther et al., 1992; Bayreuther et al., 1988b; Bayreuther et al., 1988a; Sherwood et al., 1988). A confluence, la densité cellulaire est moindre dans une culture sénescente que dans une culture jeune, non seulement parce que la taille des cellules est plus importante mais également parce que les FHDs sénescents sont plus sensibles aux mécanismes d'inhibition de contact. De plus, les cellules sénescentes ne présentent pas l'arrangement en faisceaux réguliers des cellules pré-sénescentes. La monocouche cellulaire est beaucoup plus désordonnée (Cristofalo and Sharf, 1973; Harley and Goldstein, 1980; Macieira-Coelho et al., 1966; Macieira-Coelho and Taboury, 1982).

Les changements morphologiques qui surviennent avec la sénescence dans une culture de fibroblastes ont été étudiés en profondeur par K. Bayreuther et ses collaborateurs. Ceux-ci se sont basés sur les différentes étapes de l'évolution morphologique des fibroblastes normaux qu'ils ont décrites au cours de leur vieillissement. Le premier modèle distinguait morphologiquement trois types de fibroblastes FI, FII, FIII, dans des cultures de fibroblastes de rats. Les FI sont de petites tailles, effilés, en forme de fuseaux. Les FII sont qualifiés d'épithéloïdes et les FIII sont de grandes cellules aux formes diverses. Chacun de ces caractères est assez stable puisqu'une cellule d'un type donné peut former un clone du même type. Ces trois types de fibroblastes se distinguent également par leur vitesse de prolifération, plus grande chez les FI, intermédiaire pour les FII et la plus faible pour les FIII. Inversément, les FIII synthétisent de grandes quantités de collagène de type I et III, par comparaison avec les FI. Les FI et FII sont généralement diploïdes tandis que les FIII présentent une tendance marquée à la polyploïdie. Enfin, ils constatent que, en fonction de l'âge du rat donneur de l'échantillon, la proportion de FI, FII et FIII varie. Plus l'âge du rat est élevé, plus la proportion de FI et FII est faible, contrairement à la proportion de FIII qui augmente (Kontermann and Bayreuther, 1979; Mollenhauer and Bayreuther, 1986).

| CPD (jours) | Morphotypes de fibroblastes (%) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | MF I | MF II | MF III | PMF IV | PMF V | PMF VI | PMF VII |
| | Culture de fibroblastes mitotiques | | | | | | |
| 11,6 (35) | 18 | 70 | 10 | 1 | 0,5 | 0,5 | - |
| 22,0 (70) | 8 | 78 | 12 | 1 | 0,5 | 0,5 | - |
| 31,1 (105) | 3 | 78 | 16 | 2 | 0,5 | 0,5 | - |
| 40,3 (147) | 1 | 38 | 49 | 10 | 1 | 1 | - |
| 50,1 (231) | - | 1 | 79 | 14 | 3 | 3 | - |
| | Culture de fibroblastes post-mitotiques (après sénescence réplicative) | | | | | | |
| (7) | - | - | 30 | 18 | 40 | 12 | - |
| (21) | - | - | 3 | 31 | 43 | 23 | - |
| (42) | - | - | - | 16 | 32 | 51 | 1 |
| (84) | - | - | - | 4 | 5 | 87 | 4 |
| (140) | - | - | - | - | 2 | 89 | 9 |
| (280) | - | - | - | - | - | 88 | 12 |

Tableau 1: Evolution des proportions des différents morphotypes chez les fibroblastes humains de peau HH8, au cours de leur vie proliférative exprimée en CPD ou en jours et pendant la phase stationnaire, exprimée en jours, qui suivent l'entrée en sénescence (d'après Bayreuther *et al.*, 1988a).

Plus tard, ils établissent que les fibroblastes humains évoluent en culture à travers une séquence de sept types morphologiques, appelés morphotypes. Les trois premiers sont des fibroblastes mitotiques (MFI, MFII et MFIII). Les MFI sont petits, effilés et fusiformes. Les MFII sont petits, de formes régulières et épithéloïdes. Les MFIII sont de plus grande taille, irréguliers et de formes assez variées, souvent épithéloïdes. Les trois morphotypes suivants sont des fibroblastes post-mitotiques (PMFIV, PMFV et PMFVI). Les PMFIV sont de grande taille et ont la forme typique d'un bâtonnet échancré. PMFV et PMFVI sont arrondis, de très grande taille. Morphologiquement, seule la taille énorme des PMFVI permet de les distinguer des PMFV, plus petits. Le dernier type morphologique (PMFVII) décrit des fibroblastes dégénérescents en train de mourir. Contrairement aux autres morphotypes qui peuvent êtres stables en culture pendant plusieurs semaines, la durée de vie des PMFVII ne dépasse pas quelques jours (Bayreuther et al., 1992; Bayreuther et al., 1988b; Bayreuther et al., 1988a; Kontermann and Bayreuther, 1979; Mollenhauer and Bayreuther, 1986). La figure 2 donne une représentation de certains de ces différents morphotypes. L'analyse de l'expression protéique de clones uniquement composés d'un seul morphotype, montre que chacun des morphotypes possède une expression protéique ayant ses caractéristiques propres, en électrophorèse bidimensionnelle (Bayreuther et al., 1992; Bayreuther et al., 1988a; Francz et al., 1989).

Dans ce modèle, il est particulièrement intéressant de constater que la proportion de chacun des morphotypes évolue au cours du vieillissement *in vitro* d'une culture de FHDs humains. Ainsi, pour les fibroblastes de peau HH8, on note, depuis le début de la culture jusqu'à son entrée en sénescence, une baisse de la proportion des MFI et MFII jusqu'à leur disparition complète à la sénescence. Ces morphotypes précoces sont remplacés par les MFIII et PMFIV qui constituent la majeure partie de la culture lors de l'entrée en sénescence (Tableau 1). Si les cultures sénescentes sont suivies jusqu'à leur terme, on observe le remplacement des MFIII, puis PMFIV par les morphotypes ultérieurs PMFV et PMFVI. La proportion des morphotypes dans une culture de fibroblastes dépend donc, en priorité, de l'âge de la culture, exprimé en doublements cumulés de populations (CPD) (Bayreuther et al., 1992; Bayreuther et al., 1988a).

Ce passage d'un morphotype à l'autre semble être un processus discret plutôt que continu. Le groupe de Bayreuther a isolé les différents morphotypes et en a analysé le contenu protéique en réalisant des gels bidimensionnelles. Ils trouvèrent des protéines exprimées spécifiquement pour chacun des morphotypes. Toutefois, cette approche ne prouve pas que le processus d'évolution à travers les morphotypes est discret. En fait, l'isolation de populations relativement pures de FHDs à différents moments de leur vieillissement *in vitro* conduit à l'identification des protéines représentant la plupart des cellules de cette population. En d'autres mots, la quantité de protéines représentant des états intermédiaires entre deux morphotypes définis pourrait être si

| type cellulaire | références |
|---|---|
| fibroblastes humains (WI-38, IMR-90, FS, TIG-7, ...) | Dimri *et al.*, 1995; Campisi et al., 1996 |
| kératinocytes humains | Campisi *et al.*, 1996 |
| cellules endothéliales humaines | Kurz *et al.*, 2000 |
| hépatocytes | Sigal *et al.*, 1999 |
| cellules épithéliales mammaires | Campisi *et al.*, 1996 |
| mélanocytes | Medrano *et al.*, 1995 |
| ostéoblastes | Michishita *et al.*, 1999 |
| cellules uroépithéliales | Reznikof *et al.*, 1996 |

Table 2: Principaux types cellulaires dans lesquels l'activité ß-galactosidase associée à la sénescence a été détectée.

faible que ces protéines ne peuvent être visualisées par gels bidimensionnels (Pour une revue: (Dierick et al., 2002)).

Bayreuther et ses collaborateurs font référence à cette évolution morphologique des fibroblastes au cours des divisions cellulaires comme à un processus de différenciation, plutôt que comme à un symptôme du vieillissement. Les arguments expérimentaux sont que les cellules évoluent spontanément à travers cette séquence de sept morphotypes et que chacun de ces stades morphologiques est caractérisé par une expression protéique propre. Aussi, les morphotypes post-mitotiques synthétisent plus de collagène de type I et III que les cellules jeunes (Kontermann and Bayreuther, 1979; Mollenhauer and Bayreuther, 1986). Ces arguments en faveur d'un processus de différenciation sont néanmoins assez faibles.

Une des fonctions principales des FHDs est de synthétiser le collagène, un composant majeur du tissu conjonctif. De prime abord, on pourrait penser que les cellules PMFIV à PMFVI remplissent donc mieux leur tâche que les cellules de morphotypes jeunes. Cependant, il est bien connu que s'ils synthétisent des quantités plus importantes de collagène, les fibroblastes sénescents synthétisent également des quantités supérieures de collagénase et que la balance synthèse/dégradation est nettement en faveur de cette dernière. On tient d'ailleurs ce processus comme responsable en grande partie de l'amincissement du derme chez les personnes âgées (Millis et al., 1989; West et al., 1989; Wick et al., 1994; Zeng and Millis, 1996).

1.2.2. Potentiel prolifératif.

La caractéristique majeure de la sénescence réplicative est un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Des cultures de FHDs à faible nombre de passages en culture contiennent déjà une proportion non négligeable de cellules sénescentes, et cette proportion croît au fur et à mesure des doublements de populations. Des expériences de marquage des noyaux à la thymidine tritiée montrent que dans des cultures à faible nombre de passages en culture, 80-90% des noyaux sont positifs et que cette proportion décroît avec l'âge de la culture (Cristofalo and Sharf, 1973). Cette perte progressive de la capacité réplicative culmine finalement par l'arrêt complet et définitif des divisions à la limite G1/S du cycle cellulaire.
Les FHDs normaux entrent donc en sénescence avec un contenu 2N en ADN. Cependant, on note une certaine proportion de cellules avec un contenu 4N. Le nombre de cellules géantes polyploïdes ou multinucléées au sein d'une population de fibroblastes augmente au fur et à mesure des passages en culture (Hayflick, 1965; Hayflick and Moorehead, 1961; Matsumura, 1980; Raes et al., 1984).
Il est à noter que cet arrêt est totalement irréversible. Des cellules sénescentes stimulées avec divers facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor), le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) ou l'IGF-1 (Insulin-Like Growth-Factor-1) ne dépassent plus la phase G1 du cycle cellulaire et ce, bien que les

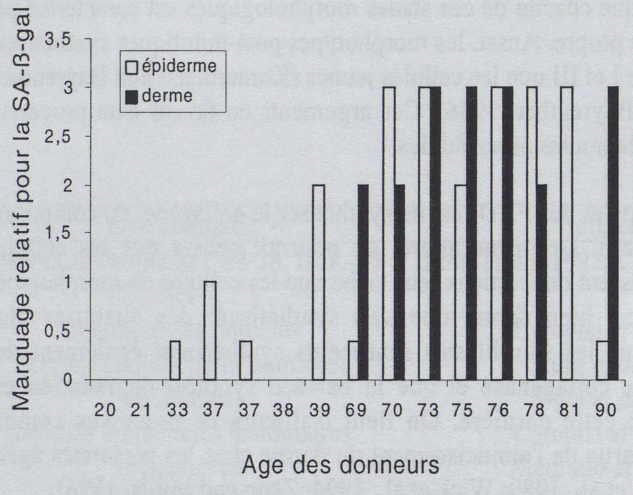



Fig.3: Fibroblastes humains positifs pour l'activité SA ß-galactosidase *in vivo* en fonction de l'âge du donneur. Des échantillons de peau ont été congelés, sectionnés et montés sur lame. Les sections ont été colorées pour l'activité SA ß-gal (comme décrit par Dimri *et al.*, 1995) et testées pour l'activité SA-ß-gal relative. Echelle de 0 à 3: de 0 où aucune cellule positive n'est observée à 3 où des grappes de cellules positives sont observées dans plusieurs champs microscopiques (d'après Campisi, 1996a).

récepteurs en surface des cellules présentent une affinité de liaison similaire à celles de cellules jeunes (Goldstein, 1990) (Pour une revue : (Cristofalo and Pignolo, 1993)) sauf dans le cas de l'EGF où une forte diminution du nombre de récepteurs à l'EGF est observée (Shiraha et al., 2000). L'échec des cellules à initier la réplication de l'ADN ne semble pas être dû à un mécanisme général d'inhibition de la transduction du signal donné par les facteurs de croissance. Par exemple, chez des fibroblastes humains sénescents certains gènes comme les proto-oncogènes *c-jun*, *c-myc* et *c-ras* restent inductibles sous l'effet d'agents mitogènes (Chang and Chen, 1988; Phillips et al., 1992; Rittling et al., 1986; Seshadri and Campisi, 1990).

1.2.3. Modification histochimique: l'activité ß-galactosidase associée à la sénescence.

En 1995, l'équipe de J. Campisi a mis en évidence par hasard l'existence d'une activité ß-galactosidase associée à la sénescence (activité SA ß-gal) (Dimri et al., 1995).
Normalement active à pH 4, la ß-galactosidase est une hydrolase lysosomale. La SA ß-gal a, quant à elle, une activité détectable à pH 6. En effet, mises en présence de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl ß-D-galactopyranosine (X-gal), un substrat artificiel homogène de la ß-galactosidase, les cellules sénescentes se colorent rapidement en bleu à pH 6 (Fig. 2).
Ce nouveau biomarqueur semble être relativement ubiquiste car de nombreuses études ont permis de le mettre en évidence dans divers types cellulaires humains sénescents tels des fibroblastes, des kératinocytes ou encore des cellules épithéliales mammaires (Tableau 2) (Campisi et al., 1996a; Dimri et al., 1995; Kurz et al., 2000; Reznikoff et al., 1996; Sigal et al., 1999). Des cellules immortalisées avec l'antigène T du virus simien SV-40 ou des cellules immortelles HeLa ne présentent pas l'activité SA ß-gal malgré un nombre très élevé de passages en culture. Par contre, l'activité SA ß-gal devient détectable chez les cellules HeLa après introduction du chromosome 4. Ce chromosome est connu pour induire la sénescence cellulaire (Ning et al., 1991). Mais pas après introduction du chromosome 11 qui n'induit pas la sénescence (Campisi et al., 1996a). De plus, il a été constaté une augmentation du pourcentage de cellules positives pour la SA ß-gal au sein de biopsies de peau en fonction de l'âge des donneurs (Dimri et al., 1995) (Fig.3). On peut également établir une relation entre l'augmentation de la SA ß-gal et l'augmentation des morphotypes caractérisant la sénescence (Toussaint et al., 2000a).

Actuellement, on n'explique toujours pas pourquoi une activité ß-gal est observée à pH 6 dans les cellules sénescentes. Cependant de nouvelles découvertes suggèrent que la SA ß-gal est une manifestation d'une activité lysosomale résiduelle à un pH non-optimal, qui devient détectable suite à une forte augmentation du contenu lysosomal (Kurz et al., 2000) avec le vieillissement cellulaire (Remacle et al., 1980).

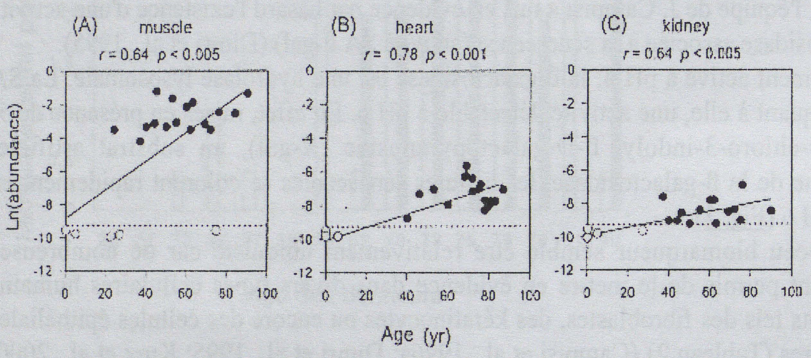



Fig. 4: Accumulations de la délétion de 4977 bp avec l'âge dans le muscle, le cœur et le rein. Les cercles noirs représentent les pourcentages mesurés de la délétion et les cercles clairs indiquent les échantillons où aucune délétion n'est détectée (d'après Liu et al, 1998).

1.2.4 Altération du génome mitochondrial.

Pour l'ensemble de leurs fonctions, les cellules ont besoin d'énergie. Cette énergie est principalement fournie par les mitochondries sous forme d'ATP (Rawn, 1990).
Toute altération des mitochondries peut conduire à des troubles cellulaires graves (Ozawa et al., 1991). Ces organites possèdent leur propre génome, circulaire de 16569 bp, codant pour une partie des protéines impliquées dans la production d'ATP.
De nombreuses mutations ponctuelles et délétions sont détectées dans l'ADN mitochondrial au cours du vieillissement cellulaire. Nous nous limiterons ici à la description brève des délétions. Il s'agit le plus souvent de délétions de grande ampleur allant jusqu'à 10,4 kb. La plus commune mesure 4,977 kb.
L'accumulation de délétions dans l'ADN mitochondrial au cours du vieillissement a été observée chez la souris (Brossas et al., 1994), le rat (Gadaleta et al., 1992), le singe (Lee et al., 1993) ou encore l'homme.
De nombreuses études réalisées sur différents échantillons de tissus humains ont montré que la fréquence de la délétion de 4977 bp augmente durant le vieillissement *in vivo*. Ces études portent sur des biopsies de peau (Pang et al., 1994; Yang et al., 1994), de muscle squelettique (Lee et al., 1994b), de cœur, de rein (Liu et al., 1998), de poumon (Fahn et al., 1996) et de foie (Yen et al., 1994; Yen et al., 1992; Yen et al., 1991). Dans le cas du cœur, du rein et du muscle squelettique (Fig.4), on observe une augmentation de l'abondance des délétions en corrélation avec l'avancée en âge.
Les graphes de la figure 4 et les droites de régression indiquent que les délétions s'accumulent avec l'âge mais aussi que cette abondance est variable selon les tissus examinés. L'abondance des délétions semble être la plus forte chez les cellules à faible potentiel prolifératif et à haute demande énergétique (Lee et al., 1994b). De plus, on a pu établir une corrélation entre une diminution de l'activité de certaines enzymes de la chaîne respiratoire, codées par le génome mitochondrial, et la présence de la délétion de 4977 bp. En effet, il a été constaté une diminution de l'activité des NADH oxydases du complexe 1 et de la cytochrome oxydase de type 3 du complexe 3 de la chaîne de transfert des électrons (Lezza et al., 1994).
A côté de cette délétion qui touche principalement la chaîne respiratoire en empêchant l'expression de gènes comme la cytochrome oxydase, il existe un autre type de délétion dont la fréquence augmente avec l'âge. Il s'agit de délétions touchant la région contrôlant la réplication du génome mitochondrial (Michikawa et al., 1999).

Quel est le mécanisme d'apparition de ces délétions ? Il a tout d'abord été observé qu'une grande proportion de ces délétions sont flanquées de séquences directement répétées (DRS, Directly Repeated Sequences) (Pour une revue: (Osiewacz, 1996)). Il a donc été proposé que les délétions se formaient lors de la réplication de l'ADN mitochondrial (ADNmt) par un mécanisme de recombinaison intramoléculaire, provenant de l'appariement de ces DRS lorsque l'ADNmt est sous forme simple brin (Shoffner et al., 1989). Cependant divers travaux montrent que ces DRS ne sont pas nécessaires à la formation de délétions dans l'ADN mitochondrial. En effet, chez le

| Gène/protéine | Description | Modification avec la sénescence |
|---|---|---|
| *Inhibiteurs de croissance* | | |
| EPC-1/PEDF (Early PDL cDNA-1/Pigment epithelial derived factor) | Inhibiteur de la croissance; marqueur de la phase $G_0$ Facteur de différentiation; facteur neurotrophique | Sous expression de l'ARNm et de la protéine |
| HIC-5 (Hydrogene peroxyde inducible clone-5) | Inductible par l'$H_2O_2$; inhibiteur de la croissance | Surexpression de l'ARNm |
| $p33^{ING1}$ | Inhibiteur de la croissance | Surexpression de l'ARNm et de la protéine |
| Prohibitine | Inhibiteur de la croissance; suppresseur de tumeur | Perte de modifications post-traductionnelles |
| Protéine du rétinoblastome (pRb) | Inhibiteur de la croissance; suppresseur de tumeur | Absence de phosphorylation |
| Statine | Protéine nucléaire; s'associe à pRb | Surexpression de la protéine |
| *Facteurs de croissance/cytokines* | | |
| Héréguline | Activateur du récepteur à tyrosine kinase ERBB2 | Surexpression de l'ARNm |
| IGF-1 (Insulin-like growth factor-I) | Facteur de croissance | Sous-expression de l'ARNm |
| Interféron-β | Cytokine: interfère avec l'action mitogénique des facteurs de croissance | Surexpression de la protéine |
| Interféron-γ | Cytokine: interfère avec l'action mitogénique des facteurs de croissance | Surexpression de l'ARNm |
| Interleukine-1α et -β | Cytokine: médiateur de la résorption osseuse; inflammation et immunité | Surexpression de l'ARNm |
| Interleukine-6 | Cytokine: réponse de phase aigüe dans le foie; favorise la croissance des hybridômes; activité antivirale | Sous-expression de l'ARNm et de la protéine |
| *Récepteurs/Binding proteins* | | |
| Antigène CD44 | Molécule d'adhésion cellulaire; glycoprotéine transmembranaire qui lie l'hyaluronate et l'ostéopontine | Surexpression de l'ARNm |
| EGF-R (Récepteur au facteur de croissance épidermique) | Récepteur de facteur de croissance | Perte de l'activité tyrosine kinase |
| IGFBP-3 (Insulin-like growth factor binding protein-3) | Lie la protéine IGF-1 | Surexpression de l'ARNm et de la protéine |
| IGFBP-5 (Insulin-like growth factor binding protein-5) | Lie la protéine IGF-1 | Surexpression de l'ARNm |
| *Inductible par les interférons* | | |
| 2-5 AS (2',5' oligoadénylate synthétase) | Polymérise l'ATP en oligomères liés en 2'-5' | Surexpression de l'ARNm |
| IFI-6-16 (Protéine 6-16 inductible par l'interféron) | Activé par IFN-α et IFN-β mais pas par IFN-γ | Surexpression de l'ARNm |
| *Régulation du cycle cellulaire* | | |
| CDC2/CDK1 (Kinase dépendante des cyclines-1) | Rôle dans la progression à travers les phases G2 et M | Sous-expression de l'ARNm et de la protéine |
| CDK2 (Kinase dépendante des cyclines-2) | Rôle dans la progression à travers les phases G1/S et S | Sous-expression de l'ARNm; réduction de la phosphorylation |
| CDK4 (Kinase dépendante | Rôle dans la progression à travers la phase G1 | Sous-expression de l'ARNm ou pas de changement suivant la lignée |

singe *Rhesus*, parmi treize délétions observées dans le muscle squelettique, sept ne sont pas accompagnées de DRS (Lee et al., 1994a). De plus, il existe une corrélation entre l'exposition de l'ADNmt à des stress oxydatifs et la présence de délétions, qu'elles soient flanquées ou non de DRS.

1.2.5. Variation de l'expression génique.

En ce qui concerne les FHDs, plus de 80 gènes dont le niveau d'expression varie durant leur vieillissement *in vitro*, ont été mis en évidence (Pour une revue, (Cristofalo et al., 1998a)). Il s'agit de gènes codant pour des inhibiteurs de la croissance, des facteurs de croissance, des récepteurs, des cytokines, des protéines et enzymes impliquées dans la synthèse, la structure et la réparation de l'ADN, des protéines, protéases et inhibiteurs de protéases de la matrice extracellulaire, des enzymes antioxydantes, des régulateurs du cycle cellulaire ou des éléments de la chaîne de respiration mitochondriale (Tableau 3). Ici, nous ne nous attarderons pas à décrire les différents gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, ils seront plus amplement explicités au chapitre : Régulation du cycle cellulaire de la sénescence réplicative (point 1.3).
Nous nous contenterons de décrire des gènes couramment utilisés comme biomarqueurs. Il s'agit de l'ostéonectine, la fibronectine, SM22, l'α(1)-procollagène de type II et l'apolipoprotéine J.
Pour la première fois, ces gènes ont été décrits comme étant surexprimés chez des cellules de rat sénescentes. En fait, il s'agit de fibroblastes de rat transformés par un antigène T thermosensible du virus simien SV-40 (Gonos et al., 1998). Cette transformation immortalise les cellules si elles sont maintenues à 33°C. Toutefois, à une température de 39°C, cette immortalisation est annihilée et les cellules semblent entrer en état de sénescence au niveau morphologique et prolifératif. Après réalisation d'une banque d'ADN complémentaire à partir d'ARN messager d'une population placée à 39°C, une hybridation soustractive a été réalisée entre cet ADN complémentaire et l'ARN messager des cellules à 33°C. Cette méthode a permis de montrer la surexpression de l'ostéonectine, de la fibronectine, de SM22, de l'α(1)-procollagène de type II et l'apolipoprotéine J (Gonos et al., 1998).
Ces 5 gènes sont aussi surexprimés chez les fibroblastes humains WI-38 et IMR-90 sénescents (Dumont et al., 2000c; Kumazaki et al., 1991).
La fibronectine et l'α(1)-procollagène de type II sont des composants essentiels de la matrice extracellulaire associés à diverses fonctions comprenant l'adhésion cellulaire, l'organisation du cytosquelette, la migration, la croissance et la différentiation cellulaire (Garcia et al., 1999). Kumazaki *et al.* ont montré une corrélation entre la surexpression de la fibronectine et les changements morphologiques décrits dans la sénescence (Kumazaki et al., 1993).
L'ostéonectine ou SPARC contribue au remodelage des tissus en induisant l'expression de métalloprotéases comme la collagènase mais aussi de gélatinases dans les fibroblastes humains. Ces métalloprotéinases dégradent la matrice extracellulaire

| | | |
|---|---|---|
| des cyclines-4) | | cellulaire de HDFs |
| Cycline A<br>Cycline B | Composant régulateur des CDKs | Sous-expression de l'ARNm et de la protéine |
| Cycline D1<br>Cycline E | Composant régulateur des CDKs | Sous-expression de l'ARNm ou surexpression suivant la lignée cellulaire de HDFs |
| Cycline D3 | Composant régulateur des CDKs | Diminution de l'induction par le sérum |
| Cycline H | Composante de la cyclin-activating kinase (CAK) | Sous-expression de l'ARNm |
| $p16^{INK4/CDKN2}$ | Inhibiteur de CDK4 et CDK6 | Surexpression de l'ARNm et de la protéine |
| $p21^{SDI-1/CIP1/WAF1}$ | Inhibiteur des complexes cyclines-CDKs | Surexpression de l'ARNm et de la protéine |
| *ADN/Synthèse des protéines, réparation et structure* | | |
| PCNA (Antigène nucléaire de prolifération cellulaire) | Cofacteur de la polymérase δ | Sous-expression de l'ARNm et de la protéine |
| Polymérase α | Synthèse de l'ADN | Sous-expression de la protéine |
| RRM1/RRM2 (Ribonucléotide Réductase (sous-unités M1 et M2) | Production de déoxyribonucléotides pour la synthèse d'ADN | Sous-expression de l'ARNm |
| Thymidine kinase | Conversion de la thymidine en thymidylate (thymidine-5'-monophosphate, TMP) ; étape de la biosynthèse du nucléotide | Sous-expression de l'ARNm et de la protéine |
| Thymidylate synthétase | Méthylation de la 2'-déoxyuridine 5'-monophosphate (dUMP) pour former le TMP; étape de la biosynthèse du nucléotide | Sous-expression de l'ARNm |
| H1, H2a, H2b, H3, H4 (Histones) | Structure de la chromatine | Sous-expression de l'ARNm |
| PARP/ADPRT (Poly(ADP-ribose) polymérase/ADP ribosyltransférase) | Protéine associée à la chromatine; rôle dans la réparation des dommages à l'ADN | Sous-expression de la protéine |
| Ku autoantigène | Hélicase; rôle dans la reconnaissance des dommages à l'ADN | Diminution de l'abondance de la protéine dans le noyau |
| Topoisomérase I | Modifie la topologie de l'ADN | Sous-expression de l'ARNm/baisse d'activité |
| Dihydrofolate réductase | Catalyse la réduction du folate en dihydrofolate étape de la synthèse des acides aminés, des purines et du thymidylate | Sous-expression de l'ARNm |
| EF-Iα (Facteur d'élongation-Iα) | Synthèse des protéines | Sous-expression de la protéine |
| L5, L7, P1, S3, S6, S10 | Protéines ribosomales | Sous-expression de l'ARNm |
| *Matrice extracellulaire* | | |
| Collagène α1(I) | Composant de la matrice extracellulaire | Surexpression ou sous-expression de l'ARNm |
| Collagène α2(I) | Composant de la matrice extracellulaire | Sous-expression de l'ARNm |
| Collagène α1(III) | Composant de la matrice extracellulaire | Sous-expression de l'ARNm |
| Elastine | Composant majeur des fibres élastiques | Sous-expression de l'ARNm |
| Fibronectine | Composant de la matrice extracellulaire | Surexpression de l'ARNm |
| Chaîne α de la laminine | Glycoprotéine de la membrane basale | Sous-expression de l'ARNm |

Tableau 3: Gènes dont le niveau d'expression ou la régulation post-traductionnelle est modifié chez les fibroblastes humains lors de leur sénescence réplicative (d'après Cristofalo *et al.*, 1998).

et les membranes basales. Or, ces dégradations sont observées lors du vieillissement *in vivo* de la peau (Giacomoni and D'Alessio, 1996). De plus, il a été démontré que l'ostéonectine était capable d'inhiber l'entrée en phase S dans certain type cellulaire. En effet, cette protéine de la matrice extracellulaire forme un complexe avec du PDGF empêchant ainsi la reconnaissance par ce dernier de son récepteur spécifique (Pichler et al., 1996).

L'apolipoprotéine J (apo J) est impliquée dans une multitude de processus biologiques tels que l'embryogénèse et la différenciation (French et al., 1993; Zakeri et al., 1992). L'apo J est secrétée par de nombreux organes et est présente dans tous les liquides corporels (Collard and Griswold, 1987; Jenne and Tschopp, 1989). De plus, l'expression de l'apo J est modulée par de nombreux facteurs différents tels que diverses cytokines comme l'IL-1, le TNF-α (Hardardottir et al., 1994)et le TGF-β (Wegrowski et al., 1999), des facteurs de croissance et de nombreux stress tels que les chocs thermiques, le peroxyde d'hydrogène, le tert-butylhydroperoxyde et l'hyperoxie (Michel *et al.*, 1997; Viard *et al.*, 1999; Dumont *et al.*, 2000) et semble protéger ces cellules de ces stress (Dumont et al., 2002; Schwochau et al., 1998; Viard et al., 1999).

Actuellement, son mécanisme de protection vis-à-vis des stress est encore inconnu mais une réponse semble venir de sa structure protéique. L'apo J contient trois régions en hélice α favorisant les interactions de type hydrophobe, ainsi que divers autres sites hydrophobes (de Silva et al., 1990b; de Silva et al., 1990a) et peut se lier à des protéines partiellement dépliées sous l'action de stress et prévenir leur précipitation (Wilson and Eastbrook-Smith, 2000). Compte tenu de cette propriété et de son action favorable sur la survie cellulaire en présence de stress, il a été proposé que l'apo J peut être considérée comme une chaperone fonctionnelle (Humphreys et al., 1999; Viard et al., 1999).

Quant à SM22, bien que cette protéine est très abondante dans les cellules musculaires lisses, sa fonction exacte reste un mystère. SM22 est une protéine du cytosquelette de 22 kDa portant également le nom de transgelin (Lawson et al., 1997). Actuellement, tout juste sait-on que cette protéine peut se lier aux fibres de stress (Small and Gimona, 1998) et à la fibronectine (Fu et al., 2000). Ces données font actuellement penser que SM22 intervient dans l'organisation du cytosquelette. SM22 possède également un site de liaison au calcium mais il n'y a pas de preuve directe que SM22 lie les ions calcium (Shishibori et al., 1996).

### 1.2.6. Raccourcissement télomérique.

Les télomères sont les extrémités des chromosomes. Ils sont constitués chez les vertébrés de la séquence TTAGGG répétée un très grand nombre de fois (Meyne et al., 1989; Moyzis et al., 1988). Ces répétitions forment une structure tridimensionnelle avec laquelle interagissent de nombreuses protéines, on parle alors de télosome (Pour une revue: (Blackburn, 1991; Bryan et al., 1995)).

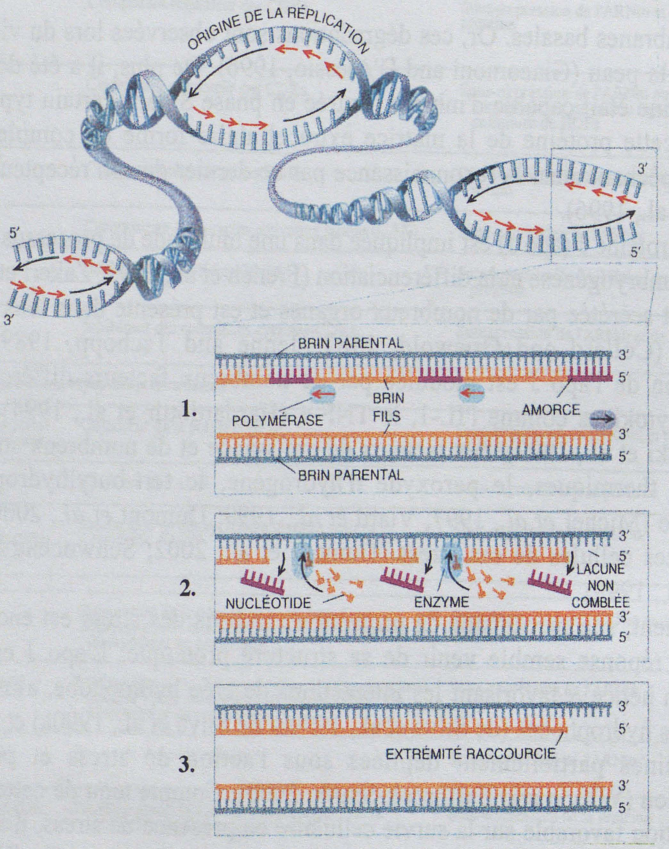



**Fig. 5** : Mécanisme du raccourcissement des extrémités chromosomiques. (1) Les brins parentaux servent de modèles aux polymérases qui synthétisent les brins fils. Cette synthèse se fait dans la direction unique 5' vers 3' et nécessite des amorces ARN. (2) Les amorces sont ensuite dégradées et les lacunes sont comblées à l'exception de celle qui subsiste à l'extrémité 5'. (3) Il en résulte un raccourcissement de l'extrémité du chromosome.

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 semble être TRF-2. TRF-2 par sa capacité à former des boucles aux extrémités télomériques semble protéger les télomères courts de fusion et les fusions chromosomiques. La suppression de cette protéine conduit à l'arrêt du cycle cellulaire par activation de la voie de p53 suite à la fusion interchromosomique de télomères (de Lange, 2001). A l'opposé, la surexpression de TRF-2 induit un raccourcissement accéléré des télomères (Karlseder et al., 2002).
Les télomères sont essentiels au maintien de la stabilité génomique. En effet, ils empêchent la dégradation des extrémités chromosomiques et préviennent de recombinaisons illégitimes.
Parce que la polymérase à ADN nécessite une amorce pour initier la réplication de l'ADN chromosomique, chaque division provoque une perte de quelques bases en extrémité 5' du brin d'ADN (Fig.5) (Greider and Blackburn, 1998). En fait, l'amorce de la polymérase reconnaît la séquence télomérique et s'y fixe. La polymérase va donc synthétiser le brin complémentaire en partant de son amorce ARN. Une fois la synthèse réalisée, les amorces sont dégradées et les trous laissés par les amorces sont comblés sauf à l'extrémité 5'. Il en résulte un raccourcissemnt télomérique. Ce mécanisme serait à l'origine du raccourcissement télomérique observé lors de la sénescence et du vieillissement *in vivo*.

A la naissance de chaque individu, les télomères sont longs de 10 à 15 Kb, puis raccourcissent avec l'âge (Allsopp et al., 1992; Hastie et al., 1990; Lindsey et al., 1991). Lorsqu'on examine la longueur des télomères de cellules de donneurs d'âges variés, on observe qu'elle dépend de l'âge du donneur. Plus le donneur est âgé, plus les télomères de ses cellules sont courts. Ce raccourcissement *in vivo* est d'environ 15 bp par année de vie pour les fibroblastes (Allsopp et al., 1992; Hastie et al., 1990). Ce raccourcissement est aussi observé *in vitro*, des fibroblastes humains en culture raccourcissent entre 50 bp et 120 bp par passage en culture (Harley et al., 1990).
Pour les fibroblastes, le déclin de la capacité proliférative *in vivo* est de 0,2 CPD par année (Allsopp et al., 1992; Goldstein et al., 1978; Martin et al., 1970). Donc, sur base de ces données, on peut estimer le raccourcissement des séquences télomériques *in vivo* à 75 bp/CPD, ce qui est proche du raccourcissement observé *in vitro* (Harley et al., 1990; Levy et al., 1992). Remarquons que les cellules germinales et immortelles, comme les cellules cancéreuses, ne subissent pas ce raccourcissement systématique au fil des divisions cellulaires. La plupart de ces dernières sont pourvues d'une télomérase (Counter, 1994) (télomère synthase), qui grâce à sa sous-unité catalytique est capable de polymériser des nucléotides sur une matrice d'ARN et de maintenir une taille constante des télomères (Blackburn, 1991) ou de les allonger fortement.
En outre, de récents travaux effectués par l'équipe de Bodnar montrent qu'il est possible d'augmenter indéfiniment le potentiel prolifératif des fibroblastes humains

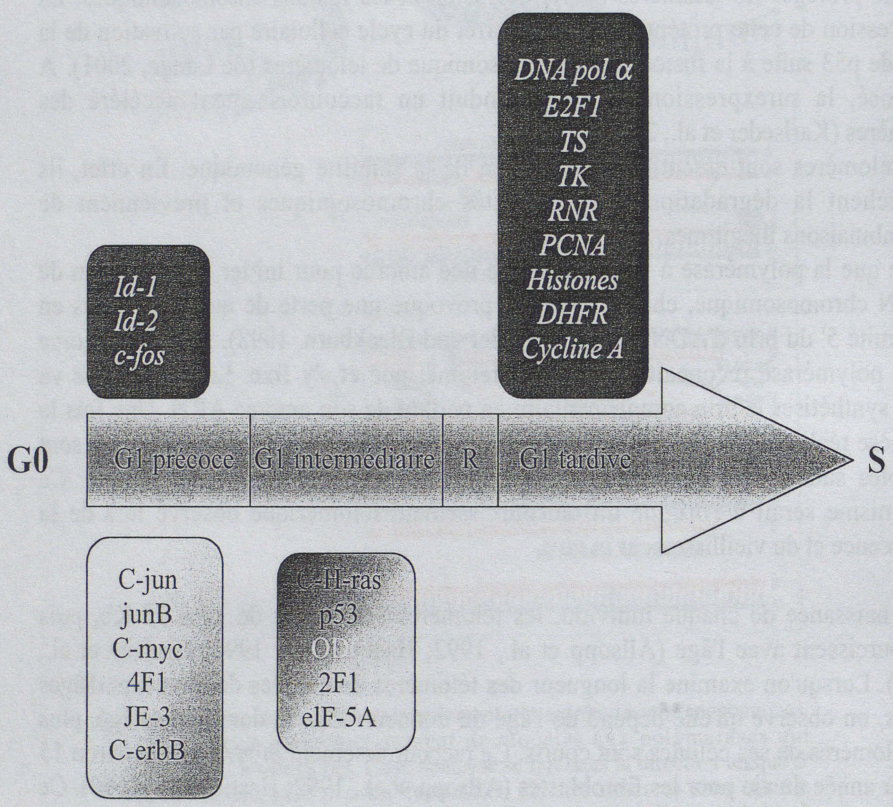



Fig. 6: Principaux gènes dont les produits sont nécessaires en phase G1 précoce, intermédiaire ou tardive. Les gènes qui ne sont plus induits chez les cellules sénescentes ou dont les produits sont inactifs sont représentés en blanc d'après Stein et Dulic, 1995). DNA pol α: DNA polymèrase α, TS: thymidilate synthétase, TK: thymidine kinase; RNR: ribonucléotide réductase, PCNA: proliferating cell nuclear antigen, DHFR: dihydrofolate réductase, cyc A: cycline A.

normaux à condition de les transfecter par un vecteur comportant l'ADN complémentaire codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase (Bodnar et al., 1998). Actuellement ces cellules ont déjà effectué plus de 400 passages en culture. La télomérase, dans ces conditions, semble travailler de manière spécifique. En effet, l'équipe de Von Zglinicki a mis en évidence un raccourcissement télomérique chez ces mêmes cellules surexprimant la télomérase. Les télomères raccouciraient jusqu'à une longueur critique. Une fois cette longueur télomérique atteinte, la télomérase se fixerait uniquement sur les téloméres courts et les allongeraient. La télomérase semble donc allonger uniquement les télomères courts dans ce modèle (Lorentz et al., 2001).

### 1.3. Régulation du cycle cellulaire chez les cellules sénescentes (Pour une revue:(Garkavtsev et al., 1998).

On sait depuis 1953 que la synthèse de l'ADN se déroule en une phase particulière du cycle cellulaire appelée phase S (Howard and Pelc, 1953). Avant la phase S, se passe la phase G1 (Gap 1) et après la phase S se déroule la phase G2 (Gap2) (Baserga, 1985).
Le cycle cellulaire a donc été divisé en différentes phases: les phases G1, S, G2 et M (mitose).

Comme expliqué au point 1.2.2, les cellules sénescentes sont incapables de se diviser et surtout de synthétiser de l'ADN.
Globalement, les cellules sénescentes sont incapables de passer le point de restriction (point R), qui est défini comme le processus obligé pour la synthèse de l'ADN et la mitose (Pardee, 1989) (Fig. 6). Ce point obligatoire aussi appelé point START chez la levure est l'étape pendant laquelle la masse cellulaire, le niveau nutritionel, etc. sont évalués en vue de la division (Lewin, 1994).
Comment cet arrêt de division est-il induit? Il existe différentes étapes que nous allons décrire ci-dessous.

#### 1.3.1. Expression des gènes de réponses immédiates (early G1).

Ces gènes sont induits rapidement après une stimulation des cellules au moyen des facteurs de croissance. Divers gènes dont l'expression est requise en début de phase G1 sont normalement exprimés chez les fibroblastes sénescents tels que *c-myc, c-jun, junB, c-erbB, 4F1, JE3* (Fig.6) (Chang and Chen, 1988; Pignolo et al., 1990; Rittling et al., 1986; Seshadri and Campisi, 1990)(Pour une revue : (Phillips and Pignolo, 1992a)). Cependant au moins trois gènes de réponse immédiate, dont l'expression paraît essentielle pour l'induction de la synthèse d'ADN, ne sont plus exprimés suite à une stimulation par des facteurs de croissance chez les cellules sénescentes. Il s'agit du proto-oncogène *c-fos* qui code une sous-unité du facteur de transcription

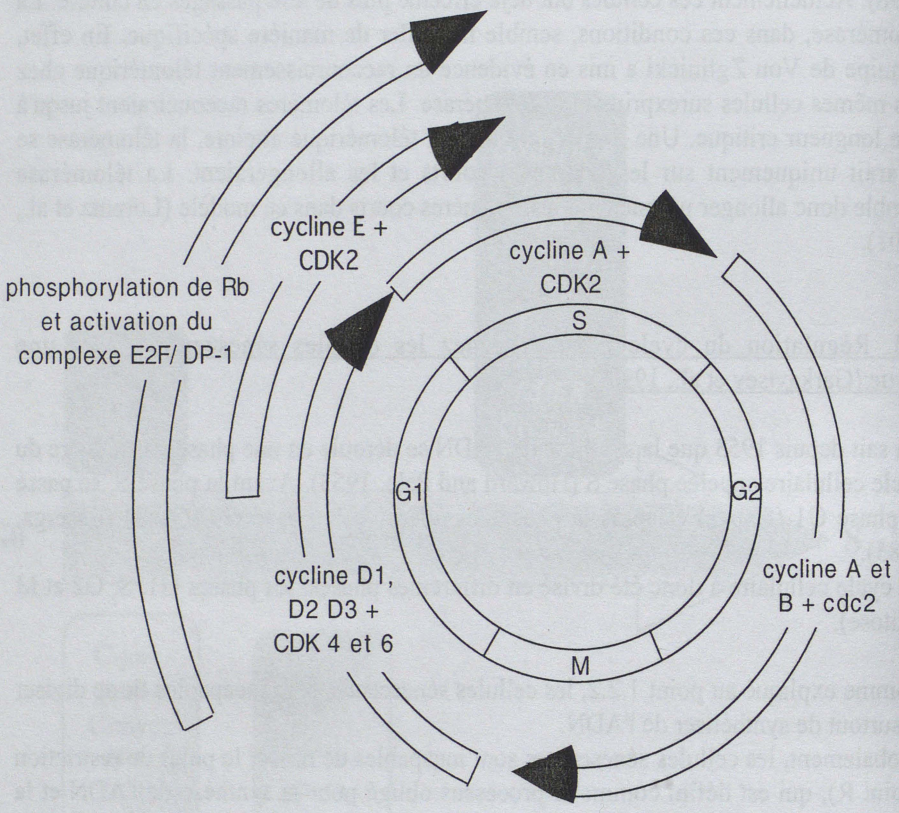



Fig. 7: Représentation simplifiée de l'implication temporelle des différents complexes cycline-CDK (d'après Ravitz et Wenner, 1997).

hétérodimèrique AP-1 (Cohen and Curran, 1989; Seshadri and Campisi, 1990) et des gènes *Id-1* et *Id-2* qui codent des régulateurs négatifs de facteurs de transcription du type basic-helix-loop-helix (bHLH) (Hara et al., 1994; Stein and Dulić, 1995) (Fig.6). Il est à noter que certaines études également réalisées sur des fibroblastes humains normaux ne font état que d'une baisse du niveau d'ARNm de *c-fos* et non d'une répression totale (Dumont et al., 2000b).

Les mécanismes responsables de la répression des gènes *Id-1* et *Id-2* chez les cellules sénescentes sont méconnus. Tout juste sait-on que l'expression d'un dominant négatif de *Id-1* provoque une surexpression de $p16^{Ink-4a}$ et induit la sénescence (Alani et al., 2001). Par contre, la répression de *c-fos* peut être due à un défaut de liaison du Serum Responsive Factor (SRF) au Serum Responsive Element (SRE) du promoteur de *c-fos*. L'hyperphosphorylation du SRF chez les cellules sénescentes pourrait être la cause de cette absence de liaison au promoteur de *c-fos* (Atadja et al., 1994).

### 1.3.2. Gènes exprimés en milieu de phase G1 (Mid-G1).

La plupart des gènes requis en milieu de phase G1 sont normalement transcrits chez les cellules sénescentes : *p53, ODC, c-Ha-ras, eIF-5A, 2A9, 2F1* (Fig.6) (Chang and Chen, 1988; Pang and Chen, 1994a; Rittling et al., 1986; Seshadri and Campisi, 1990). Notons cependant le cas de l'ornithine décarboxylase (ODC). Bien que son niveau d'ARNm ne diminue pas, on note chez les cellules sénescentes une diminution importante de son activité enzymatique (Chang and Chen, 1988).

### 1.3.3. Gènes transcrits lors de la transition G1/S et nécessaires à l'entrée en phase S (Late G1, G1/S).

Plusieurs gènes, inductibles par une stimulation au moyen de sérum ou de facteurs de croissance, nécessaires à la transition G1/S du cycle cellulaire (G1 tardive ou transition G1/S), ne sont plus exprimés dans les cellules sénescentes, notamment, un groupe de gènes codant pour des enzymes participant à la synthèse de l'ADN. En effet, l'ARNm de la thymidine kinase (TK), la thymidylate synthétase (TS), la dihydrofolate réductase (DHFR) (Good et al., 1996), la ribonucléotide réductase (RNR), le Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), la cycline A et l'ADN polymerase α (Chang and Chen, 1988; Fukami et al., 1995; Pang and Chen, 1994a; Pang and Chen, 1993) sont plus faiblement exprimés chez les cellules sénescentes (Fig.6). Pour la TK et DHFR, les mesures d'activité enzymatique réalisées montrent une diminution de l'ordre de 3 à 5 fois chez les cellules sénescentes. Cet ordre de diminution est similaire à celui observé au niveau de leur ARNm (Chang and Chen, 1988; Pang and Chen, 1994a; Pang and Chen, 1993).

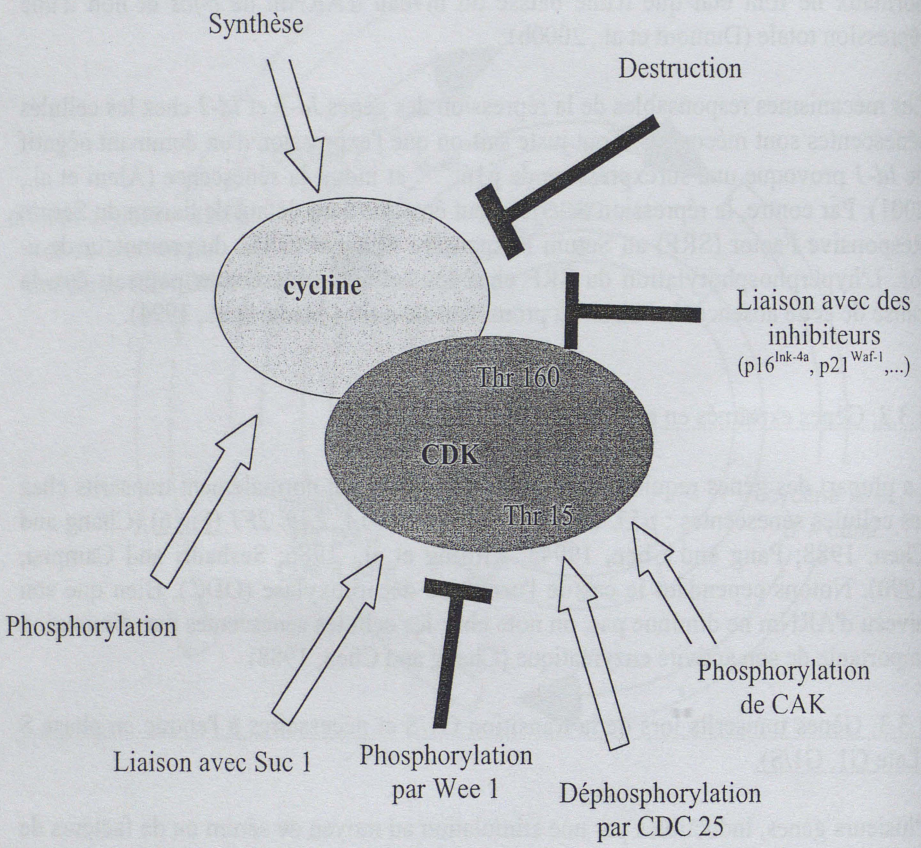



Fig. 8: Mécanismes majeurs de la régulation de l'activité des CDKs (d'après Lees, 1995). Leur régulation se fait par la liaison à différentes protéines activatrices ou inhibitrices par des phosphorylations et déphosphorylations, ainsi que par le contrôle de leur synthèse et de leur dégradation.

La DHFR est une enzyme impliquée dans la production des purines, de la glycine et du thymidylate. Son expression est dépendante du cycle cellulaire et est régulée au niveau transcriptionnel (Farnham and Schimke, 1985; Liu et al., 1985). Sa séquence régulatrice contient des sites de liaison pour le facteur de transcription E2F et Sp1 (Jensen et al., 1997).
Les RNR sont des enzymes qui convertissent les nucléotides en déoxynucléotides (Pour une revue : (Stubbe and Riggs-Gelasco, 1998)). Ils sont formés de deux sous-unités différentes nommées R1 et R2. La sous-unité R1 est exprimée de manière égale tout au long du cycle cellulaire. Par contre, l'expression de R2 varie. Indétectable en phase G1, son niveau d'expression augmente dès l'entrée en phase S (Chabes and Thelander, 2000; Thelander and Berg, 1986).
PCNA fonctionne comme une sous-unité auxiliaire de l'ADN polymérase ∂. L'ADN polymérase ∂ est la principale ADN polymérase dans la réplication de l'ADN chez les eucaryotes. Elle est constituée d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité en interaction avec la PCNA. La PCNA est nécessaire pour la réplication de l'ADN et la progression dans le cycle cellulaire (Bravo et al., 1987; Garret and Grisham, 1999; Prelich et al., 1987).
En outre, on note la répression de différents histones nécessaires à la maintenance de l'intégrité de la structure chromosomique durant la réplication de l'ADN. Il s'agit des histones H1, H2A + H2B, H3 et H4 qui sont normalement induits, au niveau de l'ARNm, par une stimulation au moyen de sérum et qui sont requis pour la transition G1/S (Fig.6) (Fukami et al., 1995; Pang and Chen, 1994a; Seshadri and Campisi, 1990).

### 1.3.4. Les complexes cycline-CdK (cyclin-dependent kinase).

Les kinases dépendantes des cyclines (CdKs) sont une famille de sérine/thréonine kinases essentielles pour la régulation des différentes étapes du cycle cellulaire (Fig. 7). Les CdKs seules n'ont qu'une très faible activité kinase et nécessitent la liaison d'une cycline pour former un complexe cycline-CdK actif. Nous décrivons ci-dessous les différentes cyclines qui nous intéressent plus particulièrement dans ce travail, et qui sont liées à la progression du cycle cellulaire vers sa phase S. Ensuite, les CdKs sont régulées par des phosphorylations et des déphosphorylations. Enfin, la régulation de l'activité kinase des CdKs se fait aussi par association avec une série de protéines inhibitrices (Lees, 1995) (Fig. 8) que nous allons décrire.

| Protéine du cycle cellulaire | Implication dans le cycle cellulaire | Fonction | Régulation de l'activité |
|---|---|---|---|
| cycline A | S, progression dans M | active CDK2<br>active CDC2 | transcriptionelle et dégradation ubiquitine dépendante |
| cycline B1 | progression dans M | active CDC2 | transcription elle et dégradation ubiquitine dépendante |
| cycline B2 | progression dans M | ? | dégradation ubiquitine dépendante |
| cycline C | progression à travers G1? | active CDK8 | ? |
| cycline D1, D2, D3 | progression à travers G1 | active CDK4 et 6 | transcriptionelle et dégradation régulée par les séquence PEST |
| cycline E | progression dans G2 et M | active CDK2 | transcriptionelle et dégradation régulée par les séquence PEST |
| cycline F | progression dans M | lie Skp1, impliquée dans la protéolyse | transcriptionelle |
| cycline G | ? | réponse à p53 lors de dommage à l'ADN | transcriptionelle |
| cycline H | progression dans toutes les phases | active CDK7 | ? |
| cycline I | principalement en G0 | préserve l'arrêt en phase G0 lors de la différentiation terminale | ? |
| cycline J | ? | embryogenèse chez la Drosophile | transcriptionelle |
| CDC2 | progression dans M | phosphoryle les histone H1, la lamimine, ... | activée par les cyclines A et B |
| CdK2 | progression dans S et après le signal START | s'associe et phosphoryle la machinerie de réplication de l'ADN, phosphoryle Rb | activée par les cyclines A et B |
| CdK3 | progression dans G1 et après le signal START | ? | ? |
| CdK4 | progression dans G1 | phosphoryle Rb | activée par les cyclines D1, D2 et D3 |
| CdK5 | en G0? | phosphoryle les protéines des neurofilaments | activée par p35 |
| CdK6 | progression dans G1 | phosphoryle Rb | activée par les cyclines D1, D2 et D3 |
| CdK7 | ubiquiste | active les CDK et phosphoryle la RNA polymerase II | activité dépendante de la présence de substrat? |
| CdK8 | ubiquiste | phosphoryle la RNA polymerase II | liaison à la cycline C |
| p21 $^{Waf-1}$ | G1 et S | inhibe CDK2,4 et 6, le PCNA | transcriptionelle par p53 |
| p16 $^{Ink4a}$ | G1 | inhibe CDK4 et 6 par déplacement de la cycline D | transcriptionelle par Rb |
| p27 $^{Kip-1}$ | G1 | inhibe CDK2 via le TGF-ß ou le contact cellule cellule | relocalisation subcellulaire |
| p15 $^{Ink4b}$ | G1 | inhibe CDK 4 et 6 par traitement au TGF-ß | transcriptionelle lors d'exposition au TGF-ß |
| p18 $^{Ink4c}$ | | inhibe CDK 4 et 6 | ? |
| p19$^{Ink4d}$ | G1 | inhibe CDK 4 et 6 | ? |

Tableau 4: Représentation des principales protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire (d'après Vogt et Reed, 1998).

*1.3.4.1 Complexes cycline/CdK impliqués dans la régulation des différentes étapes du cycle cellulaire.*

Dans le cycle cellulaire, le rôle des cyclines est de lier et d'activer les CdKs. Chaque cycline connaît des variations de niveau d'expression au cours du cycle cellulaire. Cette succession de variations est donc un événement clé dans l'activation des CdKs et régule la progression à travers les différentes étapes du cycle cellulaire. Les cyclines les mieux caractérisées sont les cyclines D, E, A et B dont l'expression est nécessaire, respectivement, en phase G1, G1 - S, S - G2 et G2- M (Tableau 4)(Ravitz and Wenner, 1997; Vogt and Reed, 1998). Les cellules sénescentes étant bloquées lors de la transition entre la phase G1 et la phase S (G1/S), nous allons nous intéresser aux cyclines impliquées dans la progression du cycle cellulaire en phases G1 et S.

Les cyclines D (D1, D2, D3) sont absentes chez les cellules quiescentes et sont synthétisées dès le début de la phase G1 en réponse à un stimulus mitotique. Leur accumulation est maximale en phase G1 tardive (Pour une revue : (Graña and Reddy, 1995)). Ces cyclines lient préférentiellement CdK4 et 6. Les complexes CdK4-cycline D et CdK6-cycline D sont les premiers à être activés lorsqu'une cellule quitte le stade quiescent (Matsushime et al., 1994; Meyerson and Harlow, 1994). La micro-injection d'anticorps contre la cycline D1 durant la phase G1 provoque une interruption du cycle cellulaire avant la phase S (Baldin et al., 1993; Quelle et al., 1993).

La cycline E est synthétisée en phase G1, le pic d'accumulation se situant en phase G1 tardive. Elle lie principalement CdK2 (Dulic et al., 1992; Koff et al., 1992) qui est cytoplasmique et pénètre dans le noyau en phase G1 (Dietrich et al., 1997). Le pic d'activité du complexe CdK2-cycline E se situe en phase G1 tardive. Aussi, la micro-injection d'anticorps contre la cycline E ou CdK2 cause une interruption du cycle durant la phase G1 (Pagano et al., 1993; Tsai et al., 1993). L'activité des complexes CdK2-cycline E et CdK2-cycline D est importante dès le milieu de la phase G1 jusqu'à la transition G1/S.

Les CdKs régulées par les cyclines D et E sont responsables de la phosphorylation de la protéine Rb, avant la transition G1/S.

La cycline A est synthétisée dès la phase G1 tardive (Stein et al., 1991) et lie CdK2 à la frontière G1/S. Le complexe CdK2-cycline A est actif dès G1/S et durant la phase S (Pour une revue :(Pines, 1994)) et son activité est nécessaire pour la réplication de l'ADN (Labbe et al., 1989). Dès la phase G1 tardive, la cycline E est rapidement dégradée, ce qui laisse la place à la cycline A en phase S (Pour une revue : (Graña and Reddy, 1995)).

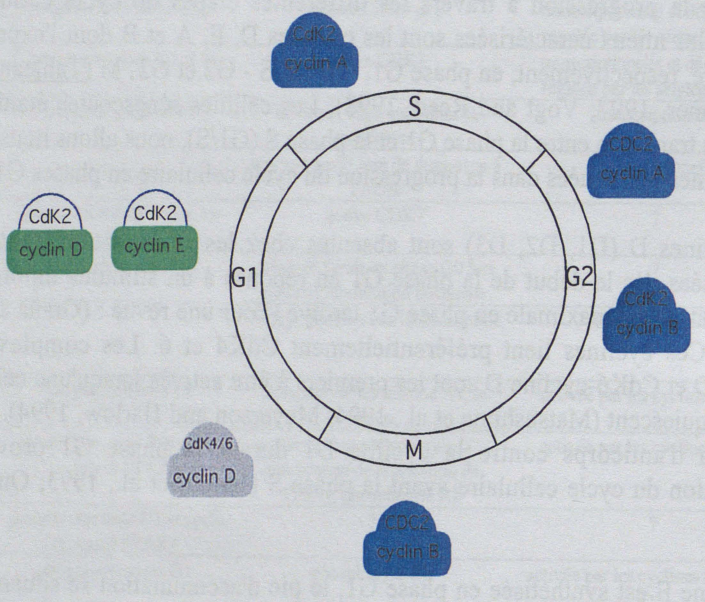



Fig. 9: Représentation simplifiée des différents complexes cycline-CDK qui sont affectés chez les cellules sénescentes, soit par modification de l'expression d'un des constituants du complexe soit par inhibition de l'activité du complexe (d'après Afshari *et al.*, 1993). Bordé de bleu: CdK2 inactives chez les cellules sénescentes, vert: surexprimés chez les cellules sénescentes, bleu: sous-exprimés chez les cellules sénescentes, gris: exprimés et actifs chez les cellules sénescentes.

*1.3.4.2 Les complexes cycline-CdK chez les cellules sénescentes.*

On note chez les cellules sénescentes une régulation altérée de l'expression ou de l'activité de divers complexes cycline-CdK (Fig.9).
Les cyclines D1 et E (cyclines de la phase G1) sont surexprimées de 10 à 15 fois chez les cellules sénescentes (Fukami et al., 1995; Lucibello et al., 1993), même si on les prive de facteurs de croissance ou de sérum, et leur expression augmente encore suite à une stimulation mitotique (augmentation de 25 à 50% pour la cycline D1 et de plus de 20% pour la cycline E).

CdK4 et CdK6 sont normalement présentes dans les cellules sénescentes (Wong and Riabowol, 1996). Les cyclines D s'associent donc bien avec elles pour former les complexes CdK4-cycline D, CdK6-cycline D. Toutefois, l'activité kinase de ces complexes est très faible chez les cellules sénescentes (Ezhevsky et al., 1997).

En ce qui concerne CdK2, certaines études rapportent qu'elle est bien présente chez les cellules sénescentes mais que les complexes CdK2-cycline D1 et CdK2-cycline E sont inactifs (Dulic et al., 1993). Cette absence d'activité kinase est attribuée à des défauts de phosphorylation. Les cyclines E et CdK2 sont très faiblement phosphorylées chez les cellules sénescentes. Il a été suggéré que cette incapacité à phosphoryler les complexes CdK2-cycline D1 et CdK2-cycline E et conséquemment, à les activer, est responsable partiellement de la non-phosphorylation de Rb en phase G1 tardive (Dulic et al., 1993). Par ailleurs, d'autres études montrent que l'ARNm de CdK2 n'est plus induit par une stimulation mitotique chez les cellules sénescentes (Tsuji et al., 1993).

On note aussi la répression des cyclines A et B (cycline B1) chez les cellules sénescentes (Fukami et al., 1995). La répression de la cycline A est attribuée à la non-phosphorylation de Rb.

La cycline H est également fortement réprimée chez les cellules sénescentes (Tsuji et al., 1993; Wong and Riabowol, 1996). La cycline H ne lie pas directement les CdKs comme les autres cyclines. Cette cycline particulière fait partie des kinases pouvant phosphoryler les CdKs (CAK: kinase activatrice de CdK). La phosphorylation des CdKs par les CAKs augmente très fortement leur activité (Kaldis, 1999). Les CAKs sont des complexes composés d'une sous-unité catalytique $p40^{MO15}$ (Fesquet et al., 1993; Poon et al., 1993; Solomon et al., 1993; Tassan et al., 1994) appelé aussi CdK7, une sous-unité régulatrice la cycline H (Fisher and Morgan, 1994; Mäkelä et al., 1994) et un facteur de "regroupement" MAT-1 (Fisher et al., 1995; Tassan et al., 1995).
Des études structurales et biochimiques ont mis en évidence que la phosphorylation activatrice altère l'interface des CdKs par rapport à son substrat (Morgan, 1996;

Russo et al., 1996) mais aussi stabilise son interaction avec les cyclines (Desai et al., 1992; Ducommun et al., 1991).
En absence de ces CAKs, Rb ne peut plus être phosphorylée (Wu et al., 2001).

### 1.3.5. Les inhibiteurs de complexes cycline-CdK.

Les complexes cycline-CdK sont régulés négativement par une série de protéines de faible poids moléculaire. Ces protéines inhibitrices de la croissance cellulaire ont été classées en deux familles : la famille Ink-4 et la famille de $p21^{Waf-1}$.

*1.3.5.1 La famille Ink-4* (Pour une revue:(Vogt and Reed, 1998)).

La famille Ink-4 comprend quatre protéines dont: $p16^{Ink-4a}$, $p15^{Ink-4b}$ et $p19^{Ink-4d}$ qui nous intéressent dans ce travail (Chan et al., 1995; Guan et al., 1994; Hannon and Beach, 1994; Hirai et al., 1995; Kamb et al., 1994; Serrano et al., 1993). La caractéristique de cette famille d'inhibiteurs est qu'ils lient tous les complexes protéiques contenant CdK4 et CdK6. L'association de $p16^{Ink-4a}$ à un complexe CdK4-cycline D provoque sa dissociation. La liaison de $p16^{Ink-4a}$ à CdK4 monomérique empêche la liaison CdK4-cycline. Cette famille exerce donc son action inhibitrice de deux manières distinctes soit en empêchant la liaison de la cycline activatrice (Hirai et al., 1995) soit en dissociant la cycline de la CdK (Parry et al., 1995).

Le fait que la protéine $p16^{Ink-4a}$ inhibe l'association de CdK4 et CdK6 avec les cyclines de type D explique l'inhibition conséquente de la phosphorylation de Rb. La phosphorylation de Rb est donc régulée par ces complexes (Tableau 4). L'hypophosphorylation de Rb empêche le passage en phase S (Serrano et al., 1993). La protéine $p16^{Ink-4a}$ est surexprimée chez les fibroblastes sénescents (Hara et al., 1996; Wong and Riabowol, 1996) et se maintient à un niveau très élevé pendant au moins 2 mois après la dernière division cellulaire (Stein and Dulic, 1998).

L'expression de la protéine $p15^{Ink-4b}$ est drastiquement induite par l'action du Transforming Growth-Factor-ß1 (TGF-ß1), ce qui pourrait expliquer que cette cytokine provoque l'arrêt de la mitose (Hannon and Beach, 1994). L'expression de $p15^{Ink-4b}$ est corrélée avec une association aux complexes CdK4-cycline D et CdK6-cycline D, ce qui inhibe l'activité kinase de ces complexes (Hannon and Beach, 1994). La protéine $p15^{Ink-4b}$, tout comme $p16^{Ink-4a}$ induit un arrêt du cycle en phase G1 (Tableau 4). La surexpression de $p15^{Ink-4b}$ dans des lignées immortelles provoque un arrêt irréversible de la division cellulaire, par inhibition des complexes à CdK4 et CdK6 (Fuxe et al., 2000). De plus, $p15^{Ink-4b}$ est surexprimée au cours du vieillissement *in vitro* des lymphocytes et participe à l'entrée en sénescence de ces cellules (Erickson et al., 1998). A l'opposé, une autre étude montre que le niveau

d'expression des protéines $p15^{Ink-4b}$ comme $p19^{Ink-4d}$ ne varie pas lors de la sénescence réplicative (Robetorye et al., 1996).

*1.3.5.2 La famille de p21 SDI/CPI/Waf (Pour une revue:*(Vogt and Reed, 1998)*).*

La seconde famille d'inhibiteurs de complexes cycline-CdK est constituée par $p21^{Waf-1}$, $p27^{Kip1}$ et $p57^{Kip2}$. Cette famille a un spectre d'activités beaucoup plus large que la précédente et peut inhiber tous les complexes cycline-CdK présents en phase G1, et également bloquer la phase G2 (Harper et al., 1993; Lee et al., 1995; Polyak et al., 1994b; Polyak et al., 1994a). Contrairement à la famille précédente, celle-ci a une affinité beaucoup plus importante pour les complexes cycline-CdK que pour les CdKs monomériques (Lees, 1995).

La protéine $p21^{Waf-1}$ contient deux régions fonctionnelles indépendantes. Un domaine de liaison et d'inhibition des complexes cycline-CdK partagé avec $p27^{Kip1}$ et $p57^{Kip2}$ est situé dans la partie C-terminale de la protéine (Matsuoka et al., 1995). Ce domaine peut bloquer la réplication d'ADN par liaison à PCNA (Chen et al., 1995b; Chen et al., 1996a; Goubin and Ducommun, 1995; Luo et al., 1995; Nakanishi et al., 1995; Waga et al., 1994; Warbrick et al., 1995). $p21^{Waf-1}$ peut inhiber toutes les CdKs connues comme ayant un rôle en phases G1 et S du cycle cellulaire: à savoir CdK2, CdK4 et CdK6 (Harper et al., 1995) (Tableau 4).

Il faut noter que la protéine $p21^{Waf-1}$ est également présente dans nombre de complexes cycline-CdK actifs des cellules en prolifération. Cela suggère qu'en condition normale de croissance, $p21^{Waf-1}$ n'a pas un rôle inhibiteur. Ces deux actions contradictoires de $p21^{Waf-1}$ seraient principalement une question de stœchiométrie. En effet, il apparaît que l'inhibition de complexes cycline-CdK par $p21^{Waf-1}$ requiert plusieurs molécules de $p21^{Waf-1}$. $p21^{Waf-1}$ n'a donc pas d'action inhibitrice en condition normale lorsqu'une seule molécule lie le complexe cycline-CdK (Zhang et al., 1994). De fait, il a été montré que $p21^{Waf-1}$ est aussi induite légèrement suite à des stimulations par des facteurs de croissance (Macleod et al., 1995).

$p21^{Waf-1}$ est activée transcriptionnellement par la protéine p53 suite à des dommages à l'ADN et inactive le complexe CdK2-cycline E (Dulic et al., 1994; El-Deiry et al., 1993). $p21^{Waf-1}$ régule donc l'arrêt de la mitose induit par p53 (Tableau 4). Nous décrivons plus bas le rôle de p53 dans la sénescence cellulaire.

Le niveau d'ARNm de $p21^{Waf-1}$ est présent en quantité de 10 à 20 fois plus élevée chez les FHDs IMR-90 sénescents par comparaison avec des FHDs IMR-90 jeunes en état de proliférer (Noda et al., 1994; Smith, 1992; Wong and Riabowol, 1996). L'inhibition de la mitose chez les cellules sénescentes serait régulée par l'action de $p21^{Waf-1}$ sur le complexe CdK-cycline. Le pic de surexpression de $p21^{Waf-1}$ est atteint avant l'entrée en sénescence, c'est-à-dire lors des derniers doublements de population

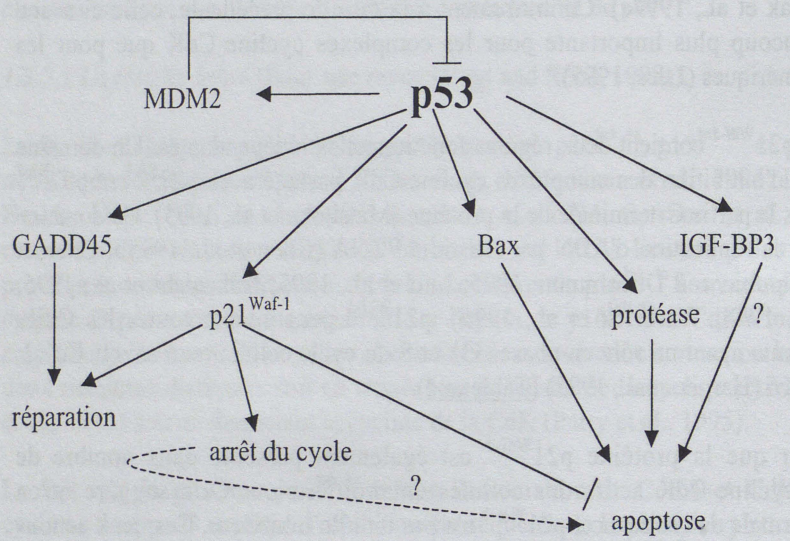



Fig.10: Principaux gènes cibles de p53. Le facteur de transcription p53 est activé en réponse à des dommages à l'ADN. Il active ensuite la transcription de gènes dont les produits sont des inhibiteurs du cycle cellulaire ($p21^{Waf-1}$, GADD45) ou sont impliqués dans le déclenchement de l'apoptose (IGFBP-3, Bax). p53 active aussi la transcription de MDM2, un régulateur positif de sa dégradation (d'après Vogt et Redd, 1998).

(Mazars and Jat, 1997). Une fois la sénescence installée, le niveau d'expression de $p21^{Waf-1}$ diminue de manière concomitante à une hausse importante du niveau d'expression de $p16^{Ink-4a}$. On peut donc voir l'établissement de la sénescence réplicative comme un processus en au moins deux étapes, qui nécessitent l'expression, tour à tour, de plusieurs inhibiteurs de la croissance. Le fait que $p16^{Ink-4a}$ et non $p21^{Waf-1}$ soit la protéine qui maintienne l'arrêt à long terme de la croissance expliquerait pourquoi $p16^{Ink-4a}$ est souvent mutée dans des tumeurs de différents types, alors que c'est rarement le cas de $p21^{Waf-1}$ (Alcorta et al., 1996; El-Deiry, 1998). De plus, des souris $p16^{Ink-4a\ -/-}$ présentent un risque accru de développement de tumeurs (Serrano et al., 1996), ce qui n'est pas le cas de souris $p21^{Waf-1\ -/-}$ (Brugarolas et al., 1995).

$p27^{Kip1}$ inhibe les activités de CdK2-cycline A et CdK2-cycline E (Tableau 4) (Koff et al., 1993; Polyak et al., 1994b; Polyak et al., 1994a). Il y a peu, on ne connaissait pas de relation entre le niveau d'expression de $p27^{Kip1}$ et l'entrée en sénescence des cellules prolifératives. $p27^{Kip1}$ semblait plutôt réguler l'état de quiescence (Wong and Riabowol, 1996).Toutefois, on sait depuis peu que $p27^{Kip1}$ est essentielle à l'apparition de la sénescence. Des cellules d'oestracome humain traitées avec des oligonucléotides antisens de $p27^{Kip1}$ n'entrent plus en sénescence, tandis que les cellules contrôles entrent en sénescence (Alexander and Hinds, 2001).

### 1.3.6 p53 et la protéine du rétinoblastome (Rb).

#### *1.3.6.1 p53.*

p53 est un facteur de transcription qui joue un rôle majeur dans l'arrêt de la prolifération et l'apoptose. En condition normale, p53 est présent dans la cellule en très faible quantité et son expression est fortement induite par les agents causant des dommages à l'ADN tels que les UV et les stress oxydatifs. La conséquence de l'activation de p53 est soit l'arrêt de la prolifération soit l'apoptose, suivant le type cellulaire, la nature, l'intensité du stimulus ainsi que le niveau de p53 induit (Ko and Prives, 1996; Levine, 1997; Murphy and Levine, 1997).

L'activation de p53 conduit à l'expression de gènes cibles comme GADD45 et IGF-BP3 (Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 3). GADD45 est un inhibiteur du PCNA mais est aussi connu pour interagir avec les nucléosomes endommagés suite à des irradiations aux UV. Cette interaction modifierait l'accessibilité protéique à l'ADN. Il a en effet été montré que GADD45 augmentait l'accessibilité de la DNAse I à l'ADN endommagé (Carrier et al., 1999). IGF-BP3 est un inhibiteur de l'IGF et de $p21^{Waf-1}$ (Fig.10) (Kastan et al., 1992; Levine, 1997); pour des revues: (Hansen and Oren, 1997; Wang and Harris, 1997)). L'IGF ou Insulin-like Growth Factor, qui est

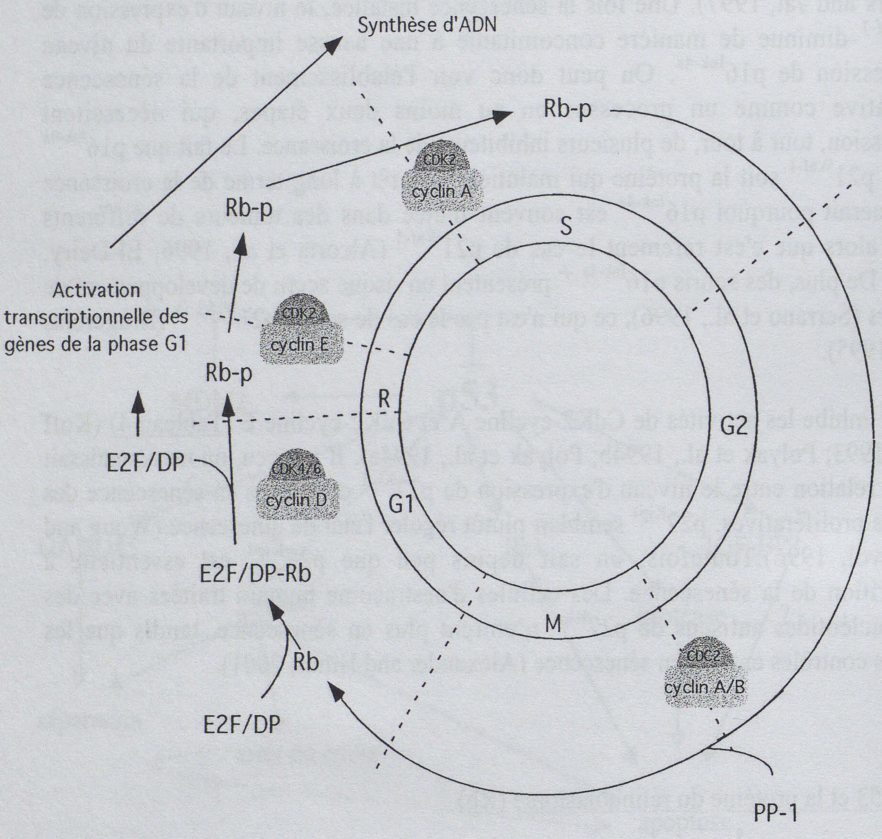



Fig. 11: Régulation de la phosphorylation de Rb pendant le cycle cellulaire (d'après Grana et Reddy, 1995). Rb est phosphorylée dès le milieu de la phase G1 par les complexes CDK4/6-cycline D. Avec cette phosphorylation de Rb, le point de restriction (R) est franchi. Rb phosphorylée libère le facteur de transcription E2F qui est un activateur de transcription de divers gènes nécessaires à la synthèse d'ADN et à la transition G1/S. La phosphorylation de Rb est maintenue jusqu'en phase M.

similaire en structure et en séquence à l'insuline, est synthétisé principalement dans le foie. Alors que l'insuline régule la quantité de glucose dans le sang, la croissance tissulaire est induite par l'IGF (Lodish et al., 1995).

p53 est surexprimé chez les cellules sénescentes (Kulju and Lehmn, 1995). Ses activités de liaison à l'ADN et de transactivation y sont augmentées chez les cellules sénescentes (Atadja et al., 1995; Haupt et al., 1995). De plus, des cellules déficientes en p53 présentent un retard important dans la sénescence (Bond et al., 1996; Bond et al., 1994; Rogan et al., 1995; Wazer et al., 1995).

La protéine codée par le gène *MDM2* (Mouse Double Minut 2) est le plus important régulateur de la stabilité de p53. *MDM2* est capable d'activer la dégradation de p53, en se liant à celui-ci (Haupt et al., 1997; Momand et al., 1992; Oliner et al., 1992). L'activation de la transcription de *MDM2* est elle-même régulée par p53 (Barak et al., 1993). Il faut savoir que *MDM2* est réprimé chez les fibroblastes sénescents.

*1.3.6.2 Rb.*

La protéine Rb ainsi que deux autres protéines de la même famille, p107 et p130, sont des corépresseurs transcriptionnels qui régulent le cycle cellulaire. L'activité de Rb est contrôlée par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation (De Caprio et al., 1989)(pour une revue: (Herwig and Strauss, 1997)). En G0 et G1 précoce, Rb est principalement déphosphorylée, alors qu'en G1 tardive, S, G2 et M, Rb est hyperphosphorylée. Rb joue le rôle fondamental de gardien du point de restriction (R point, restriction point), une transition clé dans le cycle cellulaire (Fig.11) (Lodish et al., 1995). En effet, des cellules tumorales n'exprimant pas Rb passent le point R sans encombre. Par contre, lorsque l'on réintroduit Rb dans ces cellules, elles peuvent entrer en sénescence (Xu et al., 1997).
Une fois passé ce point de restriction, gardé par Rb, la cellule quitte la phase G1 et entre irréversiblement en phase S (Bartek et al., 1996).

Divers complexes cycline-CdK sont impliqués dans la phosphorylation de Rb : les complexes CdK4-cycline D et CdK6-cycline D en G1 précoce, CdK2-cycline A et CdK2-cycline E en phase G1 tardive (Fig.11) (Pour une revue:(Bartek et al., 1996)).
A côté de ce mécanisme de phosphorylation qui peut être inhibé par les membres de la famille de $p16^{Ink-4a}$ ou de $p21^{Waf-1}$, il existe un système de déphosphorylation. En effet, des phosphatases, principalement la phosphatase PP1, peuvent interagir avec Rb pour la déphosphoryler (Durfee et al., 1993). L'inhibition de l'activité kinase des complexes cycline-CdK et les phosphatases peuvent fonctionner en synergie (Pour une revue: (Rubin et al., 1998)). Lorsque Rb est hypophosphorylée, elle agit en tant qu'inhibiteur du cycle cellulaire et retient les cellules en phase G1. Rb hypophosphorylée lie et inhibe des facteurs de transcription comme ceux de la

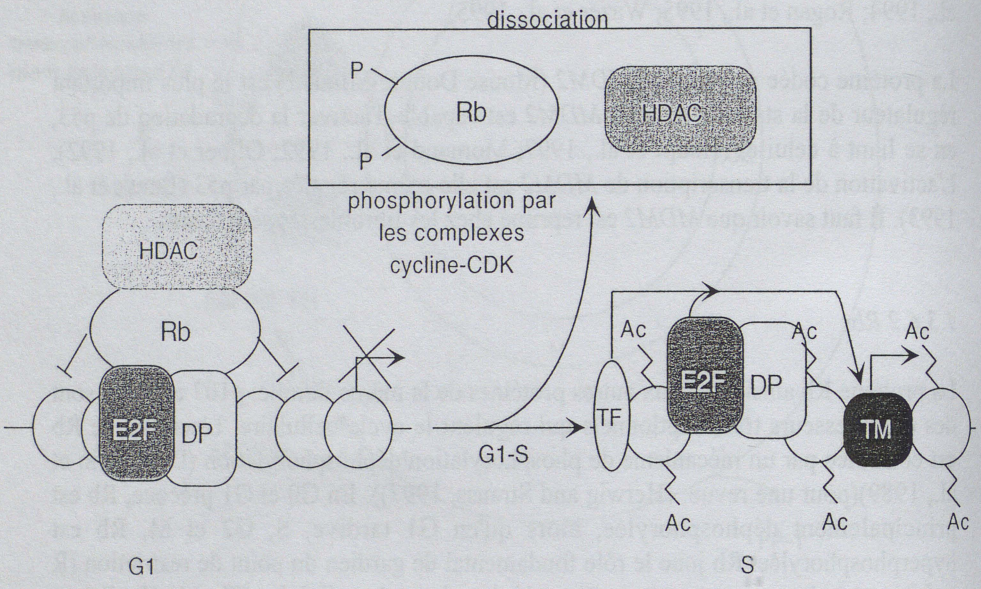



Fig. 12: Représentation schématique de l'interaction de Rb avec les histones déacétylases. Un complexe formé de Rb et d'une histone déacétylase (HDAC) se lie sur les promoteurs des gènes spécifiques de la phase S via le facteur de transcription hétérodimérique E2F-DP (differentiation-regulated transcription factor polypeptide). La HDAC agit directement sur la chromatine environnante et lui fait prendre une conformation très fermée empêchant la transcription. Avant la transition G1/S, la phosphorylation de Rb par les complexes cycline-CdK dissocie le complexe répresseur. Les histones de la chromatine sont alors acétylés provoquant une ouverture de la structure tridimensionnelle de la chromatine. Les facteurs de transcription (TF) peuvent alors se fixer sur leur site de liaison et activent avec le complexe E2F-DP libre la machinerie transcriptionelle (TM). Ac: résidus lysine acétylés (d'après Brehm et Kouzarides, 1999).

famille E2F (Fig.11). Ceux-ci sont des facteurs de transcription hétérodimériques formés par l'association d'un membre de la famille E2F (E2F-1, -2, -3, -4, -5) avec un membre de la famille DP (DP-1, -2, -3) (La Thangue, 1994). Les complexes contenant E2F-1, -2, -3 lient Rb. Les complexes contenant E2F-4, -5 lient p107 et que p130 se fixe uniquement aux complexes contenant E2F-5.

Par son association physique au facteur E2F déjà lié au promoteur des gènes cibles, Rb agit de deux manières différentes: il masque le domaine de transactivation de E2F et recrute des histones déacétylases (HDACs) qui ont une fonction dans la répression de la transcription (DePinho, 1998; Weinberg, 1995). Rb forme donc avec E2F et les HDACs un complexe multimérique (Brehm and Kouzarides, 1999; Brehm et al., 1998). Les HDACs répriment la transcription de gènes en augmentant l'affinité des histones pour l'ADN, masquant de ce fait les séquences régulatrices de certains gènes (Fig.12). A l'heure actuelle, le rôle des HDACs dans l'entrée en sénescence réplicative des cellules humaines reste à préciser. Une étude a mis en évidence que les inhibiteurs de HDACs induisent un état proche de la sénescence chez les fibroblastes humains. Un arrêt de la croissance est concomitant avec une élévation de la proportion de cellules positives pour l'activité SA β-gal et l'hypophosphorylation de Rb (Ogryzko et al., 1996).

Les facteurs de transcription de la famille E2F sont responsables de l'activation de la transcription de nombreux gènes nécessaires à la transition G1/S et à la synthèse d'ADN (Weintraub et al., 1992). (Fig.13). Plus de 30 gènes régulés par E2F sont connus (Pour une revue: (Cristofalo et al., 1998a)). Il est admis que la déficience en E2F actif chez les cellules sénescentes serait responsable de la répression des gènes de la transition G1/S ((Nevins, 1992); pour une revue: (Farnham et al., 1993)). Dans les cellules sénescentes, E2F n'est pas seulement inactif en raison de l'hypophosphorylation de Rb. Il est également inactif parce que l'expression de E2F1, la sous-unité de E2F est réprimée alors qu'elle est normalement exprimée plusieurs heures avant la phase S (Dimri and Campisi, 1994; Dimri et al., 1994b; Slansky and Farnham, 1996). Certains de ces gènes sont impliqués dans la réplication de l'ADN et le métabolisme des nucléotides comme l'ADN polymérase α, PCNA, la DHFR, la TK et la TS (Good et al., 1996). D'autres sont des régulateurs du cycle cellulaire comme les cyclines A, B (Good et al., 1996), D1 et E et $p19^{Ink-4d}$ (Fig.13) et même un membre de la famille de la famille de Rb, en l'occurrence p107 (Good et al., 1996). D'autres encore sont des facteurs de transcription, dont les membres de la famille E2F eux-mêmes ((Kouzarides, 1995; Weinberg, 1995; Weinberg, 1996); pour des revues: (Nevins et al., 1997; Sellers and Kaelin, 1996; Sladek, 1997)).

Suivant un modèle récemment proposé, les complexes formés par E2F-4, -5 et p130 fonctionneraient comme répresseurs des gènes E2F-1, -2, -3. La phosphorylation de p130 provoquerait la dérépression de ces gènes, en milieu de G1 (De Gregori et al., 1997). A son tour, Rb hypophosphorylé lierait E2F-1, -2, -3 jusqu'à sa

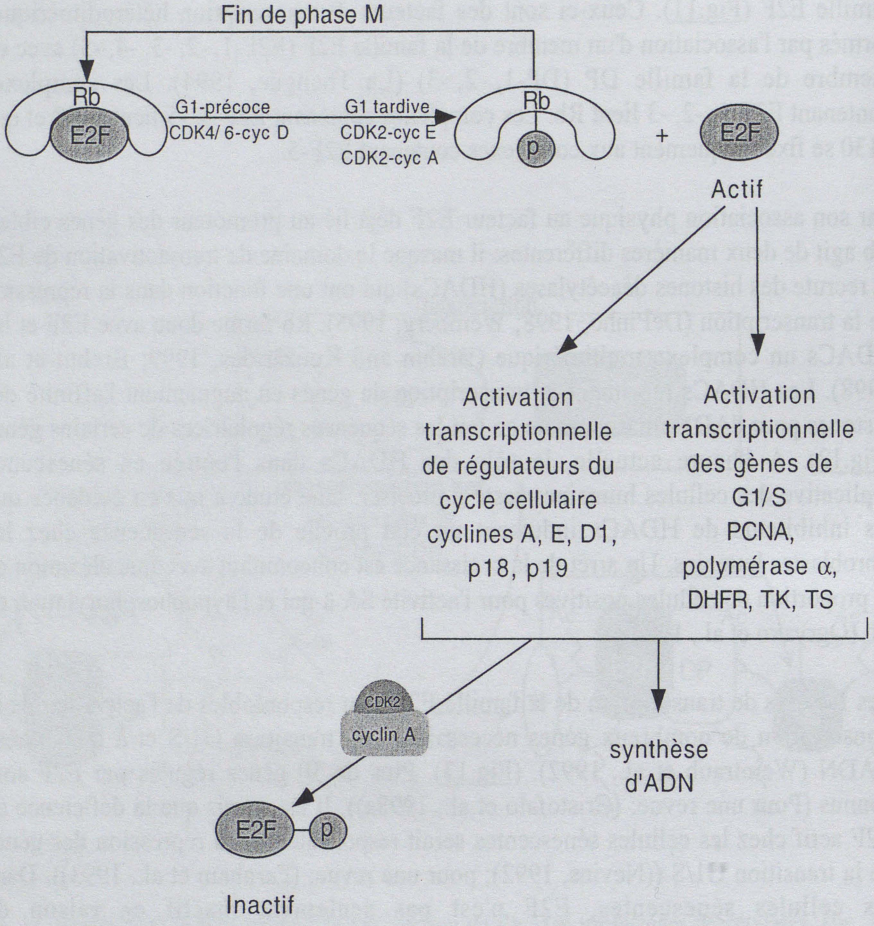



Fig. 13: Rôle de Rb dans la régulation du cycle cellulaire (d'après Lodish *et al.*, 1995). La phosphorylation de Rb dès la phase G1 est assurée par différents complexes cyclines-CdK. Il en résulte en la libération du facteur de transcription E2F. Dès lors actif, E2F active la transcription de nombreux gènes dont les produits sont impliqués dans la réplication de l'ADN ou la régulation du cycle cellulaire. E2F active entre autre la synthèse de la cycline A. Le complexe cycline A-CdK2, actif en phase S, inactivera E2F par phosphorylation.

A

| | formation d'hétérodimères | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ATF-1 | ATF-2 | ATF-3 | ATF-4 |
| c-Jun | - | + | + | + |
| c-Fos | - | - | - | + |

B

| hétérodimères | site de liaison à l'ADN |
|---|---|
| ATF-2/c-Jun | CRE > ENK-2 > AP-1 |
| ATF-3/c-Jun | CRE,AP-1, ENK-2 |
| ATF-4/c-Fos | CRE |
| ATF-4/c-Jun | CRE |

Table 5:
A) Tableau représentant les différents hétérodimères possibles entre les membres de la famille ATF et c-Jun et c-Fos (d'après Hai et Curran, 1991).
B) Tableau représentant l'affinité des hétérodimères de la figure précédente avec leurs différents sites de liaisons (d'après Hai et Curran, 1991).

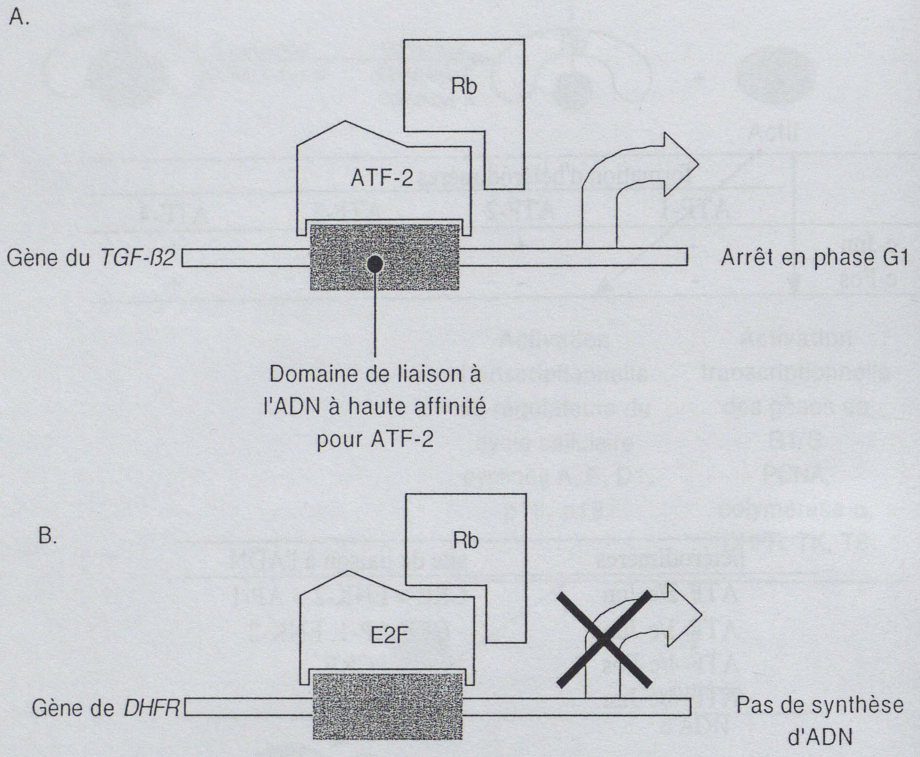



Fig. 14: Double fonction de Rb dans la régulation de l'expression génique (d'après Hollingsworth *et al.*, 1993).
(A) Régulation positive: Le facteur de transcription ATF-2 se fixe sur un site de liaison spécifique sur le promoteur du gène *TGF-ß2*. Cette transactivation est stimulée par la surexpression de Rb, probablement par l'association ATF-2/Rb.
(B): Régulation négative: L'expression de la dihydrofolate réductase (*DHFR*), qui est nécessaire au passage en phase S, est activée par le facteur de transcription E2F. L'association de E2F avec Rb, conduit à l'arrêt de la transactivation du gène de *DHFR* mais pas la capacité de E2F à se lier au promoteur de *DHFR*.

phosphorylation. L'activation de la transcription par E2F pourrait alors se faire. Un des gènes dont la transcription est activée par E2F est celui de la cycline A. Les facteurs E2F sont à leur tour inactivés après l'entrée en phase S. A cet effet, ils sont phosphorylés par le complexe CdK2-cycline A, assurant ainsi l'activation périodique des gènes de la transition G1/S (Fig.13) (De Caprio et al., 1989; Krek et al., 1994; Mittnacht and Weinberg, 1991).

En conclusion, suite à l'hypophosphorylation de Rb, E2F est inactivé, ce qui conduit à une diminution d'expression de nombreux gènes nécessaires au passage en phase S et à la réplication de l'ADN. En effet, lors de la sénescence réplicative des FHDs IMR-90, il a été observé une sous-expression importante de E2F1, E2F3 (Good et al., 1996) et DP1 (Dimri et al., 1994b) médiant un arrêt de l'expression de DHFR, de la cycline A et de la cycline B (Good et al., 1996).

Outre son activité inactivatrice sur certains facteurs de transcription, Rb peut, sous sa forme hypophosphorylée, lier et activer le facteur de transcription ATF-2 (Activating Transcription Factor-2) (Hollingsworth et al., 1993; Kim et al., 1992) (Fig.14). ATF-2 est composé d'un domaine de liaison à l'ADN divisé en deux parties, d'une part une région formée d'acides aminés basiques et d'autre part une région de type tirette à leucine ZIP (leucine zipper). ATF-2 peut former un hétérodimère avec le facteur de transcription c-jun. L'affinité de ATF-2 pour c-jun et son site de liaison à l'ADN est similaire de celui des membres de la famille AP-1. Ceci permet à ATF-2 de se lier au site consensus CRE (Creb Response Element) avec une forte affinité, que ce soit sous forme d'un homodimère ou d'un hétérodimère avec c-jun (Hai and Curran, 1991)(Tableau 5).

Le facteur de transcription ATF-2 est responsable de l'activation de la transcription de nombreux gènes comme le TGF-ß1 et TGF-ß2 (Kim et al., 1992), pour une revue: (Hollingsworth et al., 1993; Kim et al., 1991)) (Fig.14), la fibronectine (Srebrow et al., 1993) mais aussi Rb via une boucle d'auto-régulation; le promoteur de Rb contenant 1 site Sp1, 1 site E2F et 1 site ATF-2 (Park et al., 1994).
Outre ces gènes, ATF-2 régule aussi l'expression de la topoisomérase I et l'ADN polymérase ß. Dans la cellule, les molécules d'ADN forment des superhélices que la topoisomérase peut déplier. ATF-2 peut donc activer des systèmes de réparation de l'ADN (Baumgartner et al., 1994; Kedar et al., 1991).

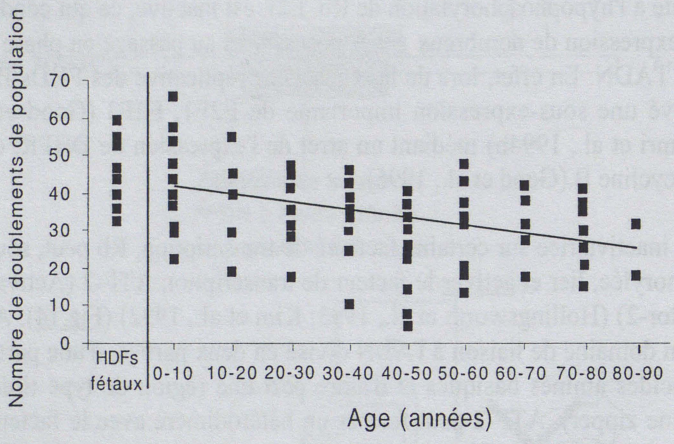



Fig. 15: Relation entre l'âge du donneur et le nombre de doublements de population effectués *in vitro*, pour des fibroblastes humains (d'après Martin *et al.*, 1970).

## Chapitre 2: Relation entre le vieillissement et la sénescence réplicative.

Pourquoi les personnes âgées ne répondent plus parfaitement aux stimuli de tous les jours? La réponse semble être que les organes qui fonctionnaient parfaitement et de concert au sein de l'organisme jeune ne peuvent plus assurer parfaitement leur fonction car les cellules qui les composent ont vieilli. Dans un organe où le renouvellement cellulaire est fréquent, les cellules déficientes sont remplacées dans les limites de la capacité proliférative de ces cellules. Par contre, dans un tissu où le renouvellement est faible voire inexistant ou encore où les cellules auraient atteint leur limite de potentiel prolifératif, l'intégrité du tissu et de la fonction de ce tissu serait altérée. C'est donc la capacité proliférative des cellules composant un tissu qui déterminerait la durée de vie de ce tissu et *in fine* la vie de l'individu. Cette hypothèse de relation entre le vieillissement et la sénescence réplicative se base sur des constatations expérimentales plus ou moins établies:

-Si on met en culture des cellules d'un même type provenant de donneurs d'âges différents, on constate que le nombre de passages en culture réalisés par ces cellules diminue avec l'âge de ces donneurs (Martin et al., 1970) (Fig.15).
Par exemple, des fibroblastes fœtaux humains qui normalement réalisent entre 60 et 80 passages en culture en réalisent 20 à 40 s'ils proviennent de biopsies de jeunes adultes et ne font plus que 10 à 20 passages en culture s'ils proviennent de prélèvements sur des personnes âgées (Bruce et al., 1986; Daniel, 1972; Daniel et al., 1968; Hayflick, 1965; Le Guilly et al., 1973; Martin et al., 1970; Röhme, 1981; Schneider and Mitsui, 1976). Par années d'âge du donneur, il y a une perte de 0,2 passages en culture des cellules (Schneider and Mitsui, 1976).
Cette donnée est actuellement soumise à controverse. En effet, il semble difficile de reproduire ces résultats. Plus de 240 biopsies sur des personnes différentes et de différents âges ont été réalisées sans que cette relation ne soit observée dans aucune de ces biopsies (Cristofalo et al., 1998b; Rattan, 2001).

- *In vivo*, on peut observer des fibroblastes qui montrent la morphologie typique de cellules sénescentes *in vitro*. Les cellules sont en général de forme élargie et étalée et présentent de nombreuses granulations ainsi qu'un volume nucléaire agrandi comme dans le cas de la sénescence réplicative normale (Bruce, 1991). Le modèle des morphotypes décrit précédemment s'applique également *in vivo*. A partir de biopsies de peau, on observe que la proportion des différents morphotypes varie suivant l'âge du donneur. Plus le donneur est jeune, plus les proportions des morphotypes précoces sont élevées. Ainsi entre 0 et 20 ans, une population typique de fibroblastes se compose de 15 % de MFI, de 70 % de MFII et de 15 % de MFIII. De 60 à 80 ans, la proportion des morphotypes est de 25 % de MFII, de 35 % de MFIII, de 10 % de PMFIV et de 30 % de PMFV + VI. On note donc avec l'âge que les cellules *in vivo*

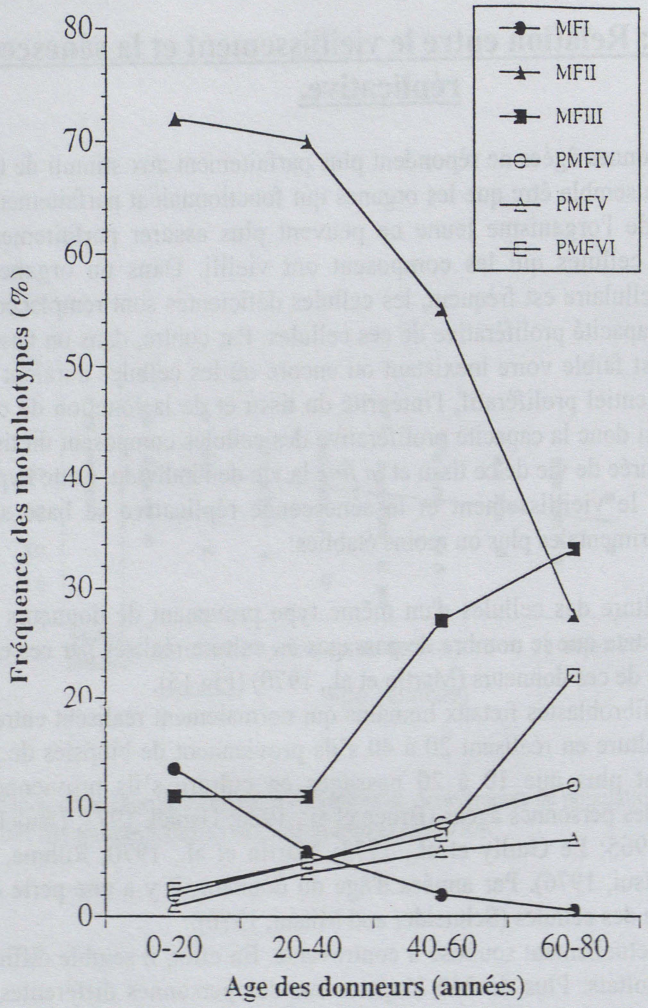



Fig. 16: Relation entre l'âge du donneur et le nombre de doublements de population effectués in vitro, pour les fibroblastes humains (d'après Bayreuther *et al.*, 1988a).

évoluent vers les morphotypes plus âgés (Bayreuther et al., 1992; Bayreuther et al., 1988b) (Fig.16).

- Des fibroblastes de muscles squelettiques, de cœur et de rein humains *in vivo* présentent, comme les fibroblastes sénescents de muscles squelettiques en culture, des délétions au sein du génome mitochondrial (Liu et al., 1998). Cet accumulation est aussi observable chez d'autres mammifères comme le singe (Lee et al., 1994b).

- La proportion de cellules marquées pour l'activité ß-galactosidase associée à la sénescence présente *in vivo* augmente avec l'âge (Dimri et al., 1995).

- Nous avons déjà mentionné que le raccourcissement télomérique est observé aussi bien *in vivo* (Lindsey et al., 1991) que dans la sénéscence réplicative *in vitro*. De plus, ce raccourcissement est de même ordre par division cellulaire dans les deux situations (Harley et al., 1990; Levy et al., 1992).

- Un autre argument découle des observations réalisées sur des fibroblastes humains de personnes atteintes de maladies qui miment un vieillissement accéléré comme le syndrome de Werner . Le syndrome de Werner (WS) est une maladie autosomale récessive rare dont les patients affectés présentent les symptômes d'un vieillissement prématuré. Les personnes atteintes par le syndrome de Werner présentent une mutation dans un gène codant pour une protéine de la famille des RecQ hélicases (Gray et al., 1997; Yu et al., 1996). Les hélicases sont des enzymes impliqués dans la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN (Bohr et al., 1998; Chakraverty and Hickson, 1999). Il a été montré très récemment que ce gène responsable du WS est impliqué dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN (Li and Comai, 2000), dans la réplication de l'ADN dépendante de la polymérase δ (Kamath-Loeb et al., 2000) et dans la maintenance des séquences télomériques. Cette maladie génétique raccourcit fortement la durée de vie moyenne des patients et la durée de la vie réplicative des cellules. Il a en effet été démontré que les fibroblastes provenant de ces personnes présentent un potentiel prolifératif restreint (Busk, ; Goldstein, 1979; Martin et al., 1970; Salk et al., 1981a; Salk et al., 1981b). Une proportion accrue de cellules positives pour l'activité SA ß-gal est aussi observée (Dimri et al., 1995). Des fibroblastes provenant de biopsies de jeunes adultes atteints par le syndrome de Werner ne peuvent réaliser que de l'ordre de 10-20 passages en culture au lieu de 50 à 60 pour des fibroblastes provenant d'individus normaux (Faragher et al., 1993; Kill et al., 1994; Salk, 1982; Salk et al., 1981a; Salk et al., 1981b). Il a aussi été démontré que la transfection de la télomérase permet une extension du potentiel proliférati des fibroblastes de personnes atteintes du syndrome de Werner (Wyllie et al., 2000).

# Chapitre 3: Théories de la sénescence réplicative et du vieillissement.

Actuellement, on pense que la sénescence réplicative permettrait d'arrêter la division cellulaire lorsque des dommages à l'ADN anormalement élevés surviennent, ceci pouvant conduire à la transformation voire à l'immortalisation cellulaire (Campisi et al., 1996a).
Pour qu'une cellule se transforme et soit capable de former des tumeurs, il faut que ses multiples systèmes de contrôle du cycle cellulaire soient supplantés. On estime en général qu'il faille de l'ordre de 20 à 30 mutations dominantes pour qu'une cellule cancéreuse apparaisse. L'apparition de ces mutations successives n'est généralement possible que si une durée de temps considérable s'est écoulée. Ceci explique que le nombre de cancer augmente avec l'âge. Ceci étant dit, la capacité proliférative des cellules diminue avec le nombre de divisions et l'on estime que le caractère fulgurant de certaines tumeurs diminue avec l'âge. Par exemple, il a été démontré suite à l'accident nucléaire de Tchernobyl que les personnes très jeunes au moment de l'accident ont une période de latence beaucoup plus courte avant l'apparition de cancers (Macieira-Coelho, 2001). On a aussi supposé que la limitation du nombre maximum de divisions cellulaires dû à la sénescence réplicative, empêche dans une certaine mesure le développement de cancers (Pour une revue: (Wright and Shay, 2001)).
Il est d'ores et déjà intéressant de noter qu'une accumulation excessive de dommages à l'ADN peut apparaître dans d'autres circonstances que le vieillissement. On pense par exemple à l'exposition de cellules à des stress oxydatifs. Dans cette perspective, un arrêt irréversible de la prolifération de cellules dont l'ADN est trop endommagé avant qu'elles n'atteignent la sénescence réplicative, offrirait donc un moyen d'empêcher une perte de contrôle de leur cycle cellulaire. Ceci nous fait comprendre de suite que deux grands types de mécanismes pourraient expliquer l'arrêt irréversible de prolifération observé chez les cellules sénescentes. En fait, actuellement, deux grandes écoles s'affrontent en ce qui concerne les théories explicatives de la sénescence réplicative: la théorie télomérique et la théorie des radicaux libres.

## 3.1. Théorie télomérique de la sénescence réplicative.

Selon cette théorie, le raccourcissement régulier des télomères est une sorte d'horloge mitotique. Lorsqu'une longueur critique des télomères est atteinte, le cycle cellulaire se bloquerait (Harley, 1991; Naveilhan et al., 1994). On a découvert que la sénescence réplicative des cellules murines est atteinte lorsque la longueur minimale d'un seul des télomères est atteinte. En effet, si l'on croise des souris télomérase négative $mTR^{-/-}$ qui possèdent des télomères courts avec des souris hétérozygotes pour la télomérase $mTR^{+/-}$ possédant des télomères longs, on obtient des cellules au phénotype identique à celui des cellules $mTR^{-/-}$ aux télomères courts bien que la

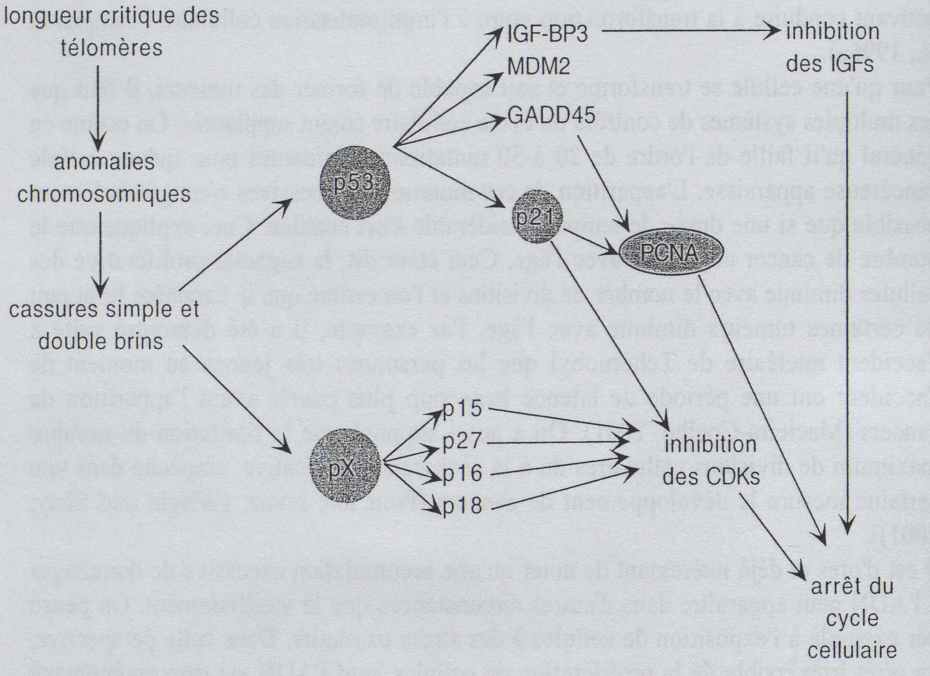



Fig. 17: Modèle d'induction de la sénescence réplicative par les télomères courts perçus comme dommage à l'ADN (d'après Vaziri et Benchimol, 1996).

moitié de leurs télomères soient longs (Hermann et al., 2001). Si le mécanisme de raccourcissement télomérique est connu (point 1.2.6), le mécanisme par lequel le raccourcissement des télomères pourrait induire la sénescence réplicative n'est pas encore tout à fait connu. Toutefois, un modèle semble de plus en plus accepté selon lequel les télomères courts sont perçus comme des dommages à l'ADN, ce qui induirait une réponse d'arrêt de la prolifération en phase G1 du cycle cellulaire (Pour une revue: (Vaziri and Benchimol, 1996)) (Fig.17).

Voici les arguments expérimentaux principaux qui soutiennent ce modèle.
On sait que des chromosomes possédant des télomères de tailles critiques peuvent fusionner pour former des chromosomes dicentriques (Benn, 1976; Counter et al., 1992) très instables. Puisque ces structures contiennent deux centromères, elles sont brisées en deux lors de la mitose suivante lors de l'attraction des deux centromères vers des pôles opposés du fuseau mitotique. Il en résulte des cassures doubles brins aléatoires, télomériques ou non (Vaziri and Benchimol, 1996). Ces cassures peuvent bloquer le cycle cellulaire lorsqu'elles sont détectées. Après cette détection, des mécanismes de réponse aux dégâts à l'ADN seraient activés conduisant par exemple à l'activation ou la surexpression de p53. Bien que les mécanismes conduisant à la surexpression et à l'activation de p53 restent peu clairs, différentes protéines sensibles aux dégâts à l'ADN sont connues comme pouvant activer par phosphorylation p53. La protéine ATM, qui est codée par le gène responsable de la maladie génétique ataxia telangiectasia, régule l'arrêt du cycle cellulaire suite à des dommages au niveau de l'ADN. Les cellules de personnes atteintes de cette maladie ne présentent plus d'activation de p53 suite à un traitement générant des dommages à l'ADN comme le peroxyde d'hydrogène et les radiations $\gamma$ (Pour une revue:(Prives, 1993)). Cette protéine possède un domaine C-terminal très proche de celui des phosphoinositide 3-kinases (PI-3 kinase). Elle est donc classée dans la famille de ces PI-3 kinases au même titre que la DNA-PK. ATM et la DNA-PK sont des protéines senseurs de dégâts à l'ADN et phosphorylent p53 au niveau des sérines 15 et 37. Ces phosphorylations activent et stabilisent p53 (Banin et al., 1998; Woo et al., 1998). Avec ATM, la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) est la protéine la mieux connue dans la régulation de p53 suite à l'apparition de dommages à l'ADN. La PARP est activé en se fixant au cassures des brins d'ADN. Une fois activée, elle s'associe physiquement avec p53 [Varizi, 1997 #62] et, à l'instar des phosphorylations, l'active par poly(ADP ribosyl)ation (Wang et al., 1998b).
D'autres protéines peuvent réguler l'activité de p53 comme *MDM2*. Toutefois, le rôle de *MDM 2* est plus complexe à mettre en évidence car il est lui-même régulé par p53 (Momand et al., 1992). Comme déjà décrit, l'activation de p53 conduit à la surexpression d'inhibiteurs des complexes cycline-CdK et donc à l'hypophosphorylation de Rb.

Cette hypothèse où les télomères courts sont perçus comme dégâts à l'ADN permet d'expliquer les résultats obtenus sur la protéine TRF-2. TRF-2 est une protéine

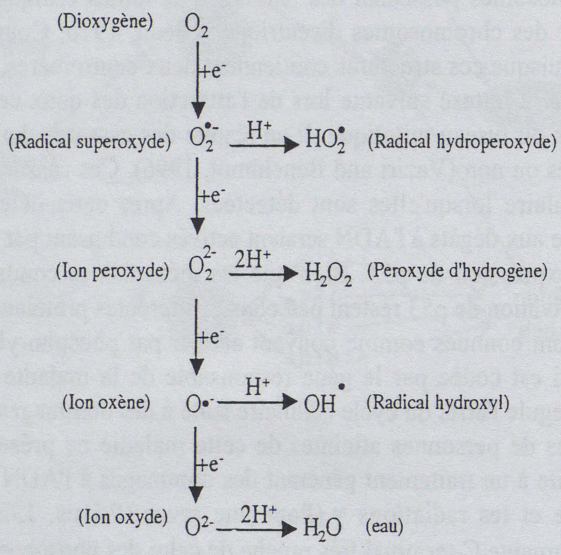



Fig. 18: Description des produits dérivés de la réduction monovalente de la molécule d'oxygène en eau (d'après Webster et Nunn, 1998).

pouvant se lier aux télomères et protégerait ceux-ci de fusions télomèriques ou interchromosomiques empêchant alors la formation de chromosomes dicentriques très instables pouvant se briser (de Lange, 2001). Le groupe de de Lange a montré que la surexpression de la protéine TRF-2 conduit à un raccourcissement accéléré des télomères sans induire la sénescence de ces FHDs IMR-90 surexprimant TRF-2. Chez les FHDs IMR-90 surexprimant TRF-2, la sénescence apparaît lorsque les télomères ont atteint une taille de 4 kb tandis que chez les FHDS IMR-90 sauvages, la sénescence apparaît pour une taille télomèrique de 7 kb. Donc, la sénescence réplicative serait induite par un changement dans le statut de protection des télomères courts plutôt que par un raccourcissement télomérique (de Lange, 2002; Karlseder et al., 2002). Cela veut dire que tant que les télomères courts ne peuvent fusionner, la sénescence n'est pas induite mais dès que cette fusion n'est plus évitable, le processus de sénescence est induit probablement par les protéines sensibles aux dégâts à l'ADN.

3.2 Théorie stochastique des radicaux libres.

L'utilisation de l'oxygène par les organismes aérobies entraîne une production de radicaux libres qui créent des dommages aux constituants cellulaires. La théorie des radicaux libres propose que la plupart des changements associés au vieillissement sont le fruit de l'accumulation des dommages dus aux radicaux libres dérivés de l'oxygène (Harman, 1956; Harman, 1981; Harman, 1998, pour une revue exhaustive: Beckman et Ames, 1998).

3.2.1 Radicaux libres dérivés de l'oxygène (reactive oxygen intermediates: ROI).

Les radicaux libres sont des espèces moléculaires contenant un nombre impair d'électrons. La présence d'un électron non apparié est la cause de leur très grande réactivité (Pryor, 1976; Webster and Nunn, 1988).
La plupart de ceux-ci subissent très rapidement un dimérisation ou une réaction où l'électron célibataire s'apparie à un autre électron. Nous traiterons ici des radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire.

A l'état fondamental, l'$O_2$ triplet possède 2 électrons non-appariés de spins parallèles logés dans des orbitales $\pi$. L'$O_2$ triplet réagit comme un diradical plus ou moins stable. Il peut convertir les radicaux $R^{\bullet}$ en radicaux hydroperoxydes ($R\text{-}OO^{\bullet}$). L'$O_2$ triplet ne peut oxyder spontanément une molécule chimique car il devrait réagir avec une espèce possédant une paire d'électrons de spins parallèles ou subir une inversion du spin d'un de ses électrons, ce qui est très improbable. En fait, l'ajout des électrons sur l'$O_2$ se fait un par un, donc par réduction monovalente de l'$O_2$ (Fig. 18).

La forme réactionnelle de l'oxygène où les deux électrons sont appariés dans une des orbitales $\pi$, l'autre étant vide, s'appelle l'oxygène singulet.

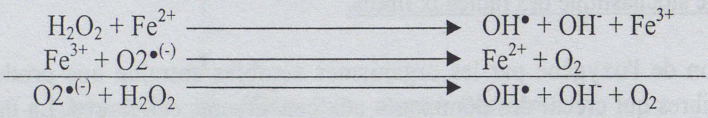



Fig. 19: Réaction d'oxydo-réduction entre un ion métallique de transition et un peroxyde. Ici, l'ion métallique est le fer, il s'agit de la réaction d'Haber-Weiss. Globalement, on parle de la réaction de Fenton.

L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) est une molécule d'oxygène qui a été réduite par un électron. Cet anion possède un électron non-apparié dans une orbitale π. Il réagit comme un oxydant faible ou comme arracheur d'hydrogène avec la plupart des molécules organiques. La réduction monovalente de l'anion superoxyde donne du peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$).

Le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$) est formé à partir d'$H_2O_2$ par la réaction de Fenton (Webster and Nunn, 1988). Cette réactions d'oxydoréduction se déroule entre un ion métallique de transition et un peroxyde. Dans la réaction d'Haber-Weiss/Fenton, le fer catalyse la décomposition du peroxyde d'oxygène (Pryor, 1976) (Fig.19). $OH^{\bullet}$ est tellement réactionnel qu'il a tendance à réagir avec la première molécule qu'il croise en lui prenant un hydrogène ou en s'additionnant aux doubles liaisons. Il peut entre autres, causer nombre de dommages à l'ADN.

Les hydroperoxydes et les radicaux peroxyles ($ROO^{\bullet}$) sont plus réactifs que l'$O_2^{\bullet(-)}$ et peuvent former l'$H_2O_2$. La production du radical hydroxyle par la réaction de Fenton est en partie responsable de la toxicité de l'$H_2O_2$.

L'$H_2O_2$ et l'$O_2$ singulet ne répondent pas à la définition pure de radical libre, mais sont pourtant très réactifs et sont dérivés de l'oxygène réduit de manière monovalente. C'est pourquoi dans la suite, nous parlerons de ROI (espèces réactionnelles dérivantes de l'oxygène) comprenant alors l'$H_2O_2$ et l'$O_2$ singulet.

Les ROIs peuvent réagir avec la plupart des liaisons insaturées des molécules biologiques. Les effets néfastes des ROIs sont bien connus. Par exemple, les membranes cellulaires peuvent êtres déstabilisées par les peroxydes lipidiques, ou leurs métabolites, issus des réactions radicalaires avec les acides gras polyinsaturés (pour une revue: (Chiu et al., 1989; Freeman and Crapo, 1982)). Les acides aminés des protéines, qu'ils soient insaturés ou contiennent une fonction thiol (-SH), sont aussi la cible des ROIs, ceci pouvant entraîner des fragmentations ou/et des agrégations de protéines et des inactivations enzymatiques (Benzi et al., 1991; Davies, 1987; Pigeolet and Remacle, 1991; Webster and Nunn, 1988). L'ADN n'est pas à l'abri des réactions radicalaires qui sont à l'origine de modifications de nucléotides (pour une revue: (Freeman and Crapo, 1982)) et de scissions simples ou doubles des brins d'ADN (pour une revue: (Freeman and Crapo, 1982; Lunec, 1990)). Les cellules ont développé des mécanismes de défense, enzymatiques ou non, afin de contrer l'action directe des ROIs. Il existe différents niveaux de défenses enzymatiques et non-enzymatiques, extracellulaires et intracellulaires (pour une revue:(Beckman et Ames, 1998)).

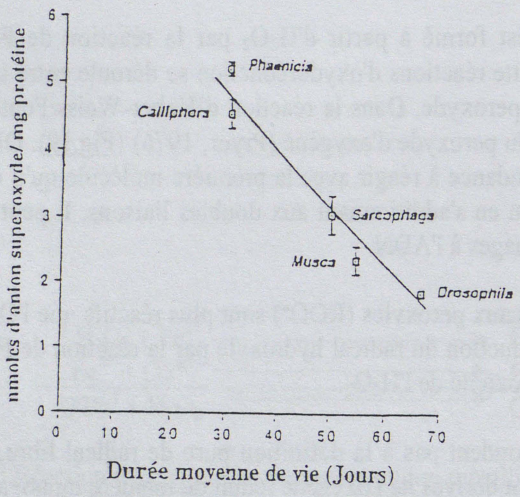



Fig. 20: Relation entre le taux de production d'anions superoxydes par les mitochondries et la durée de vie moyenne de cinq espèces de diptères (d'après Sohal *et al.*, 1995b).

### 3.2.2 Corrélation entre la production de ROIs et la durée de vie.

Des ROIs peuvent aussi être générés dans les mitochondries, lorsque s'échappent des électrons transférés dans la chaîne de transport des électrons dans la membrane mitochondriale interne. Environ 4 % des électrons transitant dans cette chaîne sont convertis en ROI (Boveris, 1984; Chance et al., 1979; Hansford et al., 1997; Turrens and Boveris, 1980). Ces électrons s'échappent vers l'$O_2$ pour former $O_2^{\bullet(-)}$ (Chance et al., 1979; Cross and Jones, 1991). Il a été montré que le niveau de production d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène par les mitochondries est inversément proportionnel à la durée de vie maximale pour une série limitée d'espèces d'invertébrés (Fig.20) et de vertébrés (Sohal et al., 1995b; Sohal et al., 1990b; Sohal et al., 1989a)

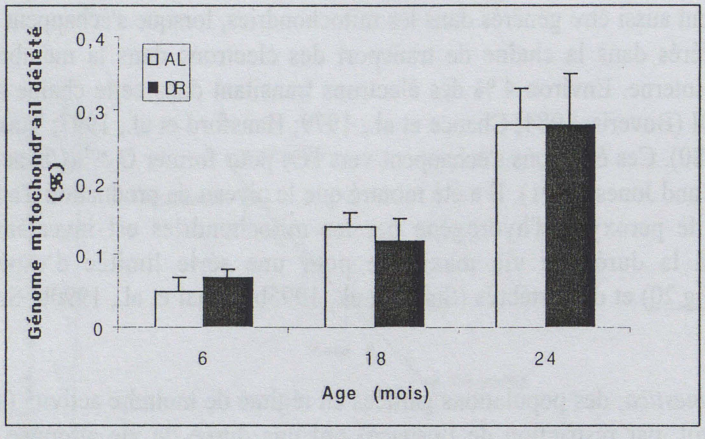
Chez *Musca domestica*, des populations gardées en régime de moindre activité (sans possibilité de vol, par restriction de l'espace) ont une durée de vie allongée par rapport à leurs congénères en activité normale. Les mitochondries de ces mouches en faible régime d'activité sont productrices de moins de peroxyde d'hydrogène et contiennent moins de fonctions carbonyles dans leurs protéines (Sohal and Dubey, 1994). Il existe donc une corrélation entre la durée de vie et la production de ROI par les mitochondries, ainsi que la quantité de dommages aux mitochondries au sein d'une espèce donnée.
On a également constaté une augmentation, avec l'âge, de la quantité des ROIs produits par les mitochondries que ce soit chez des insectes (Sohal and Orr, 1992; Sohal and Sohal, 1991) ou chez des mammifères (Nohl and Hegner, 1978; Shigenaga et al., 1994).

*In vitro*, les fibroblastes de différents mammifères montrent une corrélation positive entre leur durée de vie attendue et leur capacité de résister à des stress oxydatifs (Kapahi et al., 1999). Atamana *et al.* ont démontré qu'il existe une augmentation de 2 ou 3 fois de la production de ROI durant les 15 derniers passages en culture de FHDs IMR-90 (Atamna et al., 2000).
Une revue très complète a été publiée par beckman et Ames (1998) sur ces aspects.

#### *3.2.2.1 Restriction calorique et ROIs.*

Puisque le niveau du métabolisme et la production de ROIs sont liés, on peut supposer qu'une activité métabolique excessive peut être délétère et réduire la durée de vie. De fait, plusieurs expériences ont laissé entrevoir la possibilité de l'allongement de la durée de vie par des procédés de restriction calorique. Cela a été observé chez des rongeurs et chez des invertébrés (Roth et al., 1995). Dans les régimes qui fournissent la quantité nécessaire de nutriments essentiels et de vitamines, et qui évitent la malnutrition tout en limitant la quantité totale d'énergie

A.




B.

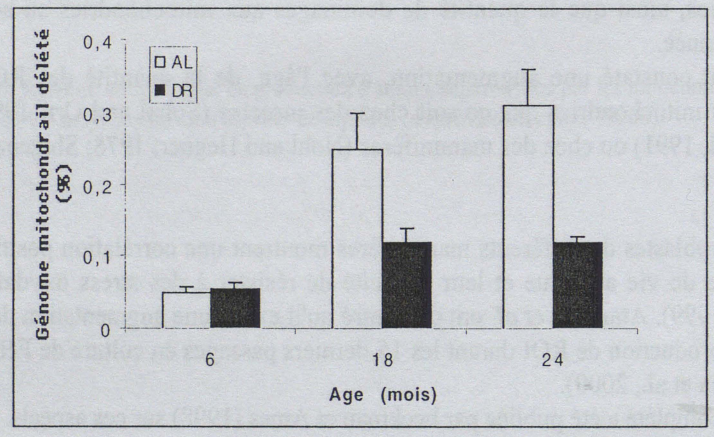
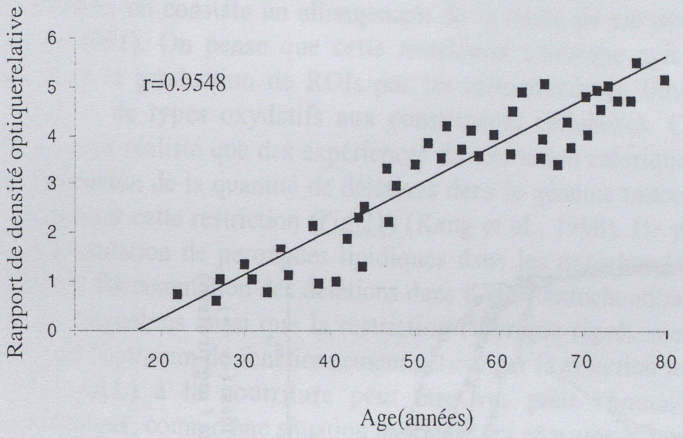



Fig. 21: Analyse par PCR de la fréquence de génome mitochondrial délété dans le foie et le cerveau de rat Fisher en fonction de l'âge. (A) Fréquence de génomes mitochondriaux avec délétions dans le cerveau. (B) Fréquence de génomes mitochondriaux avec délétions dans le foie (d'après Kang *et al.* , 1998). Les rats sont nourris avec des protéines de soya soit à volonté (AL) ou restreint à 60% de la consommation des rats AL (DR). Les résultats sont présentés comme moyenne ± écart type.

A




B

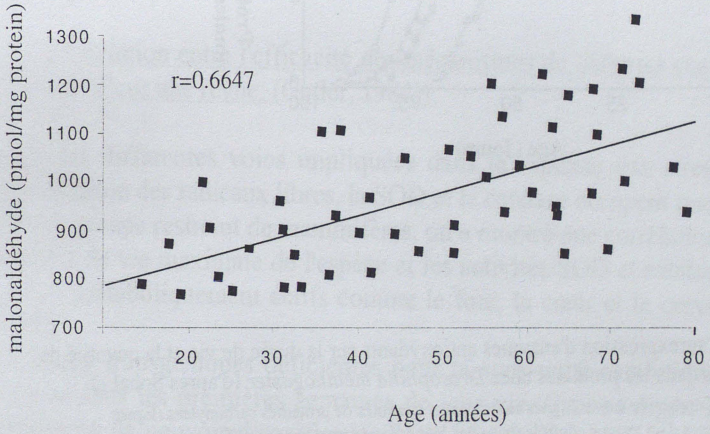



Fig. 22:A) Augmentation de la proportion de génomes mitochondriaux présentant la délétion de 4977 bp dans le foie humain. La présence de la délétion de 4977 bp a été mise en évidence par PCR et le gel coloré au bromure d'éthidium a été soumis à une analyse de la densité optique des amplicons obtenus (d'après Yen *et al.*, 1994).
B) Augmentation de peroxydes lipidiques dans les mitochondries de foie humain. Les peroxydes lipidiques ont été mesurés par la dégradation de l'acide thiobarbiturique en malonaldéhyde (d'après Yen *et al.*, 1994).

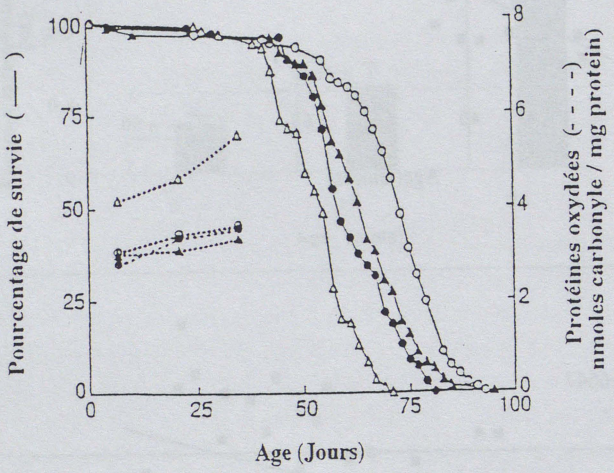



Fig. 23: Effets de la surexpression d'enzymes antioxydants sur la durée de vie et la quantité de dommages oxydatifs dans les protéines chez *Drosophilia melanogaster* (d'après Sohal et Weindruch, 1996). Courbes de survie (lignes continues) et quantités de protéines carbonylées (lignes pointillées) à différents âges d'un groupe contrôle (triangles blancs) et de trois lignées différentes (les autres symboles) surexprimant à la fois CuZn-SOD et la catalase.

consommée, on constate un allongement de la durée de vie moyenne et maximale (Merry, 1991). On pense que cette restriction calorique agit principalement en diminuant la production de ROIs par les mitochondries, limitant de ce fait les dommages de types oxydatifs aux constituants cellulaires. Cette hypothèse est d'autant plus réaliste que des expériences de restriction calorique sur rat ont montré une diminution de la quantité de délétions dans le génome mitochondrial du foie de rats subissant cette restriction (Fig.21) (Kang et al., 1998). De plus, on a démontré une accumulation de peroxydes lipidiques dans les mitochondries de foie humain parallèle à l'accumulation des délétions dans l'ADN mitochondrial (Yen et al., 1994) (Fig.22). Signalons aussi que la restriction calorique représente aussi un état plus proche de l'optimum de fonctionnement généré par la sélection naturelle. L'accès *ad libitum* (AL) à la nourriture peut être vu, pour l'humain et les animaux expérimentaux, comme une situation anormale qui exacerbe la production de ROIs et à laquelle ces espèces ne sont pas préparées du point de vue évolutif (Pour une revue: (Merry, 1991)).

### 3.2.3 Corrélation entre l'efficacité des mécanismes de défenses contre les ROIs et la longévité (Pour une revue: (Cutler, 1982)).

Parmi les différentes voies impliquées dans la réponse aux stress oxydatifs et la détoxification des radicaux libres, la SOD et la catalase occupent une place centrale.
Pour un groupe restreint de mammifères, on a montré une corrélation positive entre la longueur de vie maximale de l'espèce et les activités SOD et catalase pour différents organes métaboliquement actifs comme le foie, le cœur et le cerveau (Sohal et al., 1990a).
Des souris transgéniques déficientes pour la sous-unité catalytique de la Mn-SOD meurent dans les premières semaines de leur vie. Ceci souligne la nécessité pour l'organisme de pouvoir détoxifier les ROIs afin de maintenir l'homéostasie générale (Lebovitz et al., 1996; Li et al., 1995; Melov et al., 1999).
De même, l'addition de l'antioxydant N-acétylcystéine à la nourriture provoque une augmentation de la durée de vie voisine de 30 % chez la souris (Harman, 1981). Chez le rat, l'addition d'antioxydants à la nourriture augmente la durée de vie moyenne d'une population mais pas de la durée de vie maximale des individus (Harman, 1981).

La surexpression conjointe de la Cu,Zn-SOD et de la catalase chez *D. melanogaster* conduit à une longévité accrue (Orr and Sohal, 1994). De même, la surexpression de la Cu,Zn-SOD humaine seule conduit à un accroissement de la durée de vie maximale et moyenne chez *D. melanogaster*, indiquant que le niveau d'anions superoxydes est limitant pour la durée de vie (Sun and Tower, 1999) (Fig.23). L'addition de l'antioxydant N-acétyl cystéine à la nourriture de *D. melanogaster* provoque une augmentation de la durée de vie de 25 % (Pour une revue (Brack et al., 1997)).

| Espèces | Tissus | Macromolécules | Observations |
|---|---|---|---|
| Rat | Tout le corps | Lipide | ↗ Excrétion d'éthane, d'éthylène, de butane et de pentane (produits de la peroxydation des lipides) |
| Rat | Cerveau, foie, coeur | Lipide | ↗ des radicaux superoxydes et des peroxydes lipidiques |
| Homme | Erythrocytes, fibroblastes | Protéine | ↗ des protéines contenant des carbonyles et altérations de l'activité enzymatique |
| Homme | Coeur, foie, cerveau, rein (autopsie) | ADNmt | ↗ de la délétion de 5 kb |
| Homme | Coeur (autopsie) | ADNmt | ↗ de 8-OH-dg chez des patients sans dysfonction cardiaque |
| Homme | Coeur (autopsie) | ADNmt | ↗ des délétions de l'ADNmt |
| Homme | Cerveau (autopsie) | ADNmt/ADNn | ↗ de 8-OH-dg à la fois dans l'ADNmt et dans l'ADN nucléaire |
| Souris | Muscles squelettiques, cerveau, coeur, foie, reins | ADN | ↗ de la quantité de 8-OH-dg |
| Souris | Cerveau, coeur, reins | Protéine, mitochondrie | ↗ des protéines contenant des carbonyles et de la génération de ROS par les mitochondries |
| Homme | Muscles squelettiques (biopsie) | ADNmt | ↗ des réarrangements de l'ADNmt chez les personnes âgées |
| Mouche | Ailes | Protéine mitochondriale | ↗ des protéines contenant des carbonyles |
| Hamster | Cerveau, coeur, reins, testicules | Protéine/ADN | ↗ des protéines contenant des carbonyles et de 8-OH-dg |
| Bovins | Particules sub-mitochondriales de coeur de boeuf | Lipide/protéine | ↗ des protéines oxydées |
| Rat | Foie | Lipide | ↗ de 4-hydroxynonénal et de malondialdéhyde corrélée avec des dysfonctions des mitochondries et une augmentation de la rigidité des membranes |
| Homme | Muscle squelettique (biopsie) | ADN, lipide, protéine | ↗ de 8-OH-dg, de malondialdéhyde et du contenu en carbonyl |

Tableau 6: Accumulation de dommages oxydatifs avec le vieillissement (d'après Fukagawa, 1999).

De même, le traitement de *C. elegans* au moyen de deux composés, EUK-8 et EUK-137 qui reproduisent les activités SOD et catalase, conduit à une augmentation de 44 % de la durée de vie maximale (Melov et al., 2000). De plus, chez *C. elegans*, il existe de nombreux gènes dont la mutation ou la surexpression provoquent un allongement de la durée de vie. Pour la majorité de ces mutants, on note une résistance accrue aux stress oxydatifs et/ou aux stress sous UV (Pour une revue : (Murakami et al., 2000)).

*3.2.3.1 Effet du vieillissement sur l'efficacité du système antioxydant.*

Une autre question, qui a déjà fait l'objet de nombreux travaux, est de savoir si, au cours du vieillissement de l'individu, ses défenses contre les attaques radicalaires restent suffisantes. Autrement dit, pourrait-on imaginer que l'activité d'enzymes antioxydantes ou de molécules antioxydantes diminue au cours de la vie, ce qui pourrait alors favoriser la formation de dommages oxydatifs et accélérer ainsi le processus de vieillissement?

Une diminution de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et de la gluthation peroxydase dans le foie et les reins de rat avec l'âge soutient cette hypothèse (Cand and Verdetti, 1989; Reis and Gershon, 1976). Toutefois, d'autres études sont en contradiction avec ces résultats (Allen et al., 1999).

3.2.4 Accumulation de déchets et de dégâts d'origines radicalaires.

De nombreuses études expérimentales montrent clairement que les dommages causés par les ROIs s'accumulent au cours de la vie d'un organisme (Tableau 6) prouvant l'implication des ROIs dans la sénescence (Fukagawa, 1999).

*3.2.4.1 La lipofuscine*

Un pigment fluorescent appelé lipofuscine ou "pigment d'âge", constitué principalement de protéines et lipides liés de manière covalente ou non, s'accumule dans les cellules (Shimasaki et al., 1977; Sohal and Brunk, 1989; Von Zglinicki et al., 1995a) Ce pigment s'accumule linéairement avec l'âge et les passages en culture et remplit petit à petit la cellule. On peut effectivement trouver des neurones de personnes centenaires remplis à 75 % par la lipofuscine (Pour une revue: (Sitte et al., 2000)). Ces pigments seraient formés suite à l'action des radicaux libres. En effet, il est possible de reproduire cette substance en laboratoire par la polymérisation de protéines ou peptides avec du malonaldehyde (Chio and Tappel, 1969). Le malonaldehyde est un des produits de l'oxydation d'acides gras polyinsaturés par des radicaux libres.

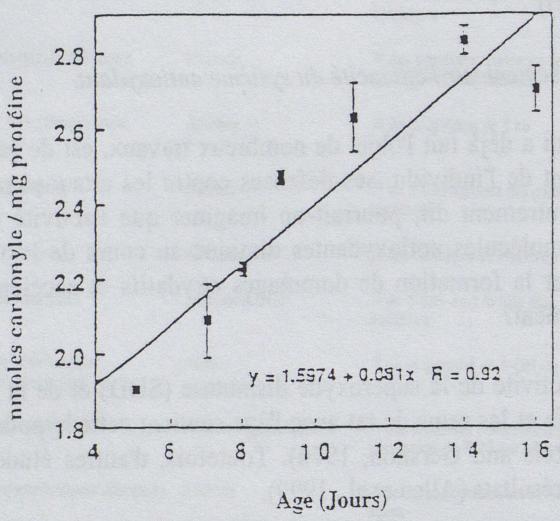



Fig. 24: Contenu en carbonyles de protéines isolées de mitochondries du tissu musculaire de mouche domestique (*Musca domestica*) de différents âges. Une susceptibilité accrue des mitochondries, à leur préparation (centrifugation, etc.) au cours du vieillissemnt n'est pas exclue pour expliquer ces données (d'après Sohal et Dubey, 1994).

Des cellules privées de vitamine E, en plus d'une courte longévité, accumulent plus rapidement que les cellules contrôles de la lipofuscine. Si l'on fournit à nouveau de la vitamine E à ces cellules, ces dernières retrouvent leur durée de vie normale et accumulent moins de lipofuscine (Pour une revue: (Campisi et al., 1996a)).

L'introduction de lipofuscine dans des fibroblastes jeunes provoque l'apparition de certaines caractéristiques de la sénescence, telles que l'arrêt de la croissance (Von Zglinicki et al., 1995a) mais également une inhibition du complexe du protéasome, conduisant à un arrêt de l'élimination des déchets intracellulaires. Ceci démontre que l'accumulation de protéines et de lipides oxydés dans les cellules peut directement induire une augmentation de l'accumulation de dommages (Sitte et al., 2000).

*3.2.4.2 Accumulation de dommages à l'ADN.*

La 8-oxoguanine (oxo$^{8}$Gua) et la 8-oxo-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) sont le résultats de l'attaque de la guanosine par des radicaux hydroxyles. Ces deux bases modifiées sont actuellement considérées comme de bons marqueurs des dommages oxydatifs de l'ADN. Ces lésions à l'ADN sont réparées par une glycoxylase pour l'oxo$^{8}$Gua et par une exonucléase pour la 8-OH-dG. Ces deux enzymes excisent ces bases oxydées de l'ADN, ce qui les libère dans les fluides biologiques.
Etant donné que les dommages à l'ADN et les réparations ont lieu continuellement, la mesure des lésions excisées reflète la balance entre les dégâts à l'ADN et la réparation de ceux-ci.
La concentration en 8-OH-dG augmente dans divers tissus chez les mammifères au cours de leur vieillissement. Chez le rat, il y a une augmentation avec l'âge de 8-OH-dG dans le foie, les reins et l'intestin des mâles ainsi que dans le foie, les reins, les poumons et le cerveau des femelles (Fraga et al., 1990; Sai et al., 1992), ainsi que dans la rate des deux sexes (Hirano et al., 1996). Le niveau de 8-OH-dG et d'oxo$^{8}$Gua augmente aussi lors du vieillissement en culture des fibroblastes humains IMR-90 (Chen et al., 1995). La 8-OH-dG est potentiellement mutagène. Elle a le potentiel de former une paire de bases avec n'importe quel nucléotide (Culp et al., 1989; Kuchino et al., 1987), ce qui peut provoquer de mauvaises insertions de bases, *in vivo* (Wood et al., 1990).
De multiples autres types de dommages oxydatifs à l'ADN ont été décrits. Citons par exemple l'accumulation de cassures simples brins associées au vieillissement (Bhaskar and Rao, 1994; Price et al., 1971) ou encore les dimères de thymidines.

*3.2.4.3 Accumulation de protéines modifiées.*

Les ROIs peuvent oxyder les protéines de multiples façons (Berlett and Stadtman, 1997) causant ainsi leur dysfonctionnement. Chez les animaux de fortes quantités de protéines carbonylées s'accumulent durant le vieillissement (Fig.24) (Rosenberg, 1991; Sohal and Dubey, 1994). On observe une augmentation de 2 à 3 fois de la

quantité de protéines avec des dommages oxydatifs, ce qui est indiqué par la présence de protéines carbonylées (-COOH) et l'oxydation des groupements -SH des protéines. La perte d'activité de certains enzymes qui survient au cours du vieillissement, comme celle de la glutamine synthétase et l'alcool déshydrogénase, particulièrement sensibles aux dommages de type oxydatif, est attribuée à ce processus de carbonylation et d'oxydation (Pour une revue: (Sohal and Weindruch, 1996)).

3.3 Télomères ou radicaux libres comme cause de la sénescence cellulaire?

Le raccourcissement télomérique est-il la cause de la sénescence réplicative ou une conséquence de la production de radicaux libres accrue au cours du vieillissement? En tout cas, la théorie des radicaux libres peut absorber la théorie des télomères, les télomères courts, comme déjà expliqué, pourraient être perçus comme des dommages à l'ADN et déclencher un processus de vieillissement.
Quelques résultats expérimentaux suggèrent que le raccourcissement des télomères peut aussi être dû, au moins en partie, à la production de radicaux libres. Cette cause radicalaire de raccourcissement s'ajouterait au raccourcissement classique dû au problème de la duplication des deux brins d'ADN par sa polymérase.

-Les souris en restriction calorique présentent une augmentation de leur durée de vie. Cette augmentation de la durée de vie semble être due à une diminution de l'accumulation des dégâts plutôt qu'à un mécanisme de comptage des divisions cellulaires (Pour une revue:(Wolf and Pendergrass, 1999)).

-Von Zglinicki et al. ont montré qu'en présence d'un "trappeur de spin", le PBN, la réduction des télomères des FHDs MRC-5 est réduite de moitié. De plus, ce trappeur de spin permet d'augmenter signicativement le nombre de passages en culture de ces fibroblastes (von Zglinicki et al., 2000). Autrement dit, si la production des ROI diminue, le raccourcissement télomérique diminue aussi. Ceci est à corréler avec l'augmentation de 2 à 3 fois de la production de ROIs au sein des FHDs IMR-90 rapportée par Atamna lors de la sénescence (Atamna et al., 2000). De plus, l'équipe de von Zglinicki a également montré qu'un très faible raccourcissement télomérique est observé chez les fibroblastes humains de peau BJ (environ 35-40 bp/CPD au lieu de 90-100 bp/CPD chez les FHDs WI-38) qui présentent un potentiel anti-oxydant très élevé. Ce très faible raccourcissement télomérique n'empêche pas l'arrêt prolifératif du à la sénescence réplicative (Lorentz et al., 2001).

-Il a été également démontré que les ROIs génèrent préférentiellement des cassures simple brin qui se situent préférentiellement au sein des télomères (Petersen et al., 1998). Plus de 50 % de ces cassures n'étant pas réparées à long terme, elles pourraient être la cause du raccourcissement télomérique (Petersen et al., 1998).

## 3.4 Sénescence Induite Prématurément par les Stress (SIPS).

### 3.4.1 Effets de stress oxydatifs subcytotoxiques sur le vieillissement des fibroblastes humains en culture.

#### *3.4.1.1 Variation de la pression partielle en oxygène.*

Le moyen le plus évident de faire varier le niveau de stress oxydatif est de modifier la pression partielle en oxygène, habituellement 20%, de l'atmosphère de la culture. De nombreux travaux ont utilisé ce procédé.

Différentes études ont montré qu'une pression partielle en oxygène réduite permet une croissance plus rapide et une fréquence accrue de formation de colonies lorsque les fibroblastes sont repiqués à très faibles densités (Balin et al., 1984; Saito et al., 1995; Storch and Talley, 1988; Taylor et al., 1978; Taylor et al., 1974). La vitesse de croissance, en passage en culture par semaine, de fibroblastes normaux dépend de la pression partielle en $O_2$. Pour les fibroblastes WI-38 et IMR-90, la croissance est la plus élevée sous 1 % en $O_2$ et décroît jusqu'à 20 %. Des lignées transformées dérivées de ces souches normales de FHDs ne montrent pas de modification de leur vitesse de croissance lorsque la tension en $O_2$ varie de 1 à 20 % (Saito et al., 1995). Cet effet de l'oxygène n'est pas seulement observé chez les FHDs mais également pour d'autres types cellulaires. Ainsi, la croissance des mélanocytes est la plus rapide entre 1 et 5 % en $O_2$ tandis que la pression partielle normale de 20 % exerce déjà un effet inhibiteur sur la croissance. De 30 à 50 %, l'$O_2$ est cytostatique. Au-delà, un effet cytotoxique important est observé (Horikoshi et al., 1991).

Non seulement la pression partielle en $O_2$ exerce un effet sur la vitesse de croissance des cultures mais, également, sur la durée de vie réplicative des cellules. Sous une pression partielle normale (20 % $O_2$), les FHDs WI-38 réalisent en moyenne 56 CPDs. Par contre à 10 % en $O_2$, le nombre de passages en culture s'élève à environ 68 (Packer and Fuehr, 1977). Notons que des études réalisées à cette époque ne mirent pas en évidence ces effets de la pression partielle en $O_2$ sur la durée de vie réplicative des FHDs (Balin et al., 1977; Taylor et al., 1974). Cependant, des travaux utilisant une technologie beaucoup plus récente montrent clairement une extension de la durée de vie réplicative de 20, 15 et 10 % en CPDs pour des pressions partielles respectives de 1, 6 et 12 % en $O_2$, par rapport à des cultures maintenues à 20 % en $O_2$ (Saito et al., 1995). De même, Chen Q. *et al.* (Chen et al., 1995) ont cultivé des FHDs sous 3 et 20 % en $O_2$. Les populations placées à la plus faible tension en $O_2$ réalisent environ 40 à 50 % de CPDs en plus (Fig.25).

Inversement, une élévation modérée de la pression partielle en $O_2$ réduit la durée de vie réplicative de divers types cellulaires dont les FHDs (Balin et al., 1984; Balin et

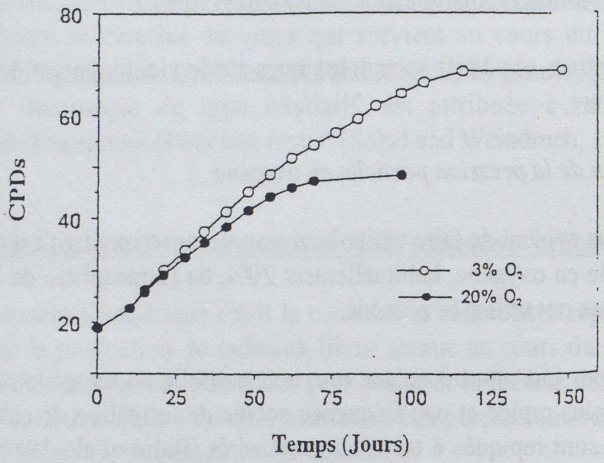



Fig. 25: Effet d'une diminution de la pression partielle en oxygène sur la durée de vie réplicative des fibroblastes humains. La figure montre le nombre de CPDs effectués par des fibroblastes IMR-90 cultivés sous des atmosphères contenant 3 et 20 % en oxygène (d'après Chen *et al.*, 1995)

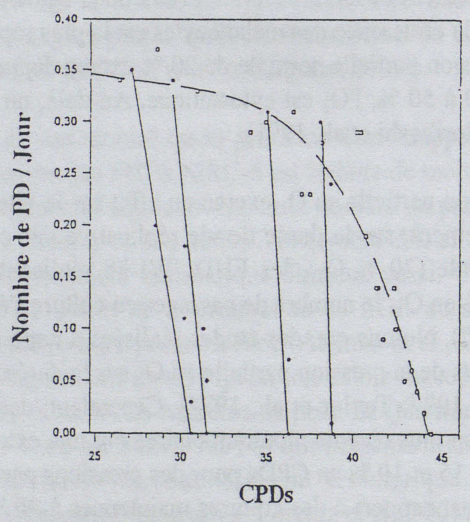



Fig. 26: Effet de l'hyperoxie sur la durée de vie prolifératives des fibroblastes humains WI-38. La figure montre le nombre de doublements de population par jour ainsi que le nombre de CPDs effectués avant l'arrêt irréversible de la croissance. Carrés blancs: normoxie (20% d'oxygène). Ronds noirs: hyperoxie (40% d'oxygène) (d'après von Zglinicki *et al.*, 1995).

al., 1977; Honda and Matsuo, 1983; Packer and Fuehr, 1977; Von Zglinicki et al., 1995b), les kératinocytes (Horikoshi et al., 1986) et les mélanocytes (Horikoshi et al., 1991). Von Zglinicki *et al.* ont exposé des fibroblastes WI-38 à une atmosphère contenant 40 % en $O_2$. Dans ces conditions, un arrêt des divisions cellulaires est observé après 3 passages en culture (Fig.26). Cet arrêt du cycle survient préférentiellement en phase G1. Ces cellules soumises à l'hyperoxie sont similaires aux cellules sénescentes quant à leur morphologie et leur contenu en lipofuscine. De plus, elles semblent subir un raccourcissement accéléré de leurs télomères, de 500 bp par passage en culture sous hyperoxie au lieu de 90 bp en normoxie (Von Zglinicki et al., 1995b). Ce raccourcissement dû à l'élévation de pression partielle en oxygène est à rapprocher avec le raccourcissement accéléré observé dans les fibroblastes de patients atteints de l'anémie de Fanconi. L'anémie de Fanconi est une maladie génétique dont le "défaut moléculaire" n'est pas encore identifié. Toutefois, ce défaut touche le système de réparation de l'ADN et l'activité des cycles redox. Dû à ce défaut, il y a énormément de radicaux libres générés au sein des cellules. En parallèle à cette augmentation des ROIs, il est observé un doublement du raccourrcissement télomérique à chaque passage en culture. D'un racourcissement de 40 bp/passage en culture les fibroblastes de patients atteints de l'anémie passent à un racourcissement 80 bp/passage en culture (Adelfalk et al., 2001).

*3.4.1.2 Utilisation du tert-butylhydroperoxyde.*

Le tert-butylhydroperoxyde (t-BHP) est une molécule amphiphile qui pénètre très aisément dans les cellules et mime ensuite l'effet toxique des acides gras peroxydés en formant des $ROO^{\bullet}$. Des radicaux peroxyles sont générés dans le cytosol par l'interaction du t-BHP avec des métaux de transition comme les ions bivalents du cuivre ou du fer, dans une réaction similaire à la réaction de Fenton (Suzuki et al., 1988) Ces ions initient ainsi la peroxydation lipidique (Loeb et al., 1988; Yuan et al., 1991).

Le t-BHP est couramment utilisé comme modèle d'exposition de différents types cellulaires à des stress radicalaires (Loeb et al., 1988; Ochi, 1992; Suzuki et al., 1988).

Des fibroblastes de poumon foetaux WI-38 ont été soumis à 5 stress successifs subcytotoxiques à 30 µM de t-BHP.
Dans les faits, ces cellules reçoivent journellement un milieu de culture contenant 30 µM de t-BHP pour une durée de 1 heure. Après le dernier stress, ces cellules ont une période de repos de 48 heures. Après cette période on a constaté une inhibition marquée de la synthèse d'ADN (Dumont et al., 2000c).

On a aussi mis en évidence une augmentation, similaire à celle observée lors de la sénescence réplicative, de la proportion de cellules présentant l'activité ß-

A.

Pourcentage des morphotypes (1) et des cellules présentant l'activité SA ß-gal dans chaque morphotype (2)

| | HDFs à faible CPDs | | HDFs au dernier CPD | | HDFs à faible CPDs + 5 stress sous 30$\mu$M de t-BHP | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Morpho. | (1) | (2) | (1) | (2) | (1) | (2) |
| I | 2,0 ± 0,2 | **0,0 ± 0,0** | 2,3 ± 0,7 | **0,0 ± 0,0** | 0,6 ± 1,0 | **0,0 ± 0,0** |
| II | 86,2 ± 1,3 | **2,8 ± 0,3** | 41,3 ± 4,1 | **20,6 ± 7,8** | 19,9 ± 3,2 | **35,3 ± 13,8** |
| III | 10,1 ± 1,2 | **41,3 ± 8,2** | 46,5 ± 5,6 | **61,1 ± 15,8** | 54,5 ± 6,1 | **54,3 ± 10,1** |
| IV | 1,3 ± 0,5 | **88,7 ± 19,6** | 7,9 ± 2,1 | **75,3 ± 6,3** | 21,2 ± 3,7 | **79,0 ± 12,1** |
| V | 0,5 ± 0,2 | **83,8 ± 18,9** | 1,8 ± 1,7 | **94,4 ± 9,6** | 2,0 ± 1,5 | **93,3 ± 11,6** |

B.

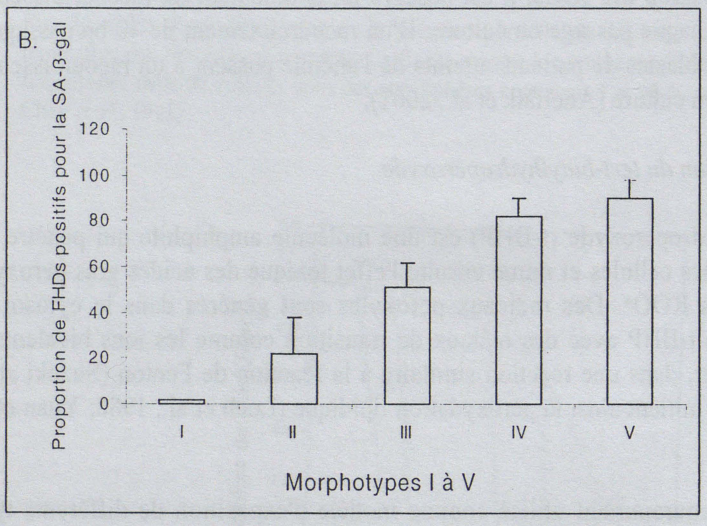



Fig. 27: A) Relation entre les morphotypes et la SA-ß-gal chez les HDFs WI-38 jeunes (50 % du potentiel prolifératif), sénescent (> 90% du potentiel prolifératif) ou jeunes soumis à cinq stress successifs sous 30 $\mu$M d t-BHP (d'après Toussaint *et al.*, 2000). Les fibroblastes confluents ont été soumis à un stress de 1 heure par jour, cinq jours d suite. Les résultats sont exprimés comme la valeur moyenne ± écart type du nombre de cellules par morphotype et positives ou non pour l'activité SA-ß-gal.

B) Proportion moyenne de cellules positives pour la SA-ß-gal pour les morphotype I à V chez les HDFs WI-38 La proportion moyenne de cellules positives pour la SA-ß-gal est représentée comme la valeur moyenne ± écart type. Les morphotypes VI et VII ne sont pas représentés car ils représentent moins de 0,025 % de la population totale.

galactosidase associée à la sénescence et aussi en parallèle une forte augmentation du pourcentage de morphotypes post-mitotiques (Fig.27).
Un exemple de changement dans la proportion des morphotypes après 5 stress succesifs, à raison d'un stress quotidien, en présence de t-BHP est illustré en figure 27. On observe que la proportion de ces morphotypes est devenue semblable à celle que l'on trouve dans les cultures de WI-38 sénescentes, on observe une forte diminution des proportions des morphotypes I et II et une augmentation des proportions des morphotypes III, IV et V (Toussaint et al., 2000a). Les stress étant réalisés afin d'éviter toute cytotoxicité, il ne s'agit pas d'une sélection de cellules par la mort des cellules de morphotypes I ou II.

D'autres biomarqueurs apparaissent aussi suite à ces 5 stress successifs.
Nous avons constaté, au cours de notre mémoire de fin de licence, une augmentation de la quantité d'ARN messager de la fibronectine, l'ostéonectine, l'apolipoprotéine J et SM22. Nous avons également montré, durant ce travail, l'apparition de la délétion mitochondriale de 4977 bp suite à l'application de t-BHP (Fig.28) (Dumont et al., 2000c). Toutefois, la quantification de cette délétion est impossible, malgré le développement dans notre mémoire de licence d'une technique de PCR compétitive semi-quantitative très sensible (voir annexe). Ceci suggère que cette délétion apparaissant suite aux traitements par le t-BHP est très peu abondante tout comme dans la sénescence réplicative *in vitro* des FHDs.
Un raccourcissement de 380 ± 139 bp des télomères a également été montré suite à ces 5 stress (Fig.29) tout comme une forte augmentation de la protéine $p21^{waf-1}$ aboutissant à une hypophosphorylation de Rb (Dumont et al., 2001).

*3.4.1.3 Exposition au peroxyde d'hydrogène à des concentrations subcytotoxiques.*

Bladier *et al.* décrivèrent en 1997 que l'exposition de FHDs, pendant 24 h, à des concentrations de 50 à 100 µM en peroxyde d'hydrogène conduisent à un arrêt des divisions cellulaires. Ils notent également une inhibition de la synthèse d'ADN 24 heures après le stress. Suivant la dose, cet arrêt de la croissance est permanent (200 µM) ou transitoire (50 à 100 µM).
Le traitement des FHDs au moyen de $H_2O_2$ peut également conduire à l'apoptose. En effet, une dose importante de $H_2O_2$ provoque l'activation de la caspase 3 ainsi qu'une condensation du noyau de ces FHDs. On a également observé une surexpression de la protéine Bax caractéristique de l'apopotose (Chen et al., 2000b).
Par définition, des stress à concentration subcytotoxique ne déclenchent pas l'apoptose. Ces stress à concentration subcytotoxique engendrent éanmoins une sénescence réplicative prématurée.
Morphologiquement, les populations ayant subit un stress subcytotoxique sous $H_2O_2$ sont de type âgé avec une grande hétérogénéité de formes et de tailles. Les cellules sont en général de forme élargie et étalée et présentent de nombreuses granulations

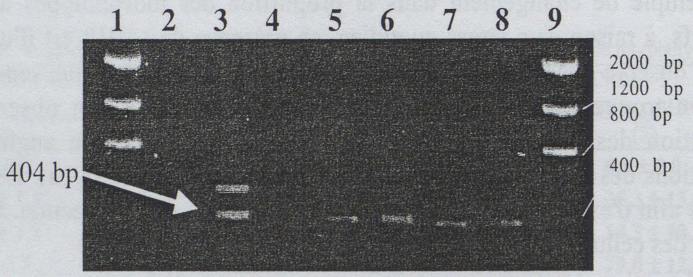



Fig. 28: Détection par PCR emboîtée de la délétion de 4977 bp au sein du génome mitochondrial (d'après Dumont *et al.*, 2000). Pistes 1 et 9: marqueur de poids moléculaire. Piste 2: WI-38 HDFs à 55% de potentiel prolifératif. Piste 3: WI-38 HDFs à 55% de potentiel prolifératif soumis à 5 stress successifs sous 30 µM de t-BHP (1 stress de 1 heure par jour durant 5 jours). Piste 4: control négatif (PCR réalisée sans ADN). Piste 5: WI-38 à 70% de potentiel prolifératif. Piste 6: WI-38 à 70% de potentiel prolifératif soumis à 5 stress sous 20 µM de t-BHP. Piste 7: : WI-38 à 70% de potentiel prolifératif soumis à 5 stress sous 30 µM de t-BHP. Piste 8: WI-38 à 95% de potentiel prolifératif. La PCR est réalisée avec des amorces se trouvant de part et d'autre du site de délétion. Sur ce premier amplicon, une seconde PCR est réalisée avec des amorces internes à cet amplicon donnant un produit de 404 bp en présence de la délétion de 4977 bp.

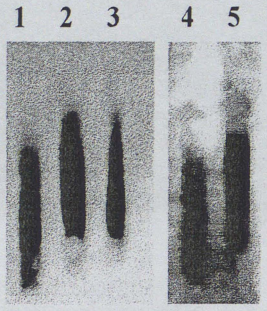
ainsi qu'un volume nucléaire agrandi comme dans le cas de la sénescence réplicative normale (Bladier et al., 1997; Chen et al., 1998).

De même, le traitement de fibroblastes au moyen de 500 µM en $H_2O_2$ pendant 1 heure induit une baisse du rythme de la croissance avec une inhibition de la synthèse d'ADN pendant au moins 10 jours et l'établissement d'une morphologie sénescente (Mocali et al., 1995). Il a également été rapporté que l'exposition de cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO, chinese hamster ovary) à des stress oxydatifs subcytotoxiques au moyen d'$H_2O_2$ ou du système hypoxanthine/xanthine oxydase (production d'anions superoxydes) résulte en une perte irréversible de la capacité proliférative de ces cellules bien qu'elles restent métaboliquement actives (Gelvan et al., 1995).

Le traitement de fibroblastes F65 pendant 2 heures au moyen de $H_2O_2$ à 200 µM n'affecte pas la viabilité des cellules. Cependant, les cellules ne répondent plus à des stimulations mitogéniques du sérum ou de facteurs de croissance (PDGF, bFGF, EGF) par une synthèse d'ADN. Cette perte de potentiel prolifératif est irréversible. Les cellules ne retrouvent jamais un taux de croissance, en nombre de passages en culture par jour, équivalent à celui de cellules contrôles, et entrent prématurément en sénescence. Elles réalisent 35 % de passages en culture en moins et présentent une morphologie semblable à celle observée chez les cellules sénescentes (Chen and Ames, 1995).
Il a été également démontré chez les FDHs IMR-90, une augmentation (selon la dose d'$H_2O_2$) de la fréquence de bases de l'ADN endommagées, comme le montrent les résultats du dosage de la 8-oxo-2'-déoxyguanosine (table 7) (Chen et al., 1998). Cependant aucune augmentation significative du niveau de 8-oxo-2'-déoxyguanosine n'est observée en-dessous de 250 µM en $H_2O_2$. Des systèmes de réparation induits pourraient réparer ces dommages au fur et à mesure de leur formation.

En collaboration avec l'équipe de Chen, Dumont *et al.* ont mis en évidence une surexpression des gènes de la fibronectine, l'ostéonectine, l'apolipoprotéine J et aussi de SM22 suite à un stress subcytotoxique au peroxyde d'hydrogène, chez les FHDs IMR-90. Ces gènes sont aussi surexprimés chez les FHDs IMR-90 et WI-38 sénescents (Dumont et al., 2000c). Dans des conditions similaires il a aussi été mis en évidence un raccourcissement télomérique légèrement supérieur à celui observé suite à des passages en culture (Fig.29 et une augmentation du pourcentage de cellules présentant l'activité SA ß-gal (Fig.30) (Dumont et al., 2001).
Chen et al. ont mis en évidence une surexpression de la quantité protéique de $p21^{Waf-1}$, conduisant à une hypophosphorylation de la protéine Rb (Chen et al., 1998) comme observé lors de la sénescence réplicative. Par opposition les cellules apoptotiques ne surexpriment pas $p21^{Waf-1}$ (Chen et al., 2000b).
Toutefois, il semble que cette surexpression de $p21^{Waf-1}$ ne soit pas due à une activation du facteur de transcription p53, comme le proposerait le schéma classique.

A.




B.

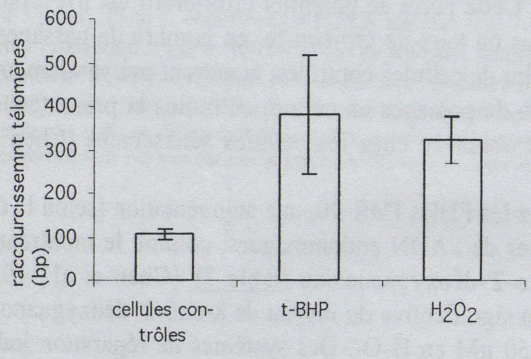



Fig. 29: Raccourcissement télomérique des HDFs WI-38 après un stress sous 160 µM d'$H_2O_2$ ou 5 stress successifs sous 30 µM de t-BHP (d'après Dumont *et al.*, 2001).

A. Autoradiographie montrant le raccourcissement de l'ADN télomérique chez les HDFs WI-38 à 55% de leur potentiel prolifératif avant stress (ligne 2), exposés à 5 stress de 1 heure sous 30 µM t-BHP (ligne 1) ou suivant les mêmes changements de milieu que la condition de la ligne 1 mais en absence de t-BHP ( cellules contrôles) (ligne 3). Raccourcissement télomérique après un stress de 2 heures sous 160 µM d'$H_2O_2$ pour des WI-38 à 55% de potentiel prolifératif. (ligne 4). Ligne 5: idem ligne 4 mais sans $H_2O_2$.

B. Graphique illustrant le raccourcissement observé.

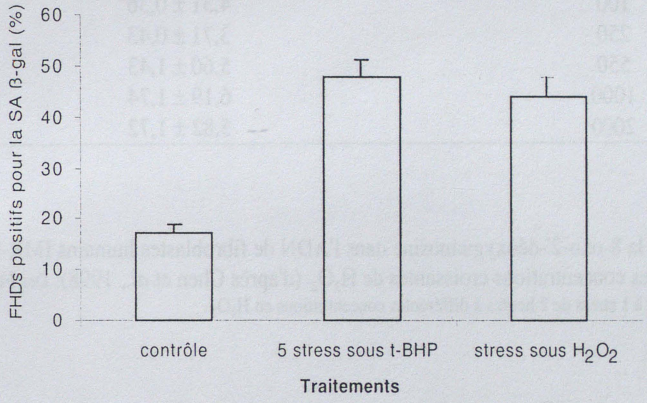



Fig. 30: Effet de stress subcytotoxiques sous $H_2O_2$ ou t-BHP sur la proportion d' FHDs WI-38 positifs pour la SA-ß-gal (d'après Dumont *et al.*, 2001). Des FHDs à 55 % de potentiel prolifératif ont été soumis à cinq stress sous 30 $\mu$M de t-BHP (1 stress de 1 heure par jour) ou un stress de 2 heures sous 160 $\mu$M d'$H_2O_2$.

| Concentrations en $H_2O_2$ (µM) | 8-oxo-2'-déoxyguanosine/ mg d'ADN (pmol) |
|---|---|
| 0 | 3,47 ± 1,37 |
| 50 | 4,29 ± 0,85 |
| 100 | 4,31 ± 0,36 |
| 250 | 3,71 ± 0,43 |
| 550 | 5,60 ± 1,43 |
| 1000 | 6,19 ± 1,74 |
| 2000 | 5,82 ± 1,72 |

Table 7: Dosage de la 8-oxo-2'-déoxyguanosine dans l'ADN de fibroblastes humains IMR-90 suite à un stress à des concentrations croissantes de $H_2O_2$ (d'après Chen et *al.*, 1998). Des FHDs IMR-90 ont été exposés à 1 stress de 2 heures à différentes concentrations en $H_2O_2$.

En effet, $p21^{Waf-1}$ peut être surexprimé durant plusieurs semaines après le stress, gardant Rb sous sa forme hypophosphorylée, tandis que le niveau protéique de p53 revient à son niveau basal dans les 44 heures après le stress subcytotoxique sous $H_2O_2$ (Chen et al., 1998).

La surexpression de $p21^{Waf-1}$ explique la forte diminution de l'activité du complexe cyclinE/CdK2 observée suite à un stress de faible intensité sous $H_2O_2$ (pour une revue: (Shackelford et al., 2000)). Cette surexpression expliquerait aussi l'arrêt irréversible du cycle cellulaire en phase G1 du cycle cellulaire suite à un stress de faible intensité sous $H_2O_2$. Il a en effet été montré par cytométrie de flux que le contenu nucléaire en ADN n'augmentait plus suite au stress tandis que celui des cellules contrôles augmente montrant une capacité proliférative normale (Fig. 31).

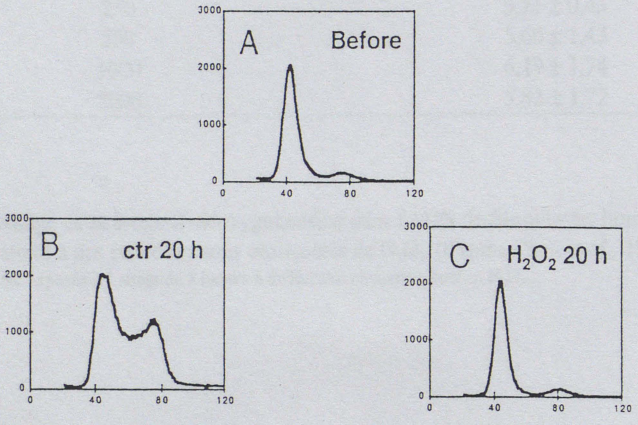



Fig. 31: Mesure du contenu en ADN par cytométrie de flux (d'après Chen et *al.*, 1998).
Des FHDs IMR-90 à 40% de leur potentiel prolifératif ont été exposés à un stress de 2 heures sous 550 µM $H_2O_2$ puis repiqués à faible densité et marqué avec de l'iodure de propidium durant 30 min. Les cellules contrôles quiescentes (A) montrent une distribution aux les phases G1 ($1^{er}$ pic) et G2/M ($2^{ème}$ pic) 20 heures après la sous-culture (B). A l'opposé les FDHs ayant subit un stress restent en phase G1 (C). Cette distribution en phase G1 est toujors observée plus de 84 heures après la fin du stress. L'abscisse représente l'intensité de fluorescence et l'ordonné le nombre de cellules.

| Noms (homologues) | % d'homologie | Activités représentatives |
|---|---|---|
| **Sous-famille de BMP2** | | |
| BMP2 ($Dpp^D$) | 100 | gastrulation, neurogenèse, chondrogenèse |
| BMP4 | 92 | apoptose; chez la mouche: dorsalisation, ailes, yeux |
| **Sous-famille de BMP5** | | |
| BMP 5 ($60A^D$) | 61 | |
| BMP6/Vgr1 | 61 | Avec les BMP 2 et 4, cette sous-famille participe dans le |
| BMP7/OP1 | 60 | développement de nombreux organes et dans la neurogenèse |
| BMP8/OP2 | 55 | |
| **Sous-famille de GDF5** | | |
| GDF5/CDMP1 | 57 | |
| GDF6/CDMP2 | 54 | chondrogenèse dans les membres en cours de développement |
| GDF7 | 57 | |
| **Sous-famille de Vg1** | | |
| GDF1 ($Vg1^X$) | 42 | Vg1: induction du mésoderme chez la grenouille et les |
| GDF3/Vgr2 | 53 | poissons |
| **Sous-famille de BMP3** | | |
| BMP3/osteogenine | 48 | différenciation ostéogénique, chondrogenèse |
| GDF10 | 46 | |
| **Membres intermédiaires** | | |
| Nodal | 42 | asymétrie gauche-droite |
| Dorsalin | 40 | régulation de la différentiation cellulaire. |
| GDF8 | 41 | Inhibition de la croissance des muscles squelettiques. |
| GDF9 | 34 | |
| **Sous-famille de l'activine** | | |
| Activine ßA | 42 | production de la FSH pituitaire (follicule-stimulating |
| Activine ßB | 42 | hormone), différenciation des cellules érythroïdes, chez la |
| Activine ßC | 37 | grenouille: induction du mésoderme |
| Activine ßE | 40 | |
| **Sous-famille du TGF-ß** | | |
| TGF-ß1 | 35 | arrêt du cycle cellulaire chez les cellules épithéliales et |
| TGF-ß2 | 34 | hématopoïetiques, contrôle de la différenciation et de la |
| TGF-ß3 | 36 | prolifération des cellules mésenchymales, immunosuppression, production de la matrice extracellulaire |
| **Membres distants** | | |
| MIS/AMH | 27 | régression canal de Muller |
| Inhibitin α | 2 | inhibition de la production de la FSH et autres fonctions de l'activine |
| GDNF | 23 | développement des reins, survie des neurones dopaminergiques |

Table 8: Tableau représentant les différents membres de la super-famille du TGF-ß1 (d'après Massagué, 1998). Tous les membres de cette liste ont été identifiés chez la souris ou l'homme. Entre parenthèses, homologues importants chez la Drosophile ($^D$) ou le Xénope ($^X$). %: pourcentage d'acides aminés identiques par rapport au BMP2 (Bone Morphogenic Protein). GDF: growth and differentiation factor, CDMP: Cartilage-Derived Morphogenetic Protein, MIS/AMH: Mullerian Inhibiting Substance/anti-Mullerian hormone, GDNF: Glial cell-Derived Neurotrophic Factor.

# Chapitre 4: Voies de transduction du signal déclenchées par le TGF-ß1.

## 4.1 La famille du TGF-ß: historique, description et fonction.

Lors de l'identification du Transforming Growth Factor-ß1 (TGF-ß), il y a 20 ans, il est apparu évident que le TGF-ß représentait un membre d'une super famille de facteurs de croissance. Celle-ci joue un rôle pivot dans la régulation dans divers aspects de la conduite cellulaire, y compris la croissance cellulaire, la différenciation mais aussi la morphogenèse tissulaire dans une variété d'organismes.
Aujourd'hui, la super famille du TGF-ß comprend plus de trente membres qui sont groupés en plusieurs sous-familles. Basée sur la comparaison de séquences au niveau des domaines bio-actifs, la super famille du TGF-ß peut être divisée en sous-familles. Premièrement, on trouve la famille des BMP-2 et -4 (Bone Morphogenetic Proteins-2 et -4) et leurs homologues chez la drosophile, Dpp. Tous les autres membres de la super famille divergent progressivement de cette sous-famille. On a tout d'abord la sous-famille BMP5 suivie de la sous-famille GDF5 (Growth and Differentiation Factor 5), puis la sous-famille Vg1 découverte chez Xenopus laevis, la sous-famille BMP3, des membres d'homologies intermédiaires, la sous-famille de l'activine/inhibine et enfin la sous-famille du TGF-ß. L'ensemble de ces membres est repris dans le tableau 8 (Pour une revue: (Alevizopoulos and Mermod, 1997)).

Le TGF-ß a tout d'abord été décrit comme un facteur induisant le phénotype de la transformation chez les souris (Roberts et al., 1981). Actuellement, on sait que le TGF-ß régule un nombre remarquable d'activités biologiques y compris la croissance cellulaire, la différenciation cellulaire, l'apoptose (Islam et al., 1997), l'expression de nombreux gènes dont l'α-1-procollagène (Garcia-Trevijano et al., 1999), la réparation de blessures et la morphogenèse tissulaire. En plus, on note une altération du niveau normal de TGF-ß dans différentes pathologies comprenant l'artérosclérose et le cancer (Massagué, 1990).
L'extrême diversité d'actions du TGF-ß est compliquée par le fait que le TGF-ß provoque des réponses opposées selon le type cellulaire et les conditions expérimentales (Massagué, 1998). Pour exemple, les membres de la sous-famille du TGF-ß peuvent stimuler la prolifération de certaines souches de fibroblastes, bloquer la division de cellules épithéliales ou endothéliales et promouvoir ou inhiber la différenciation de certaines cellules d'origines neuronales ou mésenchymateuses.

La sous-famille du TGF-ß, qui nous intéresse ici, est composée d'au moins 5 gènes codant pour différentes protéines. Ces différentes protéines sont appelées TGF-ß1 à 5. Les mammifères expriment l'isoforme ß1 mais aussi souvent le ß2 et le ß3. Les TGF-ß4 et -ß5 sont exprimés chez le poulet et chez le xénope *Xenopus Laevis*. Toutes les isoformes sont composées de deux domaines liés par 3 ponts disulfures réalisés entre

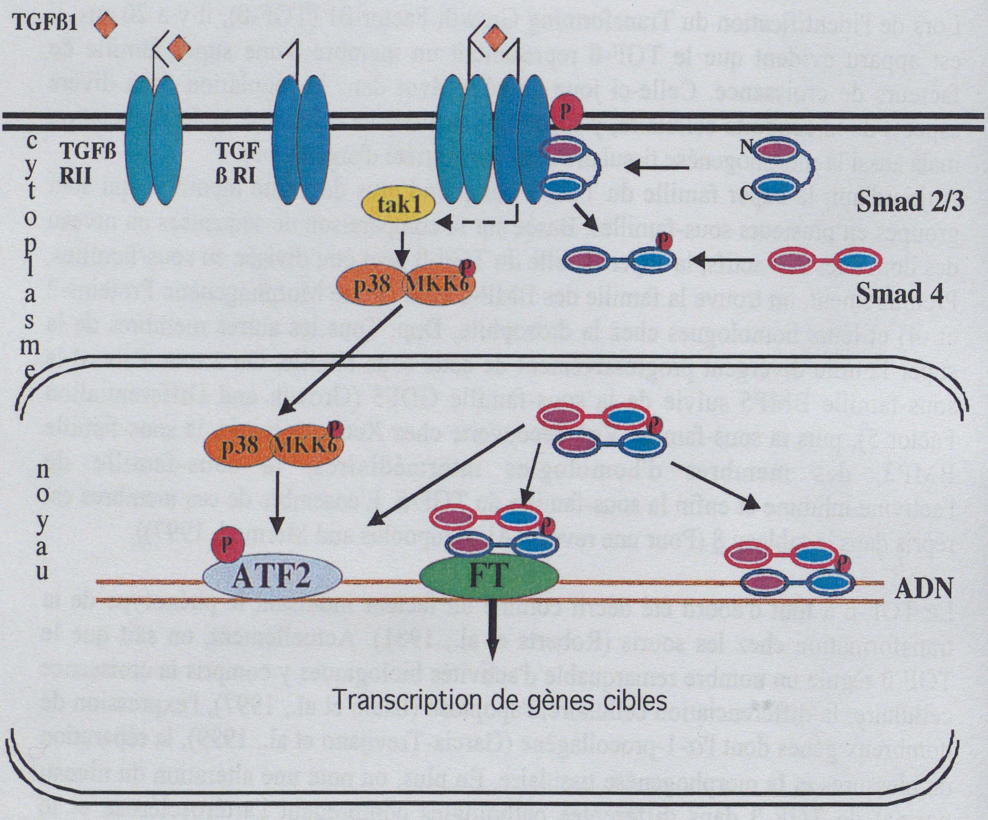



**Fig. 32:Représentation simplifiée de la voie de transduction du signal du TGF-ß1.**

6 cystéines très fortement conservées qui partagent plus de 70% d'identité en acides aminés. Chacun de ces domaines est synthétisé sous forme d'un propeptide qui subit un clivage dibasique libérant un segment actif carboxy-terminal de 110 à140 acides aminés (Kingsley, 1994).
Les différentes isoformes de TGF-ß exprimées par les mammifères ont généralement des effets cellulaires similaires chez un même type cellulaire, du moins en culture. Ces isoformes lient leurs récepteusr au TGF-ß hétérodimériques de type I et puis de type II.

4.2 Transduction du signal déclenché par le TGF-ß1.

Le TGF-ß1 transmet son signal à travers la membrane plasmique via un complexe hétérodimerique constitué de récepteurs Sérine/Thréonine kinase de types I et II (Pour une revue: (Massagué, 1998)). Il existe en fait trois récepteurs différents du TGF-ß. Le TGF-ß1 n'est reconnu que par le récepteur de type II qui reconnaît également le TGF-ß2. Par contre, le récepteur de type III reconnaît uniquement le TGF-ß3. Enfin, le récepteur de type I ne reconnaît directement aucune isoforme de TGF-ß mais peut s'associer au récepteur de type II et III. Suite à la liaison du TGF-ß1, le récepteur de type II associé au TGF-ß1 est reconnu par le récepteur type I. Celui-ci se lie alors au récepteur de type II qui le phosphoryle et l'active (Wrana et al., 1994). Ces deux récepteurs sont essentiels à la transmission du signal TGF-ß1, la suppression de l'un ou l'autre conduit à une perte de réponse cellulaire au TGF-ß1 (Wrana, 1992). Une fois activés, les récepteurs du TGF-ß peuvent activer deux voies différentes: soit la voie des Smads, soit la voie de la Mitogen Activated Protein Kinase p38 ($p38^{MAPK}$) (voir schéma récapitulatif : figure 32).

4.2.1 La voie des Smads (pour une revue: (Massagué, 1998))

Les protéines de la famille Smad sont les premières à avoir été identifiées comme substrat du récepteur sérine/thréonine kinase de type I du TGF-ß1. Cette voie joue un rôle central dans la transduction du signal du TGF-ß1.
Le premier membre de la famille des Smads à avoir été découvert est le gène *Mad* de drosophile. *Mad* a conduit a la découverte de nombreux gènes homologues chez les nématodes. En effet, trois homologues de *Mad* ont été identifiés chez *C. elegans* et ont été appelés sma-2, -3 et -4 car leur mutation engendre une petite taille. Par après, de nombreux homologues ont été identifiés chez les vertébrés et appelés Smads pour SMA/MAD homologues. L'analyse de la structure primaire des protéines Smad a mis en évidence 2 domaines très conservés situés à leurs extrémités et séparés par une région de longueur variable (Pour une revue: (Attisano and Lee-Hoeflich, 2001)).
Seules les Smad 1 à 4 ont été identifiées comme prenant part à la transduction du signal du TGF-ß1. Si le rôle de Smad 1 n'est pas clair (pour une revue: (Alevizopoulos and Mermod, 1997)), de nombreux arguments montrent un rôle essentiel des Smads 2 et 3 (une isoforme de la Smad 2). Smad 2 est transitoirement

associée au complexe du récepteur du TGF-ß1 (Macias-Silva, 1996). Cette association nécessite l'activation des récepteurs de types I et II.
Smad 4 semble aussi essentielle à la transduction du signal du TGF-ß1. Smad 4 peut former spécifiquement des complexes avec Smad 2 ou 3 via leurs extrémités C-terminales. Le complexe ainsi formé peut pénétrer à l'intérieur du noyau où il active soit directement la transcription de gènes cibles spécifiques, soit indirectement en coopérant avec d'autre facteurs de transcription comme Fast-1 (Chen et al., 1996b) ou ATF-2 (Sano et al., 1999). Fast-1 est un facteur de transcription présumé (Massagué, 1998) tandis que ATF-2 est un facteur de transcription de la famille d'AP-1 (Sano et al., 1999).
En résumé, Smad 2 et 3 s'associent au récepteur de type I qui les phosphoryle. Une fois phosphorylées, Smad 2 et 3 se lient à la protéine Smad 4. Le complexe formé pénètre le noyau où il agit soit comme facteur de transcription soit comme activateur de facteurs de transcription.

### 4.2.2 Voie des Mitogen Activated Protein Kinases.

Les cascades des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) régulent de nombreuses réponses aux mitogènes, à des inducteurs de l'apoptose, et à divers types de stress comme les radiations $\gamma$ et UV et les stress osmotiques (Pour une revue: (Massagué, 1998)).
Initialement, la voie des MAPK était divisée en la voie des MAPKs proprement dite, activables par les facteurs de croissance, et la voie des SAPKs, Stress-Activated Protein Kinase, activables par certains types de stress. Les c-Jun N-terminal Kinase (JNK) et $p38^{MAPK}$ étaient tout d'abord confinées dans un rôle de SAPK.
Cependant, MAPK *sensus stricto* et les SAPKs peuvent être activées par des stress et des facteurs de croissance en fonction du type cellulaire, du type de stress ou des conditions physiopathologiques. Par exemple, $p38^{MAPK}$ est activable par des stress comme $H_2O_2$ (Volonte et al., 2001), par hypoxie (Conrad et al., 1999) et par des signaux mitogènes. De récents travaux ont mis en évidence que cette MAPK pouvait être activée suite à une stimulation par du TGF-ß1 (Hanafusa et al., 1999; Sano et al., 1999).

L'activation de $p38^{MAPK}$ passerait par la protéine TAK-1 (TGF-ß-activated kinase-1). Cette protéine de la famille des MAPKKK (kinase de kinase de MAPK) est connue pour être activée suite à une stimulation de cellules par du TGF-ß1. Une fois activée, TAK-1 activerait par phosphorylation une protéine activatrice de $p38^{MAPK}$, soit la MKK6 ou la MKK3. Puis, MKK6 ou 3 se lie à $p38^{MAPK}$ et l'active par phosphorylation (Enslen et al., 1998). Le complexe ainsi produit pénètre dans le noyau où il active, comme la voie des Smads, le facteur de transcription ATF-2 (Hanafusa et al., 1999; Waas et al., 2001). La surexpression d'un mutant de TAK-1 ne pouvant plus phosphoryler MKK6 ou MKK3 supprime toute réponse au TGF-ß1, prouvant ainsi l'importance de cette protéine (Massagué, 1998).

Nous avons décrit séparément la voie de $p38^{MAPK}$ et des Smad, toutefois, il ne faut pas penser que ces voies s'excluent mutuellement. En effet, Sano *et al.* ont démontré que ces deux voies peuvent fonctionner de concert pour réguler le signal du TGF-ß1. En effet, le facteur de transcription ATF-2 peut à la fois être activé par le voie des Smads et celle de $p38^{MAPK}$ (Sano et al., 1999).

Il est à noter que les promoteurs du TGF-ß1 et du TGF-ß2 contiennent des sites de liaisons à l'ADN où peut se fixer ATF-2 (Hollingsworth et al., 1993; Kim et al., 1992). On peut donc imaginer qu'une activation de la voie de $p38^{MAPK}$ et/ou de la voie des Smads peut conduire à une surexpression du TGF-ß1 ou du TGF-ß2 sans que celui-ci soit forcément à l'origine de l'activation de ATF-2.

# But du travail

# But du travail et contexte en 1998

Pour pouvoir introduire la sénescence induite prématurément par les stress oxydatifs (SIPS) chez les fibroblastes diploïdes humains, nous avons décrit la sénescence réplicative et avons résumé brièvement la problématique des espèces chimiques réactionnelles dérivées de l'oxygène moléculaire. Nous avons ensuite expliqué que certains biomarqueurs de la sénescence se retrouvent en SIPS.
Par quels mécanismes ces biomarqueurs apparaissent-ils? Sont-ils de réels "biomarqueurs" vu qu'on les retrouve à la fois dans la sénescence réplicative et dans la SIPS? Comment ces mécanismes se situent-ils par rapport à la théorie des télomères et à la théorie des radicaux libres avancées pour expliquer la sénescence cellulaire? Ces mécanismes sont-ils communs à la sénescence réplicative et à la SIPS, sont-ils partiellement différents ou totalement différents?

La thèse de Dumont P. nous a appris que les gènes de l'ostéonectine, de la fibronectine, de SM22 et de l'apolipoprotéine J sont surexprimés lorsque la SIPS, induite par $H_2O_2$ ou par le t-BHP est installée, à 72 heures après les stress (Dumont et al., 2000c). Ceci constitue un des piliers de notre travail.
De nombreux travaux ont montré que la morphologie cellulaire observée en SIPS est très proche de la morphologie de type sénescent et que l'activité ß-galactosidase associée à la sénescence apparaît en SIPS (Chen and Ames, 1994; Dumont et al., 2000c; Serrano et al., 1997; Von Zglinicki et al., 1995b). Ceci représente donc un autre pilier de notre travail.
La transfection stable de l'ADN complémentaire des oncoprotéines E6 et E7 du papillomavirus humain de type 16 (HPV-16) dans des FHDs de souche IMR-90 a permis de lever partiellement le voile sur l'implication de Rb et de p53 suite au stress sous $H_2O_2$. L'oncoprotéine E6 lie, inactive et facilite la dégradation de p53 par protéolyse. L'oncoprotéine E7, elle, se lie notamment a Rb et aux membres de la famille de Rb, à savoir p107 et p130. Cette oncoprotéine facilite la protéolyse de Rb (Boyer et al., 1996; Farthing and Vousden, 1994; Tommasino and Crawford, 1995; Werness et al., 1990). Ces effets constituent un outil idéal pour l'étude du rôle de Rb et de p53 dans la SIPS induite par $H_2O_2$.
Quand E6 ou E7 sont exprimées par des IMR-90, ces deux oncoprotéines abolissent l'arrêt en phase G1 induit par l'$H_2O_2$ ce qui suppose que p53 et Rb sont essentielles dans le contrôle de l'arrêt en phase G1 (Chen et al., 1998). Ces mêmes cellules contenant l'oncoprotéine E7 ne présentent pas de changement morphologique suite au stress sous $H_2O_2$. Cette "non apparition" de la morphologie cellulaire serait due à une absence de la réorganisation des plaques focales d'adhésion et du cytosquelette en présence de E7. Chen *et al.* ont montré une réorganisation de la paxilline et de la vinculine, deux membres importants des plaques focales d'adhésion suite au stress sous $H_2O_2$. En collaboratoire avec notre laboratoire, cette équipe a également démontré un réarrangement de l'actine en fibre de stress après stress sous $H_2O_2$. La

modification de la morphologie cellulaire serait donc due à un changement de localisation des plaques focales d'adhésion, assurant la connection entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire. Ces modifications n'ont pas lieu en présence de E7. Par contre, après traitement par des doses subcytotoxiques de $H_2O_2$, les FHDs IMR-90 et les IMR-90 exprimant E6 développent la morphologie classique des cellules sénescentes. Les FHDs IMR-90 exprimant E7 ne présentent plus cette morphologie suite au stress (Chen et al., 2000 a). La délétion des acides aminés 21 à 24, comme des mutations aux positions 24 et 26 de l'oncoprotéine E7, supprime l'activité de liaison de E7 à Rb (Demers et al., 1996). Si l'on transfecte des ADN complémentaires (ADNc) mutés, les FHDs IMR-90 présentent à nouveau la morphologie sénescente suite au stress (Chen et al., 2000a). Lorsque ce travail a commencé, on savait donc que la protéine du rétinoblastome (Rb) est nécessaire à l'apparition du phénotype sénescent en SIPS induite par le peroxyde d'hydrogène (Chen et al., 1998; Chen et al., 2000a) constituant alors le troisième et dernier pré-requis à l'origine de notre thèse.

Dès le départ de ce travail, nous avons suspecté l'existence de deux grands mécanismes conduisant à la SIPS: un mécanisme causant en un arrêt de prolifération et un mécanisme responsable de l'apparition d'autres caractéristiques de la SIPS (morphologie sénescente, activité ß-gal associée à la sénescence, surexpression de la fibronectine, l'ostéonectine, SM22 et l'apolipoprotéine J). Très rapidement, nous avons suspecté l'existence de connexions entre ces deux grands mécanismes. C'est donc tout naturellement que la partie "Résultats" comportera deux volets. Tout d'abord sera présenté un premier volet où nous avons étudié comment le niveau d'expression de nombreuses molécules impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire en sénescence réplicative pouvait être modulé en SIPS induite par $H_2O_2$. Dans cette optique, un outil précieux a été l'utilisation de fibroblastes exprimant l'ADN complémentaire des gènes E6 et E7, contrôlant respectivement le niveau protéique de p53 et de Rb.
Le second volet de ce travail est basé sur le fait que le TGF-ß1 peut contrôler le niveau d'expression de la fibronectine, l'ostéonectine, SM22 et de l'apolipoprotéine J dans des types cellulaires très différents. Sachant que ces données étaient relativement éparses, le TGF-ß1 contrôlant un de ces gènes à la fois dans un type cellulaire différent (Owens, 1998; Shiba et al., 1998; Wegrowski et al., 1999), il était donc légitime de se demander si le TGF-ß1 pouvait être surexprimé après des stress subcytotoxiques sous $H_2O_2$. On savait par ailleurs qu'une stimulation de fibroblastes humains par du TGF-ß1 peut faire apparaître la morphologie caractéristique des cellules sénescentes (Garbi et al., 1990; Katakura et al., 1999).
Nous espérions également que le TGF-ß1 pourrait réguler l'arrêt prolifératif induit par l'$H_2O_2$.
C'est donc aussi naturellement que ce second volet du travail s'est intéressé à la voie de transduction du signal du TGF-ß1, en particulier en interaction avec la voie conduisant à l'hypophosphorylation de Rb. Enfin, les travaux théoriques réalisés par

cette équipe de recherche (Toussaint et al., 1991; Toussaint et al., 2001) faisaient penser que le passage accéléré d'un phénotype "jeune" à un phénotype ressemblant fort à la sénescence, devrait se faire en établissant de nouvelles boucles de régulations chez les cellules de phénotype "jeune". Ce sont ces travaux théoriques qui nous ont conduit à chercher comment le TGF-ß1 pourrait entretenir sa propre surexpression, stabilisant ainsi ces cellules dans un phénotype proche de la sénescence.
Nous invitons le lecteur à suivre l'exposé des résultats de notre thèse. Tous les chapitres des résultats ont été repris sous forme d'articles parus, sous presse ou en révision finale.

# Résultats

# Chapitre 1 : Niveau d'expression de gènes-clés dans la régulation du cycle cellulaire en SIPS: les CdKIs, les cyclines, CdKs, p53 et Rb.

## 1.1 Article 1: Cell cycle regulation in $H_2O_2$-induced premature senescence of human diploid fibroblasts and regulatory control exerted by the papilloma virus E6 and E7 proteins.

Vers la fin des années 1980 et début des années 1990, les groupes de K. Bayreuther et de J. Remacle avaient montré que les fibroblastes humains soumis à divers stress tels que les U.V. et le t-BHP acquièrent une morphologie sénescente et ne se divisent plus. Un pas décisif a été franchi en 1994 quand Q. Chen et B. Ames montrèrent que les fibroblastes IMR-90 exposés à du peroxyde d'hydrogène à dose subcytotoxique sont caractérisés par un arrêt du cycle cellulaire à la limite entre la phase G1 et S. La stimulation avec du sérum ou des facteurs de croissance tels que l'EGF n'est plus capable d'induire les mitoses (Chen and Ames, 1994).Un an plus tard, les mêmes auteurs montrent que le stress utilisé provoque des dommages à l'ADN (Chen et al., 1995). En 1998, ces auteurs montrent que la protéine $p21^{Waf-1}$ est surexprimée pendant au moins trois semaines après le stress sous $H_2O_2$ tandis que Rb devient hypophosphorylée. Quant au niveau protéique de p53, il augmente pendant les 44 heures suivant le stress puis revient ensuite à la normale. Ils montrent aussi que l'expression de la protéine de papillomavirus E7, chez les fibroblastes IMR-90, empêche l'apparition du phénotype sénescent après exposition à un stress subcytotoxique sous $H_2O_2$ (Chen et al., 1998; Chen et al., 2000a).

C'est dans ce contexte que commença notre travail. Nous reçûmes des fibroblastes IMR-90 exprimant E6, E7 ou E6 + E7 en provenance du laboratoire nouvellement établi de Q. Chen, à l'Université d'Arizona. Notre équipe avait au préalable prouvé l'efficacité de ces oncoprotéines sur la disparition de p53 et de Rb par Western blot (Chen et al., 2000a). A cette époque, on ne savait encore rien sur le niveau d'expression des gènes d'autres CdKIs que $p21^{Waf-1}$, dans le cadre de la SIPS, ni sur le niveau d'expression des gènes de la famille de Rb (p107 et p130), ni sur l'évolution du niveau de p53 et de $p21^{Waf-1}$ après stress subcytotoxique sous $H_2O_2$ chez les IMR-90 exprimant E6, E7 ou E6 + E7.

Nous avons donc commencé notre travail par l'étude du niveau d'ARNmessager de p53, Rb, p107, p130, $p21^{Waf-1}$, $p27^{Kip-1}$, $p14/15^{Ink-4b}$, $p16^{Ink-4a}$ et $p19^{Ink-4d}$ par RNAse protection assay. $p57^{Kip-2}$ et $p18^{Ink-4c}$ n'ont pas pu être détectées dans nos conditions expérimentales, soit à 72 heures après un stress subcytotoxiqe sous $H_2O_2$.

Nous présentons ci-après, dans l'article: Cell cycle regulation in $H_2O_2$-induced premature senescence of human diploid fibroblasts and regulatory control exerted by the papilloma virus E6 and E7 proteins (Experimental Gerontology, Vol. 35, pp 733-745, 2000), les résultats de cette analyse, réalisée chez les fibroblastes IMR-90 exprimant ou non la protéine E6 ou E7.

Dans ce premier article, nous nous sommes intéressés aux niveaux d'ARNm, suite à un stress subcytotoxique sous $H_2O_2$, de p53 et des différentes CdKIs pouvant êtres impliquées dans la phosphorylation de Rb. Nous avons également étudié le contrôle exercé par E6 ou E7 sur le niveau d'ARNm de ces différents gènes du cycle cellulaire.
Cette étude permettra de connaître l'effet de p53 sur $p21^{Waf-1}$ mais aussi de Rb sur p53 et les CdKIs. En effet, via E2F et Sp1, Rb peut contrôler l'expression de $p21^{Waf-1}$ et la cycline A. Il est donc possible que les autres membres de la famille de $p21^{Waf-1}$ comme $p27^{Kip1}$ soient aussi sous la dépendance directe ou indirecte de Rb.
La famille de Rb étant composée de 3 membres très proches du point de vue de leur séquence et de leur fonction, nous avons également étudié le niveau d'ARNm de ces différents gènes en SIPS mais également lorsque Rb ou p53 est neutralisé par les oncoprotéines E6 et E7.

Ces expériences réalisées au moyen de RNAse protection assay mettront en évidence, la variation transcriptionelle réalisée dans la voie de régulation de la phosphorylation de Rb mais aussi les jeux de retour de Rb sur les gènes sensés. Dans ce dessein des FHDs IMR-90 exprimant ou non E6 ou E7 ont été stressés durant 2 heures sous 150 µM d'$H_2O_2$ puis laissés à reposer 72 heures avant analyse du niveau d'ARNm des différents gènes d'intérêt.

# Article 1

ELSEVIER

Experimental Gerontology 35 (2000) 733–745

Experimental Gerontology

www.elsevier.nl/locate/expgero

# Cell cycle regulation in $H_2O_2$-induced premature senescence of human diploid fibroblasts and regulatory control exerted by the papilloma virus E6 and E7 proteins

C. Frippiat[a], Q.M. Chen[b], J. Remacle[a], O. Toussaint[a,*]

[a]*University of Namur (FUNDP), Unit of Cellular Biochemistry & Biology, 61, Rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium*

[b]*University of Arizona, Department of Pharmacology, Skagg Pharmaceutical Science Building, 1703 E. Mabel Street, Tucson, AZ 85721, USA*

Received 25 June 2000; accepted 29 June 2000

**Abstract**

Many biomarkers of replicative senescence appear in stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts (HDFs). The mRNA level of key cell cycle regulators was studied in $H_2O_2$-induced premature senescence of HDFs expressing or not the papillomavirus E6 and E7 proteins, which enhanced, respectively, the proteolysis of p53 and Rb. The CdKI's $p21^{waf-1}$ and $p16^{Ink-4a}$ were found overexpressed in $H_2O_2$-induced premature senescence, while $p19^{Ink-4d}$and $p27^{Kip-1}$ were repressed. The results obtained in E6 HDFs suggest that $p21^{waf-1}$ and $p16^{Ink-4a}$ over-expressions are p53-independent, while $p27^{Kip-1}$ and $p19^{Ink-4d}$ down-regulations are p53-dependent.

E6 regulated Rb, p130, p53 and $p16^{Ink-4a}$ mRNA level in non-stressing conditions, and regulated p130, p107, p53, $p19^{Ink-4d}$, $p27^{Kip-1}$ mRNA level in SIPS. SIPS modified the E6-mediated regulatory control on p107, $p16^{Ink-4a}$, $p19^{Ink-4d}$ and $p27^{Kip-1}$ mRNA level, when compared to normal conditions.

E7 regulated the mRNA level of all the genes studied, in all conditions, suggesting that the Rb family or other E7-interacting proteins might modify the expression of these genes. SIPS modified strongly the E7-mediated regulatory control on p107, $p16^{Ink-4a}$, $p19^{Ink-4d}$, $p27^{Kip-1}$, $p21^{Waf-1}$ and Rb mRNA level, when compared to normal conditions. Further work is ongoing to test whether this E7-mediated regulatory control takes place through interactions with Rb or other E7-interacting proteins. © 2000 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

*Keywords*: Stress-induced premature senescence; p53; pRb; CdKI; $H_2O_2$; Aging

* Corresponding author. Tel.: +81-724-132; fax: +81-724-135.
*E-mail address:* olivier.toussaint@fundp.ac.be (O. Toussaint).

0531-5565/00/$ - see front matter © 2000 Elsevier Science Inc. All rights reserved.
PII: S0531-5565(00)00167-4

## 1. Introduction

Exposure of human diploid fibroblasts (HDFs) to various non-lethal oxidative stresses trigger so-called stress-induced premature senescence (SIPS) (Brack et al., 2000). Such stressful conditions include exposure to $H_2O_2$, *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP), hyperoxia, UV light and radioactivity. Several biomarkers of replicative senescence have been observed in SIPS: senescent cell morphology, irreversible growth arrest, lack of response to mitogenic stimuli, senescence-associated β-galactosidase activity, appearance of the common 4977 bp mitochondrial DNA deletion, etc. Many genes which undergo a senescence-related change in mRNA level in HDFs, also undergo similar changes in $H_2O_2$-, *t*-BHP-, or hyperoxia-induced premature senescence (Chen and Ames, 1994; Chen et al., 1998; Dumont et al., 2000; Rodemann et al., 1989; Saretzki et al., 1998; Von Zglinicki et al., 1995).

The regulation of the irreversible growth arrest in $H_2O_2$-induced premature senescence has not been well investigated. Rb (retinoblastoma protein) and p53 are crucial regulators of cell division. For example, p53 controls the transcription of the cyclin-dependent kinase inhibitor (CdKI) $p21^{waf-1}$ (Gartel et al., 1998), which inhibit the kinase activities of the cyclinD/CdK (Cyclin-dependent Kinase) 4 and 6 complexes, leading to Rb hypo-phosphorylation. Hypo-phosphorylated Rb forms a complex with $E_2F$ transcription factor, thereby blocking the expression of genes necessary for the cell cycle to proceed. However, this classical scheme is not always perfectly reproduced in all cellular models. For instance, it has been shown that the $H_2O_2$-induced regulation of $p21^{Waf-1}$ is not necessarily dependent on p53 activation in HDFs: $p21^{Waf-1}$ can be overexpressed for weeks after the stress, keeping Rb in its hypo-phosphorylated form, while p53 is no more expressed a few hours after the stress (Chen et al., 1998; Dumont et al., 2000). Very little is known about the expression level of other CdKIs, and the control of their expression by p53 or Rb in SIPS.

Stable transfection of human papillomavirus (HPV) type-16 E6 and E7 cDNA in cells, is a useful tool for probing the role of p53 and Rb in growth arrest. The E6 protein binds p53 and facilitates its degradation by ubiquitin-dependent proteolysis. The HPV E7 protein binds Rb and Rb-related proteins. The HPV E7 protein enhances the proteolytic degradation of Rb, thereby inactivating its function (Boyer et al., 1996; Farthing and Vousden, 1994; Tommasino and Crawford, 1995; Werness et al., 1990). These effects of E6 and E7 were also observed in IMR-90 fibroblasts, in our experimental conditions (Chen et al., 1998). When introduced into cells, either E6 or E7 abolishes the $G_1$ arrest induced by DNA damaging agents, suggesting that both p53 and Rb proteins are essential for controlling the $G_1$ arrest. However, in many studies, the G1 arrest induced by DNA damage is transient and the cells eventually proceed through the cell cycle. Differently, SIPS is characterized by an irreversible growth arrest, including the inability to replicate in response to a variety of growth factors and reduced activity in certain cycle-related enzymes (Chen and Ames, 1994).

When p53 or Rb functions were inactivated by expressing the E6 or E7 cDNA in

---

*Abbreviations*: CdK, cyclin-dependent kinase; CdKI, cyclin-dependent kinase inhibitor; FBS, fetal bovine serum; HDFs, human diploid fibroblasts; HPV, human papilloma virus; Rb, retinoblastoma protein; SA β-gal, senescence-associated β-galactosidase; SIPS, stress-induced premature senescence; *t*-BHP,*tert*-butylhydroperoxide

IMR-90 HDFs, these cells showed little changes in their morphology. After sublethal treatment under $H_2O_2$, wild-type cells and E6 cells developed a senescent morphology, while the cells expressing E7 gene did not (Chen et al., 1998). Deletion of amino acids 21–24, as well as mutations at positions 24 or 26, which eliminate the pRb-binding activity of E7 (Demers et al., 1996), brought back the senescent morphology after $H_2O_2$ treatment. These experiments suggested that Rb is necessary for the development of SIPS (Chen et al., 1998).

In this study, we examined the mRNA level of p53, the CdKI's and members of the Rb family in SIPS induced by $H_2O_2$. We also estimated the regulatory control on the mRNA level of those genes exerted by E6 and E7.

## 2. Materials and methods

### *2.1. Cell culture*

IMR-90 human embryonic lung fibroblasts (HDFs) were grown in MEM medium + 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS). Confluent cells were exposed for 2 h to 150 μM $H_2O_2$ diluted in MEM + FBS. The cells were then washed twice with MEM and were given fresh medium + 10% FBS.

### *2.2. Infection with recombinant HPV E6 or E7 retroviral constructs*

Exponentially growing IMR-90 HDFs (PDL 16.8) were infected with retroviruses carrying either HPV E6 or E7, and the neo cDNA in 5 ml MEM containing 10% FBS and 4 μg/ml polybrene (Gibco, BRL, UK), as explained in more detail by Chen et al. (1998). The volume of the medium was doubled for overnight incubation followed by medium change. The cells expressing the E6 or E7 cDNA were selected by exposure to 500 μg/ml G418 (Gibco, BRL, UK).

### *2.3. RNase protection assay*

HDFs were harvested and pelleted. Total RNA was extracted (total RNA isolation kit, Pharmingen, USA, Cat. 45520K). The RNase protection assays were performed following the instruction of the multi-probe hCC-2 (Pharmingen, USA, Cat. 45091P). Briefly, the anti-sense RNA probes were synthesized with bacteriophages T7 RNA polymerase in the presence of [α-$^{32}$P]UTP and purified by phenol–chloroform extraction. The probe set was hybridized in excess to specific target mRNAs in solution. Free probes and other single-stranded RNA were digested by RNases. The remaining protected RNA/probes were resolved in denaturing polyacrylamide gels and quantified by Instant Imaging (Packard, USA). The results were expressed as percentages of the corresponding values found in the non-stressed IMR-90 HDFs transfected with a retroviral vector that carried no cDNA. The results of RNase protection assays are given as mean value ± SD, from three experiments.

## 3. Results

IMR-90 HDFs treated with a sublethal dose of $H_2O_2$ display a senescent phenotype, characterized by an irreversible growth-arrest (Chen and Ames, 1994). We investigated the cell cycle regulation at 72 h after sublethal $H_2O_2$ stress. This moment was chosen in order to study this regulation when SIPS is established. We examined the changes in the mRNA level of the different known CdKI's, members of Rb family and p53 in IMR-90 HDFs transfected retrovirally with E6 or E7 cDNAs or not. It was observed previously in the same experimental model that, IMR-90 HDFs transfected with E6 or E7 cDNA express a high level in E6 or E7 protein and have an immensely decreased level in p53 and Rb protein, respectively (Chen et al., 1998).

IMR-90 HDFs at early population doubling (38% of proliferative life span) were exposed for 2 h to 150 μM $H_2O_2$ diluted in culture medium + serum as explained in materials and methods. RNase protection assay was performed with RNA extracted at 72 h after $H_2O_2$ stress (Fig. 1). The results were expressed as percentages of the respective values obtained in wild-type non-stressed IMR-90 HDFs transfected with a retroviral vector, which carried no E6 or E7 cDNA. In order not to consider minor modifications due to experimental variations, only the significant differences (*t*-test of Student) greater than 30% were interpreted.

### *3.1. Analysis of mRNA level of p53*

In wild-type IMR-90 HDFs at 72 h after $H_2O_2$ stress, there was no difference in p53 mRNA level greater than 30% when compared to non-stressed cells. This can be correlated with other results obtained at the protein level, showing that the level of p53 protein returned to basal level by 44 h after $H_2O_2$ stress (Chen et al., 1998).

In E6 HDFs, exposed to $H_2O_2$ or not, there was a similar 1.5-fold increase in p53 mRNA, when compared to wild-type cells. This suggests the existence of a regulatory loop that increases the transcription of the *p53* gene, to counteract the E6-mediated proteolysis and disappearance of p53 protein observed by Chen et al. (1998).

In E7 HDFs, an increase in p53 mRNA was also observed when compared to wild-type cells. Indeed, respectively, a 2.0- and a 1.5-fold increase were observed in non-stressed and stressed E7 HDFs (Figs. 1 and 2). An increase in p53 protein was also observed in E7 HDFs by Chen et al. (1998).

### *3.2. Analysis of the mRNA level of the CdKIs*

According to their sequence homologies and functional similarities, the CdkIs belong to two families: Kip/Cip and Ink4. The Kip/Cip family includes $p21^{Waf-1}$, $p57^{Kip2}$ and $p27^{Kip1}$ (Hengst and Reed, 1998). These proteins bind to and inhibit mainly the cyclin-Cdk complexes formed during the G1 and S phase of the cell cycle. The Ink4 family includes $p15^{Ink-4b}$, $p16^{Ink-4a}$, $p18^{Ink-4c}$ and $p19^{Ink-4d}$, which are specific inhibitors of CdK4 and CdK6, associated or not to cyclin D (Carnero and Hannon, 1998). When associated with cyclin D, CdK4 and 6 are able to phosphorylate Rb at several sites (Zarkowska and Mittnacht, 1997), abolishing thereby the interactions of Rb with the $E_2F$ transcription factor.

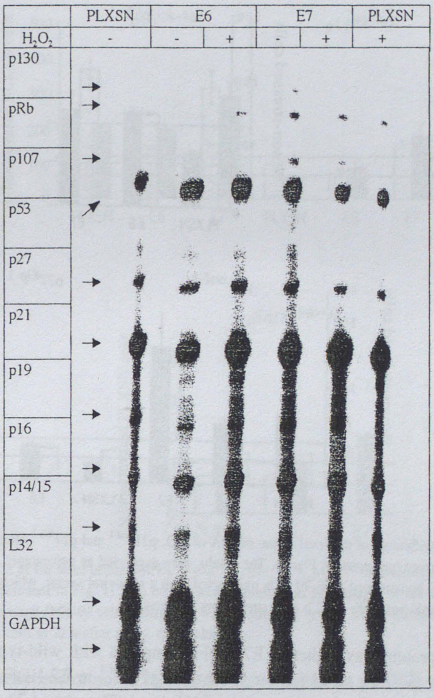



Fig. 1. Confluent IMR-90 HDF transfected with a retroviral vector, which carried no cDNA (PLXSN) or IMR-90 expressing E6 or E7 at similar CPD, were treated (+) or not (−) with 150 μM $H_2O_2$ for 2 h. Total RNA was extracted 72 h after the stress. The mRNA level of members of the Rb family (Rb, p130, p107), p53 and CdKIs ($p21^{Waf-1}$, $p27^{Kip-1}$, $p16^{Ink-4a}$, $p14/15^{Ink-4b}$, $p19^{Ink-4d}$) was analyzed by RNase protection assays. Reference mRNAs: L32 and GAPDH.

Analysis of the results is presented for $p21^{Waf-1}$, $p27^{Kip-1}$, $p16^{Ink-4}$, $p19^{Ink-4d}$ and $p14/15^{Ink-4b}$ mRNA. $p57^{Kip-2}$ and $p18^{Ink-4}$ mRNA could not be detected in all the conditions tested.

*3.2.1. $p21^{Waf-1}$ mRNA level in SIPS*

At 72 h after stress, a 2.2-fold increase was observed in $p21^{Waf-1}$ mRNA in $H_2O_2$-treated wild-type cells, when compared with non-treated cells.

In non-treated E6 HDFs, the level of $p21^{Waf-1}$ mRNA was similar to that observed in non-treated wild-type cells. In $H_2O_2$-treated E6 HDFs, there was a 1.9-fold increase comparable to that observed in $H_2O_2$-treated wild-type cells (Figs. 1 and 2). These results suggest that, at 72 h after stress, the overexpression of the $p21^{Waf-1}$ protein, observed by Chen et al. (1998), is p53-independent. These authors also observed that the level of

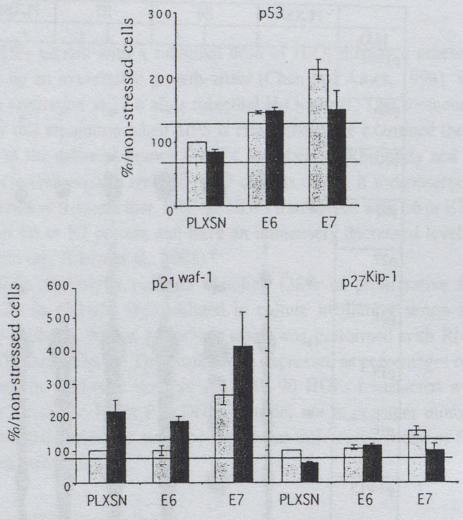



Fig. 2. Quantification of the level of the mRNA of p53, $p21^{Waf-1}$ and $p27^{Kip-1}$ after $H_2O_2$ treatment and RNase protection assay (presented in Fig. 1). The results were expressed as percentages of the corresponding values found in the non-stressed IMR-90 cells transfected with a retroviral vector, which carried no cDNA. Controls cells, gray columns; cells at 72 h after stress, dark columns.

$p21^{Waf-1}$ protein was higher in E7 HDFs compared with wild-type cells, and that $H_2O_2$ treatment caused a small further increase in $p21^{Waf-1}$ in E7 HDFs. Similar profiles were observed in the present study at the mRNA level (Figs. 1 and 2).

### *3.2.2. $p27^{Kip-1}$ mRNA level in SIPS*

A 40% decrease in $p27^{Kip-1}$ mRNA level was observed in $H_2O_2$-treated wild-type cells, when compared with non-treated cells. No significant change was observed in E6 HDFs. A 1.5-fold increase in $p27^{Kip-1}$ was observed in non-treated E7 HDFs, while there was no change in $H_2O_2$-treated E7 HDFs (Figs. 1 and 2).

### *3.2.3. $p16^{Ink-4}$ mRNA level in SIPS*

A 2.0-fold increase in $p16^{Ink-4}$ mRNA level was observed in $H_2O_2$-treated wild-type HDFs, when compared with non-treated HDFs. Similar profiles were obtained in E6 HDFs (Figs. 1 and 3). These results suggest that, at 72 h after stress, the transcription of $p16^{Ink-4}$ is p53-independent. In E7 HDFs, $H_2O_2$-treated or not, a 3.0-fold increase was observed in $p16^{Ink-4}$ mRNA level (Figs. 1 and 3).

### *3.2.4. $p19^{Ink-4d}$ mRNA level in SIPS*

A 32% decrease in $p19^{Ink-4d}$ mRNA level was observed in $H_2O_2$-treated wild-type cells, when compared with non-treated cells. No significant change was observed in E6 HDFs.

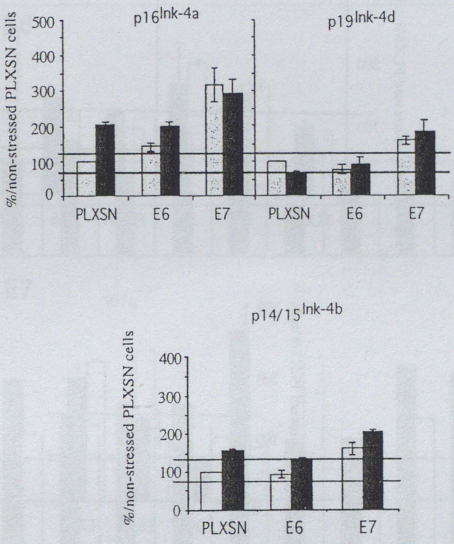



Fig. 3. Quantification of the level of the mRNA of $p16^{Ink-4a}$, $p14/15^{Arf}$, $p19^{Ink-4d}$ after $H_2O_2$ treatment and RNase protection assay (presented in Fig. 1). The results were expressed as percentages of the corresponding values found in the non-stressed IMR-90 cells transfected with a retroviral vector, which carried no cDNA. Controls cells, gray column; cells at 72 h after stress, dark columns.

In E7 HDFs, exposed or not to $H_2O_2$, a 1.5-fold increase in $p19^{Ink-4d}$ mRNA level was observed (Figs. 1 and 3).

### *3.2.5. $p14/15^{Ink-4b}$ mRNA level in SIPS*

In wild-type cells, a 1.5-fold increase was observed in $p14/15^{Ink-4b}$ mRNA level at 72 h after $H_2O_2$ stress. In non-treated E6 HDFs, the level of $p14/15^{Ink-4b}$ mRNA was similar to that observed in non-treated wild-type HDFs. In $H_2O_2$-treated E6 HDFs, there was a 1.35-fold increase when compared with non-treated E6 HDFs or wild-type HDFs.

The level of $p14/15^{Ink-4b}$ mRNA was 1.55-fold higher in E7 HDFs, when compared with wild-type HDFs. $H_2O_2$ treatment caused a further increase in $p14/15^{Ink-4b}$ mRNA in E7 HDFs, reaching a 2.0-fold increase (Figs. 1 and 3).

These results suggest that the Rb family or other E7-interacting proteins might down-regulate the expression of the CdKIs detected herein.

### *3.3. Analysis of mRNA level of pRb, p107 and p130*

The level of Rb mRNA remained stable in wild-type and E6 HDFs, exposed to $H_2O_2$ or not. These results suggest that the transcription of Rb is p53-independent.

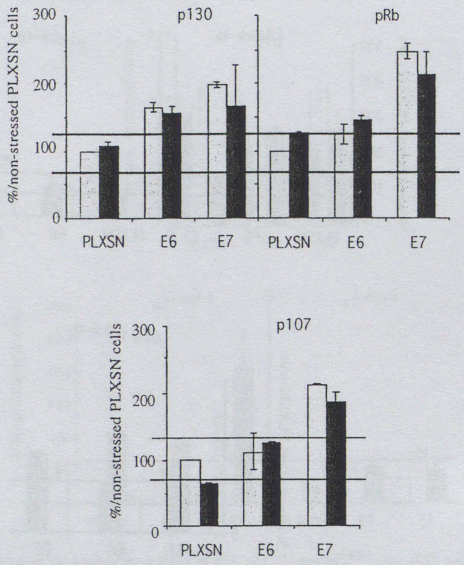



Fig. 4. Quantification of the level of the mRNA of pRb, 130 and p107 after $H_2O_2$ treatment and RNase protection assay (presented in Fig. 1). The results were expressed as percentages of the corresponding values found in the non-stressed IMR-90 cells transfected with a retroviral vector, which carried no cDNA. Controls cells, gray columns; cells at 72 h after stress, dark columns.

In E7 HDFs, respectively, a 2.3-fold increase and a 2.0-fold increase were observed in Rb mRNA level in non-treated HDFs and $H_2O_2$-treated HDFs (Figs. 1 and 4).

The basal level of p130 mRNA was increased 1.6- and 1.9-fold in E6 HDFs and E7 HDFs, respectively, when compared to wild-type HDFs. $H_2O_2$ had no effect on the level of p130 mRNA in wild-type E6 or E7 HDFs.

The p107 mRNA level decreased by 32% in $H_2O_2$-treated wild-type HDFs, remained stable in E6 HDFs and underwent a 2.0-fold increase in E7 HDFs (Figs. 1 and 4).

These results suggest that the Rb family or other E7-interacting proteins might down-regulate the expression of Rb, p130 and p107 in wild-type cells.

### *3.4. Effects of E6 and E7 in normal conditions and in SIPS*

For each mRNA studied, we calculated the ratio between its level of expression in the non-stressed E6 HDFs and its level in the non-stressed wild-type HDFs. For each mRNA studied, we also calculated the ratio between its level in the $H_2O_2$-treated E6 HDFs and its level in the $H_2O_2$-treated wild-type HDFs. The same type of calculations were applied to the E7 HDFs. Fig. 5 gives the results of these calculations. When the ratios were smaller

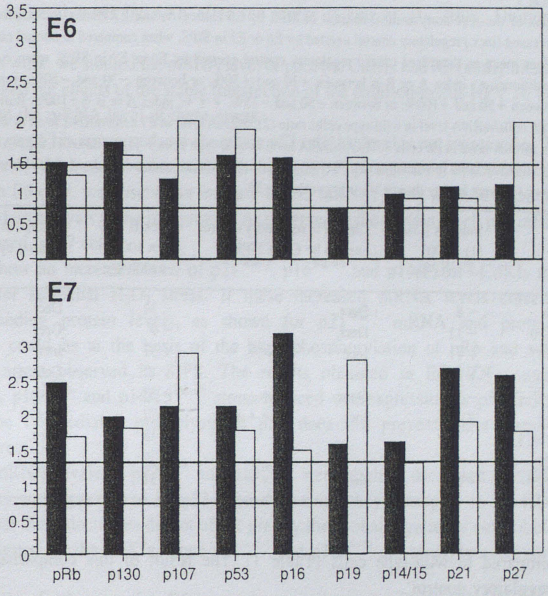



Fig. 5. Regulatory control exerted by E6 and E7 in normal conditions and in SIPS on the mRNA level of the genes studied. E 6: ■ mRNA level in E6 cells/mRNA level in wild-type cells; □ mRNA level in E6 cells + $H_2O_2$/mRNA level in wild-type cells + $H_2O_2$. E 7: ■ mRNA level in E7 cells/mRNA level in wild-type cells; □ mRNA level in E7 cells + $H_2O_2$/mRNA level in wild-type cells + $H_2O_2$.

than 0.70 or higher than 1.30, we considered that E6 or E7 had a significant effect on the mRNA level of the genes considered.

E6 regulated significantly the mRNA level of Rb, p130, p53 and $p16^{Ink-4}$ in normal conditions, and regulated significantly the mRNA level of p130, p107, p53, $p19^{Ink-4d}$ and $p27^{Kip-1}$ at 72 h after stress.

All the ratios obtained in E7 HDFs ± $H_2O_2$ were higher than 1.30, and it was considered, therefore, that E7 up-regulated significantly the expression of all the genes studied, in normal conditions or at 72 h after the stress.

### *3.5. Effects of SIPS on the regulatory control exerted by E6 and E7*

In order to highlight the differential regulatory control exerted by E6 or E7 in SIPS when compared with normal conditions, we compared the ratios obtained in SIPS and in normal conditions. We did this comparison only for those genes that showed a differential expression, i.e. among the genes studied in E6 and E7 cells, when

Table 1
Index of the regulatory control exerted in SIPS by E6 (Index A) and E7 (Index B). Positive values mean an increased (incr.) regulatory control exerted by E6 or E7 in SIPS, when compared to normal conditions. Negative values mean an decreased (decr.) regulatory control exerted by E6 or E7 in SIPS, when compared to normal conditions. *: index A or B is between +30 and +50%, or between −30 and −50%. **: index A or B is between +50 and +100%; or between −50 and −75%. ***: index A or B ≥ +100%. Ratio (1), mRNA level in E6 cells/mRNA level in wild-type cells; ratio (2), mRNA level in E7 cells/mRNA level in wild-type cells; ratio (3), mRNA level in E6 cells + $H_2O_2$/mRNA level in wild-type cells + $H_2O_2$; ratio (4), mRNA level in E7 cells + $H_2O_2$/mRNA level in wild-type cells + $H_2O_2$). This index was considered for those genes for which ratios (1), (2), (3) or (4) were higher than +30 or lower than −30

| | Index A [(3)/(1) × 100] − 100 (%) | Change in regulatory control exerted by E6 in SIPS | | Index B [(4)/(2) × 100] − 100 (%) | Change in regulatory control exerted by E7 in SIPS | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Rb | − 8 | Decr. | | − 32 | Decr. | * |
| p130 | − 12 | Decr. | | − 9 | Decr. | |
| p107 | + 71 | Incr. | ** | + 37 | Incr. | * |
| p53 | + 26 | Incr. | | − 17 | Decr. | |
| p16 | − 32 | Decr. | * | − 55 | Decr. | ** |
| p19 | ∓ 104 | Incr. | *** | + 77 | Incr. | ** |
| p14/15 | | | | − 18 | Decr. | |
| p21 | | | | − 30 | Decr. | * |
| p27 | + 85 | Incr. | ** | − 32 | Decr. | * |

compared to wild-type cells (Table 1). The result of this comparison was termed 'regulatory control'.

In Table 1, we see that the 'regulatory control' exerted by E6 is changed in SIPS by more than 30% when compared with normal conditions, for several genes studied. These genes are $p16^{Ink-4}$ for which E6-mediated regulatory control decreased in SIPS, and p107, $p27^{kip-1}$ and $p19^{Ink-4d}$ for which E6-mediated regulatory control increased in SIPS. This suggests that p53 exerts a differential regulation of these four genes in SIPS when compared with normal conditions.

We also see that, for several genes, the 'regulatory control' exerted by E7 is changed in SIPS by more than 30% when compared with normal conditions. These genes are the CdKIs $p21^{Waf-1}$, $p27^{Kip-1}$ and $p16^{Ink-4}$, and Rb, for which E7-mediated regulatory control decreased in SIPS. The E7-mediated regulatory control increased in SIPS in the case of p107 and $p19^{Ink-4d}$. This suggests that the Rb family or other E7-interacting proteins exert a differential regulation of these six genes in SIPS when compared with normal conditions.

## 4. Discussion

SIPS is characterized by many biomarkers of normal senescence such as definitive growth arrest. Very little is known on the regulation of this growth arrest. We know that the CdKI $p21^{Waf-1}$ is overexpressed for at least three weeks after $H_2O_2$ or *t*-BHP stresses, resulting in Rb hypo-phosphorylation over this period of time, while p53

returns to basal level by 44 h after the stress (Chen et al., 1998; Dumont et al., 2000).

In this work, we studied the mRNA level of p53, the CdKIs and Rb family members. We also studied the effects of the stable transfection of the papillomavirus HPV 16 E6 and E7 cDNA on the mRNA level of these genes.

As far as p53 is concerned, we show that p53 mRNA level is not increased at 72 h after $H_2O_2$ stress, which can be correlated with the basal p53 protein level observed at 72 h after stress. In E6 cells, we observe an increase in p53 mRNA, likely to be in response to E6-mediated proteolysis of the p53 protein. As observed at the protein level, p53 mRNA level is increased in E7 cells.

We show an increased level of $p21^{Waf\text{-}1}$, $p16^{Ink\text{-}4a}$ and $p14/15^{Ink\text{-}4b}$ CdKIs mRNA at 72 h after sublethal $H_2O_2$ stress. If these increased mRNA levels correlate with corresponding protein levels, as shown for $p21^{Waf\text{-}1}$ mRNA and protein, these changes could be at the basis of the hypo-phosphorylation of pRb and subsequent growth arrest observed in SIPS. The results obtained in E6 HDFs suggest that $p21^{Waf\text{-}1}$, $p16^{Ink\text{-}4a}$ and $p14/15^{Ink\text{-}4b}$ stress-induced overexpression is p53-independent, since the E6-mediated proteolysis of p53 does not prevent these stress-induced overexpressions.

The mRNA levels of $p27^{Kip\text{-}1}$ and $p19^{Ink\text{-}4d}$ were slightly decreased in SIPS. These decreases are suggested to be p53-dependent since they disappear in E6 HDFs. It is likely that these decreases do not affect greatly the global regulatory control of the cell cycle exerted by the CdKIs, since $p21^{waf\text{-}1}$ and $p16^{Ink\text{-}4a}$ are strongly overexpressed in SIPS.

The role of other putative E6 interacting proteins cannot be ruled out at this point. Nevertheless, $p19^{Ink\text{-}4d}$ has been shown to inhibit the MDM2 protein activity, leading to an increase in p53 activity since MDM2 inhibits p53 (Chin et al., 1998; Pomerantz et al., 1998; Weber et al., 1999). The decrease in $p19^{Ink\text{-}4d/Arf}$ mRNA level observed in SIPS could lift the inhibition of MDM2. This would lead to a decrease in the p53 activity, arguing thereby in favor of a p53-independent stress-induced overexpression of $p21^{Waf\text{-}1}$, $p16^{Ink\text{-}4a}$ and $p14/15^{Ink\text{-}4b}$.

$p21^{Waf\text{-}1}$ and $p27^{Kip\text{-}1}$ have an homologous domain responsible for CdKI activity (Nakanishi et al., 1995), while $p16^{Ink\text{-}4a}$ and $p19^{Ink\text{-}4d}$ have another very homologous CdKI domain. The $p16^{Ink\text{-}4a}$ and $p19^{Ink\text{-}4d/Arf}$ RNA result from an alternative reading frame of the same Arf locus (Chin et al., 1998). The existence of these homologous domains and alternative reading frame could explain the low expression of $p27^{Kip\text{-}1}$ and $p19^{Ink\text{-}4d/Arf}$ after $H_2O_2$ stress.

The regulatory control exerted by E6 was high for Rb, p130, p53 and $p16^{Ink\text{-}4a}$ in normal conditions, and for p130, p107, p53, $p19^{Ink\text{-}4d}$ and $p27^{Kip\text{-}1}$ in SIPS. SIPS changed the regulatory control exerted by E6 on p107, $p16^{Ink\text{-}4a}$, $p19^{Ink\text{-}4d}$ and $p27^{Kip\text{-}1}$ mRNA level immensely, when compared to normal conditions.

The regulatory control exerted by E7 was high for all the genes studied, in normal conditions and in SIPS. SIPS changed the regulatory control exerted by E7 immensely, when compared to normal conditions for p107, $p16^{Ink\text{-}4a}$, $p19^{Ink\text{-}4d}$ and $p27^{Kip\text{-}1}$ (as observed for E6), and also $p21^{Waf\text{-}1}$ and Rb. This suggests an important role for Rb in the regulation of the cell cycle of wild-type cells in

SIPS. Further experiments are being performed to confirm whether Rb is really responsible for this regulation.

## Acknowledgements

C. Frippiat has a fellowship of the FRIA, Belgium. O. Toussaint is a Research Associate of the FNRS. We thank the European Union Biomed and Health research Programme, Concerted Action Programme Molgeron & shared-cost action 'Genage' BMH1 CT98 1710.

## References

Boyer, S.N., Wazer, D.E., Band, V., 1996. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. Cancer Res. 15, 4620–4624.

Brack, C., Lithgow, G., Osiewacz, H., Toussaint, O., 2000. Molecular and cellular gerontology. EMBO J. 19, 1929–1934.

Carnero, A., Hannon, G.J., 1998. The INK4 family of CDK inhibitors. In: Compans, R.W., Cooper, M., Hogle, J.M., Koprowski, H., Oldstone, M., Potter, M., Vogt, P.K. (Eds.). Cyclin Dependent Kinase (CDK) Inhibitors, pp. 43–56.

Chen, Q., Ames, B.M., 1994. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploidb fibroblast F65 cells. Proc. Natl Acad. Sci. 91, 4130–4134.

Chen, Q.M., Bartholomew, C.J., Campisi, J., Acosta, M., Reagan, J.D., Ames, B.N., 1998. Molecular analysis of $H_2O_2$-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. Biochem. J. 332, 43–50.

Chin, L., Pomerantz, J., DePinho, R.A., 1998. The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene-two products-two pathways. Trends Biochem. Sci. 23, 291–296.

Demers, G.W., Espling, E., Harry, J.B., Etscheid, B.G., Galloway, D.A., 1996. Abrogation of growth arrest signals by human papillomavirus type 16 E7 is mediated by sequences required for transformation. J. Virol. 70, 6862–6869.

Dumont, P., Burton, M., Chen, Q.M., Gonos, E.S., Frippiat, C., Mazarati, J.-B., Eliaers, F., Remacle, J., Toussaint, O., 2000. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblasts. Free Rad. Biol. Med. 28, 361–373.

Farthing, A.J., Vousden, K.H., 1994. Functions of human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins. Trends Microbiol. 2, 170–174.

Gartel, A.L., Goufman, E., Tesosian, S.G., Shih, H., Yee, A.S., Tyner, A.L., 1998. Activation and repression of p21WAF1/CIP1 transcription by RB binding proteins. Oncogene 17, 3463–3469.

Hengst, L., Reed, S.I., 1998. Inhibitors of the Cip/Kip Family. In: Compans, R.W., Cooper, M., Hogle, J.M., Koprowski, H., Oldstone, M., Potter, M., Vogt, P.K. (Eds.). Cyclin Dependent Kinase (CDK) Inhibitors, pp. 25–36.

Nakanishi, M., Robetorye, R.S., Adami, G.R., Pereira-Smith, O.M., Smith, J.R., 1995. Identification of the active region of the DNA synthesis inhibitory gene p21Sdi1/CIP1/WAF1. EMBO J. 14, 555–563.

Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W., Cordon-Cardo, C., DePinho, R.A., 1998. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2s inhibition of p53. Cell 92, 713–723.

Rodemann, H.P., Bayreuther, K., Francz, P.I., Albiez, M., 1989. Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro. Exp. Cell Res. 180, 84–93.

Saretzki, G., Feng, J., Von Zglinicki, T., Villeponteau, B., 1998. Similar gene expression pattern in senescent and hyperoxic-treated fibroblasts. J. Gerontol. 53A, B438–B442.

Tommasino, M., Crawford, L., 1995. Human papillomavirus E6 and E7: proteins which deregulate the cell cycle. BioEssays 17, 509–518.

Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Döcke, W., Lotze, C., 1995. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? Exp. Cell Res. 220, 186–193.

Weber, J.D., Taylor, L.J., Roussel, M.F., Sherr, C.J., Bar-Sagi, D., 1999. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. Nature Cell Biol. 1, 20–26.

Werness, B.A., Levinne, A.J., Howley, P.M., 1990. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. Science 248, 76–79.

Zarkowska, T., Mittnacht, S., 1997. Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases. J. Biol. Chem. 272, 12 738–12 746.

1.2 Article 2: Down-regulation and decrease activity of cyclin-dependent 2 in $H_2O_2$-induced premature senescence (Int. J. Biochem. Cell Biol.).

Les connaissances retirées de cette première partie du travail et les connaissances préalables de la littérature concernent principalement le niveau d'ARNm et protéique de p53, $p21^{Waf-1}$ et Rb ainsi que le niveau de phosphorylation de Rb. Par ailleurs, quoique nous ayons montré une augmentation du niveau d'ARNm de $p16^{Ink-4a}$ à 72 heures après stress subcytotoxique sous $H_2O_2$, Chen *et al.* ont montré en 2001 que le niveau protéique de $p16^{Ink-4a}$ n'est pas modifié (ceci est confirmé dans la seconde partie du travail, ce chapitre).
Pour mieux comprendre les grandes lignes de la régulation du cycle cellulaire en SIPS induite par $H_2O_2$, il fallait à présent étudier le niveau d'ARNm et de protéines des principales cyclines et kinases dépendantes de cyclines impliquées dans la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire, ainsi que l'activité de ces kinases dépendantes de cyclines. Nous présentons ci-après les résultats de cette étude réalisée à 72 heures après stress subcytotoxique sous $H_2O_2$ appliqués sur des fibroblastes de poumon fœtal IMR-90.
En ce qui concerne les activités kinases des CdK2, 4 et 6, nous avons réalisé des expériences visant à savoir si la fraction des CdK's non-liée à une CdKI voyait son activité kinase diminuer à 72 heures après le stress sous $H_2O_2$. Nous n'avons donc pas utilisé d'anticorps reconnaissant les CdK's couplées à une CdKI car il était évident que ces conditions auraient montré une inhibition de l'activité kinase de CdK2, 4 et 6 vu le niveau de surexpression de $p21^{Waf-1}$.
De plus, il a récemment été décrit que l'activité des CdK pouvait être régulée indépendamment des CdKIs. En effet, il a été décrit que CdK2 peut être régulée par phosphorylation (Dulic et al., 1993). C'est pourquoi des immunoprécipitations ont été réalisées en utilisant des anticorps dirigés contre la forme libre de ces CdK, c'est-à-dire non associées à une cycline ou à une CdKI.

Article 2

PERGAMON The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 1361 (2002) 1–9

IJBCB

www.elsevier.com/locate/ijbcb

# Down-regulation and decreased activity of cyclin-dependent kinase 2 in $H_2O_2$-induced premature senescence

Christophe Frippiat, José Remacle, Olivier Toussaint*

*Research Unit on Cellular Biology, University of Namur (FUNDP), 61 Rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium*

**Abstract**

Premature senescence of human diploid fibroblasts (HDFs) induced by exposure to $H_2O_2$ at subcytotoxic concentration is characterized by many biomarkers of normal senescence such as irreversible growth arrest. Cyclin-dependent kinase inhibitor (CdKI) $p21^{Waf-1}$ is overexpressed in $H_2O_2$- and *tert*-butylhydroperoxide-induced premature senescence, likely explaining in part the hypophosphorylation of the retinoblastoma protein. A $p21^{Waf-1}$ is known to inhibit the kinase activity of the cyclin-dependent kinase (CdK) 4 and 6 cyclin complexes. In this work, we investigated whether the kinase activity of the CdK4 and 6 cyclin complexes can be modulated by CdKI $p16^{Ink-4a}$, by changes in the protein level of CdKs and cyclins, or by changes in kinase activity of these CdKs not directly involving CdKIs. RNase protection assay, semi-quantitative RT-PCR, Western blot and kinase-assay showed that the mRNA level, protein and kinase activity of CdK2 are decreased at 72 h after $H_2O_2$ stress. These results suggest that the hypophosphorylation of the retinoblastoma protein is mediated in part by a decrease of the kinase activity of CdK2 not directly involving CdKIs. This CdK2-mediated effect should be considered in addition to the inhibition of cyclin D-CdK4 and 6 complexes by CdKI $p21^{Waf-1}$.

© 2002 Published by Elsevier Science Ltd.

*Keywords:* Stress-induced premature senescence; Cyclin; Rb; $H_2O_2$; CdK

## 1. Introduction

Exposure of human diploid fibroblasts (HDFs) to oxidative agents such as hydrogen peroxide at subcytotoxic concentration triggers stress-induced premature senescence (SIPS). Biomarkers of replicative senescence appearing in SIPS are: senescent-like cell morphology, irreversible growth arrest, lack of response to mitogenic stimuli, senescence-associated β-galactosidase activity, appearance of the common 4977 bp mitochondrial DNA deletion, etc. Several genes with a senescence-related change of expression level also undergo similar changes in SIPS triggered by $H_2O_2$, *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP), or hyperoxia [1,2] (for reviews: [3,4]). HDFs in SIPS triggered by $H_2O_2$ are arrested in G1 [5], with a sustained up-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor (CdKI) $p21^{Waf-1}$ [1,6]. The retinoblastoma protein (Rb) becomes subsequently hypophosphorylated due to inhibition of the kinase activity of the cyclin D-CdK complexes [1,7]. The protein level of p53 increases just after the stress and then comes down to its basal level [1].

*Abbreviations:* CdK, cyclin-dependent kinase; CdKI, cyclin-dependent kinase inhibitor; FBS, fetal bovine serum; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HDFs, human diploid fibroblasts; $H_2O_2$, hydrogen peroxide; HPV, human papillomavirus; MEM, minimal essential medium; Rb, retinoblastoma protein; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SA β-gal, senescence-associated β-galactosidase; SIPS, stress-induced premature senescence; *t*-BHP, *tert*-butylhydroperoxide

* Corresponding author. Tel.: +32-81-72-41-32; fax: +32-81-72-41-35.

*E-mail address:* olivier.toussaint@fundp.ac.be (O. Toussaint).

1357-2725/02/$ – see front matter © 2002 Published by Elsevier Science Ltd.

PII: S1357-2725(02)00129-2

Stable transfection of human papillomavirus type-16 E7 cDNA in cells has been used as a useful tool for probing the role of Rb in growth arrest. The E7 protein binds Rb and Rb-related proteins and facilitates their degradation by ubiquitin-dependent proteolysis [8,9]. This effect of E7 was also observed in IMR-90 HDFs in our experimental conditions. When Rb is degraded due to expression of E7 cDNA, IMR-90 HDFs showed little morphological changes. After subcytotoxic treatment with $H_2O_2$, wild type IMR-90 HDFs developed a senescent morphology and displayed an increase of their surface and volume. The IMR-90 HDFs expressing *E7* gene did not. Deletion of amino acids 21–24 as well as mutations at positions 24 or 26, which eliminate the Rb-binding activity of E7, brought back these senescent features appearing after $H_2O_2$ treatment. These experiments suggested that Rb is necessary for SIPS to occur [10].

In this work, we studied the expression level of various cyclins and CdKs as well as CdKs kinase activities in $H_2O_2$-induced premature senescence. We also studied how E6 and E7 modulate the expression level of the cyclins and CdKs studied.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell culture

IMR-90 embryonic lung HDFs were grown in MEM medium + 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS). Confluent cells were exposed for 2 h to 150 μM $H_2O_2$ diluted in MEM + FBS. The cells were then washed twice with MEM and were given fresh medium + 10% FBS [5]. IMR-90 HDFs expressing E6 or E7 were given by Dr. Q.M. Chen (University of Arizona, Tucson, USA).

### 2.2. RNA isolation and semi-quantitative RT-PCR

Cells were harvested and pelleted. Total RNA was extracted (RNA isolation kit, Pharmingen, USA), and semi-quantitative RT-PCRs were achieved on CdK2 mRNA (primers: 5′-tctatcagagtcgaagatggg-3′ (900–882) and 5′-tccatggagaacttccaaaag-3′ (59–38)) in one step (Access RT-PCR kit, Promega, USA) in presence of [α-$^{32}$P] DcTP (0.025 μCi per reaction). RT-PCRs were performed in the common exponential range of the PCR amplification using 50 and 100 ng of total RNA in 50 μl containing 5 U of AMV reverse transcripts and 5 U of Pfu polymerase. We used GAPDH mRNA level as reference. GAPDH mRNA level was checked to be stable in all experimental conditions tested (primers: 5′-cgt ctt cac cat gga ga-3′ (333–353) and 5′-cgg cca tca cgc cca cag ttt-3′ (612–622)). RT-PCR products were electrophoresed on a 5% (w/v) polyacrylamide gel and analyzed (Instant Imager, Packard, USA). The dried gels were exposed to β-max films (Amersham, Belgium). Negative controls were performed without RNA. A PCR without reverse transcription was always performed on RNA, prior to reverse-transcription, to check for DNA contamination. The sequences of the RT-PCR products were checked for amplification specificity. The results were expressed as mean value ± S.D. on three independent experiments.

### 2.3. RNase protection assay

RNase protection assays were performed on total RNA following the instructions of the multi-probe hCC-2 kit (Pharmingen, USA, Cat. 45091P). Briefly, the anti-sense RNA probes were synthesized with bacteriophages T7 RNA polymerase in the presence of [α-$^{32}$P]UTP and purified by phenol–chloroform extraction. The probe set was hybridized in excess to specific target mRNAs in solution. Free probes and other single-stranded RNA were digested by RNases. The remaining protected RNA/probes were resolved in denaturing polyacrylamide gels and quantified by Instant Imaging (Packard, USA). Undigested probes serve as a size markers. We plotted a standard curve of migration distance versus log of sequence length. This curve is used to establish the identity of "RNase protected" bands. The probe lengths are greater than the protected fragment lengths; this is due to the presence of flanking sequences in the probes that are derived from plasmids and do not hybridize with target mRNA. The dried gels were exposed to β-max film (Amersham, Belgium). GAPDH and L32 mRNA levels were used as reference levels. The results were expressed as percentages of the corresponding values found in the non-stressed IMR-90 HDFs transfected with a retroviral vector which carried no cDNA. The results of RNase protection assays are given as mean values ± S.D. on three experiments.

Table 1
Antibodies used in this study

| Antibodies | | References |
|---|---|---|
| Anti-CdK6 | Santa-Cruz (USA) | Sc-7961 |
| Anti-CdK4 | Santa-Cruz (USA) | Sc-260 |
| Anti-CdK2 | Santa-Cruz (USA) | Sc-136 |
| Anti-cyclin D1/D2 | Upstate Biotechnology (USA) | 05-362 |
| Anti-cyclin D3 | Upstate Biotechnology (USA) | Sc-182 |
| Anti-cyclin E | Upstate Biotechnology (USA) | Sc-481 |
| Anti-cyclin G1 | Upstate Biotechnology (USA) | Sc-7865 |
| Anti-$p21^{Waf-1}$ | Upstate Biotechnology (USA) | Sc-3987 |
| Anti-tubulin α | Inogenex (USA) | AM-2495-21 |

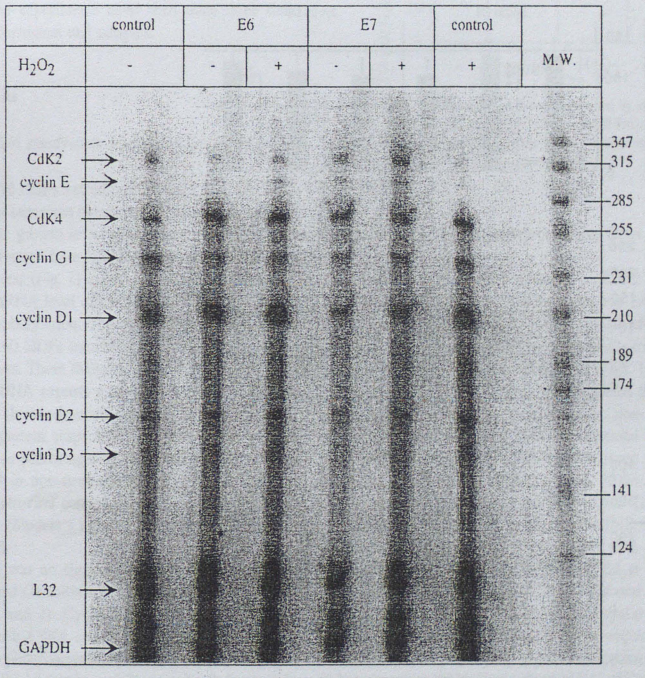



Fig. 1. The mRNA steady-state level of cyclin D1, D3, E, G1, and CdK2 and 4. Confluent IMR-90 HDFs transfected with a retroviral vector which carried no cDNA (control cells) and IMR-90 expressing E6 or E7 were treated (+) or not (−) with 150 μM $H_2O_2$ for 2 h. Total RNA was extracted at 72 h after stress. The steady-state mRNA level of cyclin D1, D3, E, and G1 and CdK2 and 4 was analyzed by RNase protection assays. Reference mRNAs: L32 and GAPDH.

### 2.4. CdK kinase assay

HDFs were lysed in RIPA buffer as used in several kinase assays such as $p38^{MAPK}$ and cyclin D1 [11,12]. The lysates were incubated overnight at 4 °C with the respective antibodies. A/G sepharose beads were incubated with the lysate for 2 h with gentle shaking. The beads were pelleted and rinsed three times with RIPA buffer.

The pellets were washed twice with kinase buffer (HEPES 50 mM, DTT 1 mM, $MgCl_2$ 10 mM, EGTA 2.5 mM, $Na_3VO_4$ 0.1 mM, ATP 20 μM, NaF 1 mM). A 2 μg Rb N-terminal peptide (Biolabs, no. 6022L) per sample were added to the pellets resuspended in kinase buffer. After 30 min incubation at 37 °C in presence of 1 μCi of [$\gamma$-$^{32}$P]ATP, the reactions were stopped with EDTA 20 mM. After 10% SDS-polyacrylamide electrophoresis, the radioactivity was analyzed by Instant Imager (Packard, USA).

The radioactivity of the bands was normalized by Western blotting on the three CdKs using samples from the cell lysates produced for kinase assay.

### 2.5. Western blot analysis

The cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline solution and lysed on ice (lysis buffer: 10 mM Tris–HCl, pH 7.6, 0.1 SDS, 10%

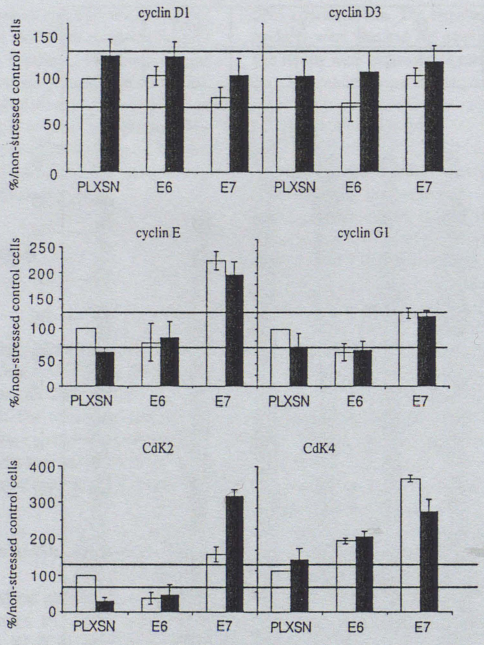



Fig. 2. Quantification of the steady-state level of the mRNA of cyclin D1, D3, G1, E, and CdK2 and 4 after $H_2O_2$ treatment and RNase protection assay (presented in Fig. 1). The results were expressed as percentage of the corresponding values found in the non-stressed control IMR-90 HDFs transfected with a retroviral vector which carried no cDNA ± S.D. Controls HDFs: white columns; HDFs at 72 h after stress: black columns. Controls IMR-90 HDFs were transfected with the empty vector named PLXSN (Clontech, USA).

(v/v) glycerol, 1% (v/w) bromophenol blue, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). The cell lysates were sonicated on ice and electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gels. After transfer, the membranes were probed with antibodies (Table 1) and thereafter with a horseradish peroxidase-linked secondary antibody (Amersham Life Science, UK). The bands were visualized after incubation with chemiluminescent substrates (ECL detection kit RPN 2106, Amersham Life Science, UK). The protein levels were determined by integration of the optical density using Image Master V3.0 software (Amersham Life Science, UK). All the membranes were also probed with anti-tubulin α (no. H-300, Santa-Cruz, USA) to check protein loading and to normalize the results.

All the experiments have been done three times from independent cell samples.

## 3. Results

### 3.1. mRNA steady-state level of cyclins and CdKs

IMR-90 HDFs treated for 2 h with 150 μM of $H_2O_2$ display a senescent phenotype characterized by an irreversible growth arrest [7]. RNase protection assay was performed from total RNA extracted at 72 h after $H_2O_2$ stress (Fig. 1) in order to examine the changes of the mRNA level of cyclins and CdKs involved in Rb phosphorylation. This study was also carried out in IMR-90 HDFs transfected retrovirally with E6 or E7 cDNAs. These IMR-90 HDFs transfected with E6 or E7 cDNA express a high level in E6 or E7 protein and show a dramatic decrease of the level of p53 and Rb protein, respectively [1]. The results were expressed as percentages or fold-changes of the values obtained in non-stressed IMR-90 HDFs transfected with a retroviral control vector. Only significant differences (Student's *t*-test) greater than 30% were interpreted.

There was no significant difference in cyclin D1, D3, E, and G1 mRNA level in control IMR-90 HDFs (Figs. 1 and 2). Cyclin D1 and 3 associate specifically with CdK4 and 6 [13], which enable CdK4 and 6 to phosphorylate Rb at several sites, abolishing thereby the interactions of Rb with the $E_2F$ transcription [14]. Cyclin E binds and activates CdK2 [15]. Cyclin G1 is a p53-responsive protein after DNA damage [15].

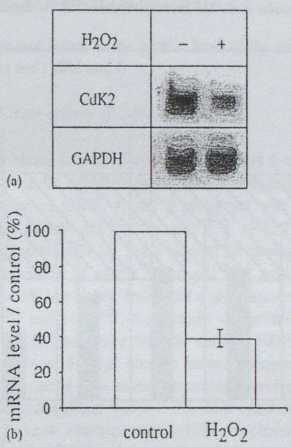



Fig. 3. CdK2 mRNA steady-state level estimated by semi-quantitative RT-PCR at 72 h after a 2 h stress with 150 μM $H_2O_2$. (a) Autoradiography after migration of the products obtained by semi-quantitative RT-PCR; (b) quantification.

There was a 3.1-fold decrease in CdK2 mRNA level (Figs. 1 and 2). This decrease was confirmed by semi-quantitative RT-PCR (Fig. 3). No change in CdK4 mRNA level was observed in $H_2O_2$-treated as compared to non-treated control cells (Figs. 1 and 2).

For each mRNA studied, we calculated the ratio between its level of expression in the non-stressed IMR-90 + E6 HDFs and in the non-stressed IMR-90 HDFs. We also calculated the ratio between its level in the $H_2O_2$-treated IMR-90 + E6 HDFs and its level in the $H_2O_2$-treated IMR-90 HDFs. The same type of calculations was applied to the IMR-90 + E7 HDFs. When the ratios were smaller than 0.70 or higher than 1.30, we considered that E6 or E7 had a significant effect (Fig. 4). E6 regulated significantly the steady-state mRNA level of cyclin G1 and CdK2 (down-regulation) and CdK4 (up-regulation) in normal conditions. E6 up-regulated significantly the steady-state mRNA level of cyclin E, CdK2 and 4 at 72 h after stress. The p53-dependent regulation of ex-

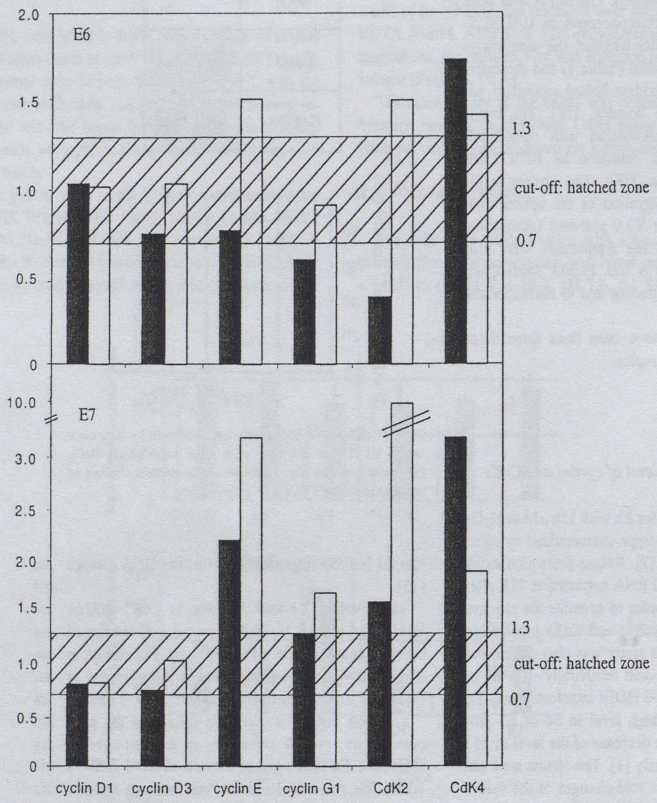



Fig. 4. Control exerted by E6 and E7 in normal conditions and in SIPS on the mRNA level of the genes studied. E6: black column, mRNA level in E6 HDFs/mRNA level in control HDFs; white column, mRNA level in E6 HDFs + $H_2O_2$/mRNA level in control HDFs + $H_2O_2$. E7: black column, mRNA level in E7 HDFs/mRNA level in control HDFs; white column, mRNA level in E7 HDFs + $H_2O_2$/mRNA level in control HDFs + $H_2O_2$.

pression of these genes is suggested. E7 up-regulated significantly the steady-state mRNA level of cyclin E, cyclin G1, and CdK2 and 4 both in normal conditions and in SIPS. This suggests that Rb family or other E7-interacting proteins exert a differential regulation of these genes.

### 3.2. Protein level of CdKIs $p21^{Waf-1}$ and $p16^{Ink-4a}$, cyclins and CdKs

As shown in Fig. 5, there was an increase in the protein level of $p21^{Waf-1}$ at 72 h after a 2 h treatment with 150 μM $H_2O_2$. No significant increase in the protein

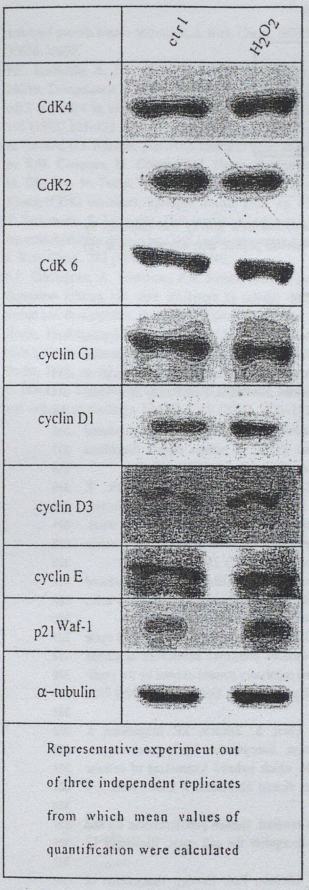



Fig. 5. Analysis of the protein level of cyclin D1, D3, G1, E, CdK2 and 4, and p21 $^{Waf-1}$ by Western blot. The protein loading was normalized by detecting α-tubulin.

level of $p16^{Ink-4a}$ was found. The protein level of cyclin D1, D2, D3, E, G1, and CdK2, 4, and 6 was also analyzed (Fig. 5). We found an interesting two-fold decrease in the CdK2 protein level after stress. No change was found in the protein level of the others cyclins and CdK4 and 6.

### 3.3. Kinase activity of CdK2, 4, and 6

The kinase activity of cyclin D-CdK4 and 6 complexes can be inhibited by CdKIs. Co-immunoprecipitations of CdK2, 4, and 6 performed with antibodies against $p21^{Waf-1}$ or $p16^{Ink-4a}$ at 72 h after subcytotoxic $H_2O_2$ stress showed no change of the association of $p16^{Ink-4a}$ and $p21^{Waf-1}$ with the cyclin-CdK complexes. Indeed for a given amount of $p21^{Waf-1}$ and $p16^{Ink-4a}$, the quantity of cyclin-CdK complex co-precipitated was the same in HDFs in $H_2O_2$-induced SIPS or not. We immunoprecipitated CDK2, 4, and 6 with antibodies unable to recognize the CdKs complexed with a CdKI. This was done in order to know whether cyclin D-CdK complexes are not bound to CdKI undergo changes in kinase activities independently of these CdKIs. We observed no decrease in CdK4 and 6 activities at 72 h after subcytotoxic $H_2O_2$ stress (Fig. 6). More interestingly, we found a sharp 3.3-fold decrease in the kinase activity of CdK2, suggesting an additional type of regulation to that achieved by the CdKIs.

## 4. Discussion

SIPS is characterized by many biomarkers of replicative senescence such as irreversible growth arrest. CdKI $p21^{Waf-1}$ is overexpressed in $H_2O_2$- and *t*-BHP-induced SIPS, likely explaining in part why Rb becomes hypophosphorylated (for reviews: [3,4,16]). In this work, we showed that the mRNA level, protein level and kinase activity of CdK2 are decreased at 72 h after subcytotoxic $H_2O_2$ stress. These results suggest that the hypophosphorylation of Rb is due in part to a decreased kinase activity of CdK2. This CdK2-mediated effect should be considered in addition to the inhibition of cyclin D-CdK4 and 6 complexes by $p21^{Waf-1}$.

Previous studies showed that TGF-β1 overexpression is responsible for the induction of several biomarkers of replicative senescence within 72 h after subcytotoxic $H_2O_2$ stress: senescence-like morphology, senescence-associated β-galactosidase activity and an increase in the mRNA steady-state level of four

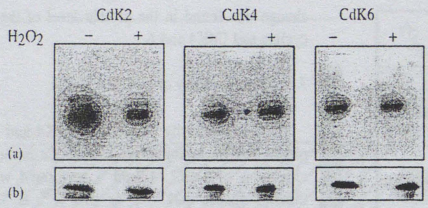



Fig. 6. Analysis of the kinase activity of CdK2, 4, and 6. (a) The CdKs were immunoprecipitated and their activity was estimated by kinase assays using a Rb N-terminal peptide. The bands correspond to the phosphorylated Rb N-terminal peptide after electrophoresis; (b) Western blot was used to check the protein amount of each sample.

senescence-associated genes [13]. TGF-β1 blocks the cell cycle of human myeloid leukemia cells in G1 and down-regulates the expression of CdK2, resulting in a sharp decrease of the total CdK2 kinase activity [17]. TGF-β1-induced cell cycle arrest of primary cultures of rat mesangial cells involves the inhibition of cyclin E-CdK2 activation and inhibition of Rb phosphorylation [18]. To be active, CdK2 must be complexed with a cyclin and must be phosphorylated. This phosphorylation is controlled by the cyclin-activating kinase (CAK) [19] and phosphatase type 2C [20]. Inactivation of cyclin E in human HepG2 hepatocellular carcinoma cells by TGF-β1 is due to inhibition of CdK2 activating kinase activity [21] and similar mechanisms could take place in $H_2O_2$-induced SIPS.

## Acknowledgements

C. Frippiat has a fellowship of the FRIA, Belgium. O. Toussaint is a Research Associate of the FNRS. We thank the European Fifth Framework Programme, Projects "Protage" (QLK6-CT-1999-02193) and "Functionage" (QLRT-2001-00310) and the Région Wallonne, DGTRE, Project "Modelage" which supported this work in part.

## References

[1] Q.M. Chen, C.J. Bartholomew, J. Campisi, M. Acosta, J.D. Reagan, B.N. Ames, Molecular analysis of $H_2O_2$-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication, Biochem. J. 332 (1998) 43–50.

[2] P. Dumont, M. Burton, Q.M. Chen, E.S. Gonos, C. Frippiat, J.-B. Mazarati, F. Eliaers, J. Remacle, O. Toussaint, Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblasts, Free Radic. Biol. Med. 28 (2000) 361–373.

[3] O. Toussaint, E. Medrano, T. Von Zglinicki, Stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes, Exp. Gerontol. 35 (2000) 927–945.

[4] O. Toussaint, P. Dumont, J. Remacle, J.-F. Dierick, T. Pascal, C. Frippiat, J.P. Magalhaes, S. Zdanov, F. Chainiaux, Stress-induced premature senescence or stress-induced senescence-like phenotype: one in vivo reality, two possible definitions? Sci. World J. 2 (2002) 230–247.

[5] Q. Chen, B.M. Ames, Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91 (1994) 4130–4134.

[6] C. Frippiat, Q.M. Chen, J. Remacle, O. Toussaint, Cell cycle regulation in $H_2O_2$-induced premature senescence of human diploid fibroblasts and regulatory control exerted by the papillomavirus E6 and E7 proteins, Exp. Gerontol. 35 (2000) 733–745.

[7] C. Frippiat, Q.M. Chen, S. Zdanov, J.P. Magalhaes, J. Remacle, O. Toussaint, Subcytotoxic $H_2O_2$-stress triggers a release of TGF-β1 which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts, J. Biol. Chem. 276 (2001) 2531–2537.

[8] M. Tommasino, L. Crawford, Human papillomavirus E6 and E7: proteins which deregulate the cell cycle, BioEssays 17 (1995) 509–518.

[9] B.A. Werness, A.J. Levinne, P.M. Howley, Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53, Science 248 (1990) 76–79.

[10] Q.M. Chen, V.C. Tu, J. Catania, M. Burton, O. Toussaint, T. Dilley, Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide, J. Cell Sci. 113 (2000) 4087–4097.

[11] Y. Chatani, S. Tanirumu, N. Miyoshi, A. Hattori, M. Sato, M. Kohno, Cell type-specific modulation of cell growth by transforming growth factor β1 does not correlate with mitogen-

activated protein kinase activation, J. Biol. Chem. 270 (1995) 30686–30692.

[12] F.C. Lucibello, A. Sewing, S. Brüsselbach, C. Bürger, R. Müller, Deregulation of cyclins D1 and E and suppression of cdk2 and cdk4 in senescent human fibroblasts, J. Cell Sci. 105 (1993) 123–133.

[13] A. Carnero, G.J. Hannon, The INK4 family of CDK inhibitors, in: R.W. Compans, M. Cooper, J.M. Hogle, H. Koprowski, M. Oldstone, M. Potter, P.K. Vogt (Eds.), Cyclin Dependent Kinase (CDK) Inhibitors, Springer, Berlin, 1998, pp. 43–56.

[14] T. Zarkowska, S. Mittnacht, Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases, J. Biol. Chem. 272 (1997) 12738–12746.

[15] S.P. Chellappan, A. Giordano, P.B. Fisher, Role of cyclin-dependent kinases and their inhibitors in cellular differentiation and development, in: R.W. Compans, M. Cooper, J.M. Hogle, H. Koprowski, M. Oldstone, M. Potter, P.K. Vogt (Eds.), Cyclin Dependent Kinase (CDK) Inhibitors, Springer, Berlin, 1998, pp. 57–103.

[16] C. Brack, G. Lithgow, H. Osiewacz, O. Toussaint, Molecular and cellular gerontology, EMBO J. 19 (2000) 1929–1934.

[17] X. Hu, X. Zhang, Q. Zhong, A.B. Fisher, M. Bryington, K.S. Zuckerman, Differential effects of transforming growth factor on cell cycle regulatory molecules in human myeloid leukemia cells, Oncogene 20 (2001) 6840–6850.

[18] H. Nagahara, S.A. Ezhevsky, A.M. Vocero-Akabani, P. Kaldis, M.J. Solomon, S.F. Dowdy, Transforming growth factor-β targeted inactivation of cyclin E-CdK2 complexes by inhibition of CdK2 activating kinase activity, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (1999) 14961–14966.

[19] M.J. Solomon, P. Kaldis, Regulation of CdKs by phosphorylation, in: M. Pagano (Eds.), Cell Cycle Control, Springer, Heidelberg, 1998, pp. 79–109.

[20] A. Cheng, K.E. Ross, P. Kaldis, M.J. Solomon, Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases, Genes Dev. 13 (1999) 2946–2957.

[21] H.O. Schoecklmann, H.D. Rupprecht, I. Zauner, R.B. Sterzel, TGF-β1-induced cell cycle arrest in renal mesengial cells involves inhibition of cyclin E-cdk2 activation and retinoblastoma protein phosphorylation, Kidney Int. 51 (1997) 1228–1236.

## Chapitre 2: Vieillissement prématuré et TGF-ß1.

Comme son nom l'indique, le Transforming Growth-Factor-ß 1 (TGF-ß1) a été découvert pour la première fois dans une tumeur. Son rôle de facteur de croissance a toujours été ambigu. En effet, selon le type cellulaire et la quantité de TGF-ß1 actif présent, il peut avoir un effet anti-prolifératif ou pro-prolifératif (Pour une revue:(Massagué, 1998)).

Dans le cadre de la sénescence induite prématurément par les stress, le TGF-ß1 nous a intéressé pour plusieurs raisons dont, premièrement, son effet anti-prolifératif (Garbi et al., 1990). Les études menées par Robson *et al.* sur des cellules épithéliales de prostate humaine montrent que le TGF-ß1 peut bloquer le cycle cellulaire en phase G1 (Robson et al., 1999) confirmant des études plus anciennes (Herrera et al., 1996). Cet arrêt se situerait plus précisément en G1 tardive près de la limite G1/S (Kletsas et al., 1995)). Deuxièmement, le TGF-ß1 peut induire une augmentation de la taille des cellules épithéliales de thyroïdes FRTL-5 telle que celle observée chez les cellules sénescentes (Garbi et al., 1990). Troisièmement, une stimulation de certains types cellulaires avec du TGF-ß1 entraîne la surexpression de l'ostéonectine, de SM22, de l'apolipoprotéine J et de la fibronectine (Hocevar et al., 1999; Owens, 1998; Shiba et al., 1998; Wegrowski et al., 1999). Ces surexpressions ont été mises en évidence dans différents modèles cellulaires humains tels que des cellules musculaire lisses pour SM22, des cellules épithéliales de thyroïdes pour l'apolipoprotéine J, des cellules pulpaires pour la fibronectine et l'ostéonectine. Rappelons que ces quatre gènes sont surexprimés lors de la sénescence réplicative et de la SIPS induite par $H_2O_2$ et par le t-BHP (Dumont et al., 2000c).

Quatrièmement, il a été démontré qu'une stimulation par du TGF-ß1 peut induire un raccourcissement télomérique chez les cellues A549 d'adénocarcinome humain. Ce raccourcissemnt serait dû à l'inhibition de la télomérase présente dans cette lignée cellulaire (Katakura et al., 1999).

Enfin, telles certaines cytokines pro-inflammatoires comme l' IL-1α, le TNF-α, et le TGF-ß1 peuvent induire une production transitoire d'espèces chimiques réactionnelles dérivées de l'oxygène moléculaire (Thannickal and Fanburg, 1995).

Toutes ces raisons nous ont poussé à étudier le rôle du TGF-ß1, en parallèle à l'action de Rb sur le blocage du cycle cellulaire en SIPS.

Herrera et al. ont mis en évidence que l'arrêt prolifératif induit, en conditions non-stressantes, par le TGF-ß1 est dépendant de Rb. En absence de Rb, le TGF-ß1 ne pouvait induire cet arrêt de croissance (Herrera et al., 1996). Il semblait donc qu'il puisse y avoir une relation entre le TGF-ß1 et Rb en SIPS. De plus, le promoteur du TGF-ß1 a été décrit comme pouvant être régulé par Rb via ATF-2 ou Sp1(Gaiser et al., 1993). Rb sous sa forme hypophosphorylée, comme c'est le cas en sénescence et en SIPS, peut lier et activer le facteur de transcription ATF-2. Ce facteur étant connu comme activant l'expression du TGF-ß1 et du TGF-ß2 (Hollingsworth et al., 1993;

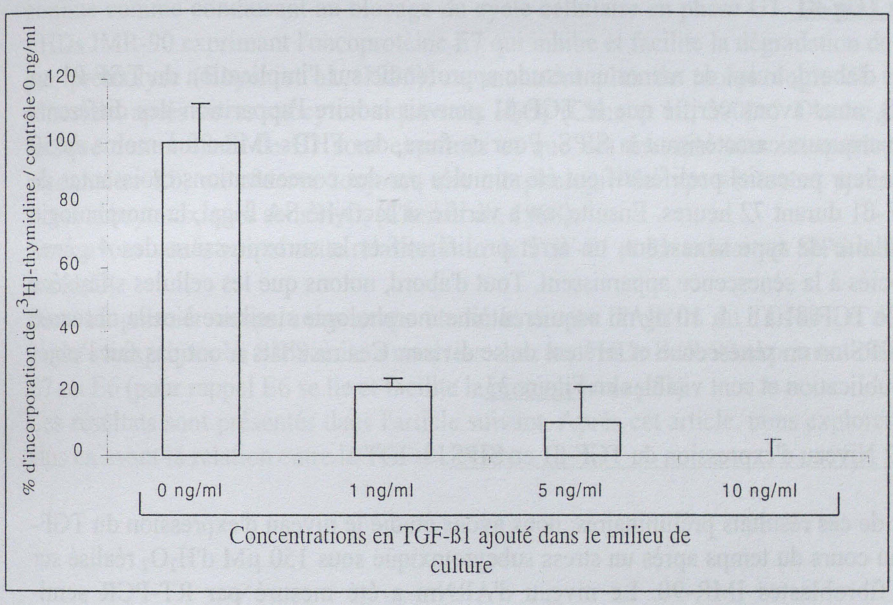



Fig. 33: Effet du TGF-ß1 sur la prolifération des FDHs IMR-90 et estimée par la méthode d'incorporation de [$^3$H]-thymidine. Les FDHs IMR-90 ont été stimulés 72 heures en présence de TGF-ß1 à 1, 5 ,10 ng/ml. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle.

Kim et al., 1992) ce qui renforce l'hypothèse du rôle du TGF-ß1 dans la SIPS induite par $H_2O_2$.

## 2.1 Article 3: Subcytotoxic $H_2O_2$ stress triggers a release of transforming growth factor-ß1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts (Journal of Biological Chemistry, Vol. 276, pp 2531-2537, 2001)

### 2.1.1 Apparition de différents biomarqueurs de la sénescence suite à une stimulation sous TGF-ß1.

Tout d'abord, avant de mener une étude approfondie sur l'implication du TGF-ß1 en SIPS, nous avons vérifié que le TGF-ß1 pouvait induire l'apparition des différents biomarqueurs caractérisant la SIPS. Pour ce faire, des FHDs IMR-90 à moins de 50 % de leur potentiel prolifératif ont été stimulés par des concentrations croissantes de TGF-ß1 durant 72 heures. Ensuite, on a vérifié si l'activité SA ß-gal, la morphologie cellulaire de type sénescent, un arrêt prolifératif et la surexpression des 4 gènes associés à la sénescence apparaissent. Tout d'abord, notons que les cellules stimulées par le TGF-ß1 à 1, 5, 10 ng/ml acquièrent une morphologie similaire à celle observée en SIPS ou en sénescence et arrêtent de se diviser. Ces résultats n'ont pas fait l'objet de publication et sont visibles en Figure 33.

### 2.1.2 Niveau d'expression du TGF-ß1 en SIPS.

Fort de ces résultats préliminaires, nous avons étudié le niveau d'expression du TGF-ß1 au cours du temps après un stress subcytotoxique sous 150 µM d'$H_2O_2$ réalisé sur des fibroblastes IMR-90. Le niveau d'ARNm a été mesuré par RT-PCR semi-quantitative.
Le TGF-ß1 dans le milieu de culture se trouve sous forme de molécules inactives et sous forme active. Pour passer de la forme inactive à la forme active, il faut une hydrolyse acide d'une partie de l'extrémité C-terminale du TGF-ß1. Nous avons donc mesuré par ELISA dans le milieu de culture la libération de TGF-ß1 actif.

### 2.1.3 Neutralisation du TGF-ß1 et apparition des différents biomarqueurs.

Que se passe-t-il si le TGF-ß1 libéré dans le milieu de culture est titré avant, pendant et après stress?
Pour répondre à cette question, nous avons utilisé des anticorps neutralisants ajoutés dans le milieu de culture cellulaire. Ces anticorps étaient dirigés soit contre le TGF-ß1 lui-même soit contre son récepteur de type II. Le second anticorps empêche l'hétérodimérisation du récepteur II avec le récepteur de type I, bloquant ainsi la transduction du signal déclenché par le TGF-ß1.

Nous avons étudié si ces anticorps bloquaient l'apparition des différents biomarqueurs d'intérêts (SA ß-gal, morphologie de type sénescente, surexpression de la fibronectine, l'ostéonectine, SM22 et l'apolipoprotéine J) apparaissant après stress sous $H_2O_2$.

2.1.4 Contrôle du niveau d'expression du TGF-ß1 par Rb.

On a montré une hypophosphorylation de la protéine Rb suite aux stress conduisant à la SIPS (Chen et al., 1998; Dumont et al., 2000c). Cette hypophosphorylation est connue comme conduisant au blocage du cycle cellulaire en phase G1. De plus, des FHDs IMR-90 exprimant l'oncoprotéine E7 qui inhibe et facilite la dégradation de Rb par protéolyse (Boyer et al., 1996), ne montrent plus de morphologie de type sénescent après stress subcytotoxique sous $H_2O_2$ (Chen et al., 2000a). D'autre part, lorsque des mutants de E7 sont exprimés et que ces mutants sont incapables de reconnaître Rb, on observe toujours une morphologie de type sénescent après les stress subcytotoxiques sous $H_2O_2$ (Chen et al., 1998).
Nous avons voulu voir si cette relation entre le TGF-ß1 et Rb existait en SIPS induite par $H_2O_2$.
Dans un premier temps, nous avons étudié le niveau d'ARNm du TGF-ß1 et des 4 gènes surexprimés en SIPS suite à un stress chez les FHDs IMR-90 exprimant ou non E7 ou E6 (pour rappel E6 se lie et facilite la protéolyse de p53).
Ces résultats sont présentés dans l'article suivant. Après cet article, nous explorerons plus en avant la relation entre le TGF-ß1 et Rb.

Article 3

# Subcytotoxic $H_2O_2$ Stress Triggers a Release of Transforming Growth Factor-β1, Which Induces Biomarkers of Cellular Senescence of Human Diploid Fibroblasts*

Received for publication, July 28, 2000, and in revised form, October 25, 2000
Published, JBC Papers in Press, November 1, 2000, DOI 10.1074/jbc.M006809200

**Christophe Frippiat‡§, Qin M. Chen¶, Stephanie Zdanov‡, Joao-Padro Magalhaes‡, Jose Remacle‡, and Olivier Toussaint‡‖**

*From the ‡University of Namur, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Department of Biology, Unit of Cellular Biochemistry & Biology, 61 Rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium and the ¶University of Arizona, Department of Pharmacology, Skagg Pharmaceutical Science Building, Tucson, Arizona 85721*

**Stress-induced premature senescence (SIPS) is induced 3 days after exposure of human diploid fibroblasts to subcytotoxic oxidative stress with $H_2O_2$, with appearance of several biomarkers of replicative senescence. In this work, we show that transforming growth factor-β1 (TGF-β1) regulates the induction of several of these biomarkers in SIPS: cellular morphology, senescence-associated β-galactosidase activity, increase in the steady-state level of fibronectin, apolipoprotein J, osteonectin, and SM22 mRNA. Indeed, the neutralization of TGF-β1 or its receptor (TGF-β RII) using specific antibodies decreases sharply the percentage of cells positive for the senescent-associated β-galactosidase activity and displaying a senescent morphology. In the presence of each of these antibodies, the steady-state level of fibronectin, osteonectin, apolipoprotein J, and SM22 mRNA is no more increased at 72 h after stress. Results obtained on fibroblasts retrovirally transfected with the human papillomavirus E7 cDNA suggest that retinoblastoma protein (Rb) regulates the expression of TGF-β1 in stressful conditions, leading to SIPS and overexpression of these four genes.**

Normal human diploid fibroblasts (HDFs)[1] exposed to various types of noncytotoxic oxidative stress display a senescent-like phenotype coined "stress-induced premature senescence" or SIPS (1, 2). Such stressful conditions include exposure to hydrogen peroxide (3, 4), *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP) (5), hyperoxia (6), UV light (7), and radioactivity (8). Many biomarkers of replicative senescence appear in SIPS: typical cell morphology (5), irreversible growth arrest, lack of response to mitogenic stimuli (4), sharp decrease of the DNA synthesis, and an increase in cells positive for the senescent-associated β-galactosidase activity (SA β-gal) (9). A long term overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor $p21^{waf-1}$ was observed in SIPS induced by $H_2O_2$ (10) or *t*-BHP (9). $p21^{waf-1}$ inhibits the cyclin D/cyclin-dependent kinase 4 and 6 complexes, leading to hypophosphorylation of the retinoblastoma protein (Rb). A long term hypophosphorylation of Rb over several weeks was indeed observed in SIPS induced by $H_2O_2$ or *t*-BHP, explaining the block of the cell cycle, through Rb-mediated inhibition of the $E_2F$ transcription factor (9, 10). Last, several genes overexpressed in senescent HDFs, such as fibronectin, osteonectin, SM22, and apolipoprotein J (clusterin), displayed a similar increase in mRNA level in SIPS induced by *t*-BHP or $H_2O_2$ (9).

In different experimental models, an overexpression of either SM22 (11), apolipoprotein J (12), osteonectin (13), or fibronectin (14) is induced by extracellular addition of transforming growth factor-β1 (TGF-β1). Moreover, incubation of HDFs with TGF-β1 triggers the appearance of a senescent-like morphology (15, 16) and growth arrest (17).

Two main arguments favor the hypothesis that oxidative stress-induced premature senescence could be triggered by a pRb-mediated TGF-β1 overexpression. First, it has been shown that ATF-2 transcription factor-hypophosphorylated Rb complexes transactivate the TGF-β promoter (18). Second Rb remains hypophosphorylated at least for several weeks after $H_2O_2$-induced SIPS (10).

Studies were performed with stable IMR-90 HDF transfectants expressing the E6 or E7 protein of the human papilloma virus 16, which namely, respectively, bind and facilitate the degradation of p53 and Rb. IMR-90 HDFs, whether wild types or expressing the E6 gene, developed a senescent morphology after subcytotoxic treatment under $H_2O_2$, while the cells expressing E7 gene did not. Furthermore, deletion of amino acids 21–24 as well as mutations at positions 24–26, which eliminated the binding of E7 to Rb (19), brought back the senescent morphology after $H_2O_2$ stress (10). Taken together, these first experiments suggested that Rb is necessary in the induction of SIPS.

These arguments led to the hypothesis that the E7-mediated disappearance of Rb makes impossible the formation of the ATF-2·Rb complexes, which in turn does not allow the stress-induced transcription of TGF-β1 and the subsequent overexpression of apolipoprotein J, osteonectin, fibronectin, and SM22 mRNA.

The aim of this work was first to test the involvement of TGF-β1 in the appearance of SIPS as far as changes in mor-

* This work was supported in part by the European Union Biomed and Health Research Program "Genage" (BMH4-CT98-3149) and Fifth Framework Program "Protage" (QLK6-CT-1999-02193). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Recipient of a fellowship from the Fonds pour la Recherche dans L'Industrie et L'Agriculture, Belgium.

‖ Research Associate of the Fonds National de la Recherche Scientifique. To whom correspondence should be addressed: University of Namur, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Dept. of Biology, Unit of Cellular Biochemistry & Biology, 61 Rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium. Tel.: 32-81-72-4132; Fax: 32-81-72-4135; E-mail: olivier. toussaint@fundp.ac.be.

[1] The abbreviations used are: HDF, human diploid fibroblast; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SIPS, stress-induced premature senescence; *t*-BHP, *tert*-butylhydroperoxide; SA, senescent-associated; β-gal, β-galactosidase; Rb, retinoblastoma protein; TGF-β1, transforming growth factor-β1; MEM, minimal essential medium; FBS, fetal bovine serum; FS, fibroblast skin; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

TABLE I
*Primers used for RT-PCR*

| Genes | Positions | Sequences |
|---|---|---|
| | *bp* | |
| Osteonectin | 181–199 | 5′-ctg tgg gag cta atc ctg-3′ |
| | 765–783 | 5′-ggg tgc tgg tcc agc tgg-3′ |
| Fibronectin | 360–378 | 5′-gat tgc ctg ttc tgc ttc-3′ |
| | 502–520 | 5′-ttg ggt gac ttt cct act-3′ |
| Apolipoprotein J | 69–87 | 5′-cgg ggt gaa aca gat aaa g-3′ |
| | 373–391 | 5′-tgc ggt cac cat tca tcc a-3′ |
| SM22 | 249–267 | 5′-tgg cgt gat tct gag caa-3′ |
| | 470–488 | 5′-ctg cca agc tgc cca agg-3′ |
| GAPDH | 333–353 | 5′-cgt ctt cac cat gga ga-3′ |
| | 612–622 | 5′-cgg cca tca cgc cca cag ttt-3′ |
| TGF-β1 | Catalog number 01923–42 (Biognostik, Götingen, Germany) | |

phology, SA β-gal, and mRNA level of these four genes are concerned. We tested whether these biomarkers appear after incubations of IMR-90 HDFs with TGF-β1. Then we tested whether TGF-β1 mediates the appearance of these biomarkers in SIPS.

Furthermore, we tested whether stable IMR-90 HDF transfectants expressing the E7 or E6 viral protein would overexpress TGF-β1 after stress. Last, if the E7- or E6-mediated inhibition of the stress-induced overexpression of TGF-β1 took place, we wished to test whether E7 or E6 would inhibit the stress-induced overexpression of fibronectin, osteonectin, apolipoprotein J, and SM22.

## MATERIALS AND METHODS

*Cell Culture*—Fetal lung IMR-90 HDFs (European Cell Culture Collection, Strasbourg, France) were grown in MEM + 10% (v/v) of fetal bovine serum (FBS). Human skin FS AG04437B HDFs (ATCC, Manassas, VA) were grown in Basal Medium of Eagle + 10% (v/v) of fetal bovine serum. Confluent IMR-90 HDFs under 45–50% of *in vitro* proliferative lifespan were exposed for 2 h to 150 μM $H_2O_2$ diluted in MEM + 10% FBS. FS AG04437B HDFs were exposed to several concentrations of $H_2O_2$ diluted in Basal Medium of Eagle + 10% FBS. The cells were, respectively, rinsed with MEM or Basal Medium of Eagle and given respective fresh medium + 10% FBS. TGF-β1 (R & D Systems) was diluted in culture medium plus serum to stimulate IMR-90 HDFs for 72 h.

*Neutralization of the TGF-β1 Receptor II and the TGF-β1 Itself*—TGF-β RII receptor of IMR-90 HDFs was neutralized using a specific antibody from R & D Systems (AF-241NA) diluted at 10 μg/ml of MEM + 10% FBS. The antibody against TGF-β1 (R & D Systems, MAB-240) was diluted at 3 μg/ml of MEM + 10% FBS. The medium containing the neutralization antibody was replaced every day for 3 days.

*Infection with Recombinant Human Papillomavirus E6 or E7 Retroviral Constructs*—The human papillomavirus type 16 E6 or E7 retrovirus producing cells were obtained from the ATCC (Manassas, VA). Exponentially growing IMR-90 HDFs (CPD 16.8) were infected for 4 h with retroviruses carrying PLXSN vector without insert (termed control PLXSN vector) or carrying human papillomavirus E6 or E7 in 6 ml of MEM containing 10% FBS and 4 μg/ml polybrene. The volume of medium was doubled for overnight incubation followed by medium change. The HDFs expressing the E6 or E7 gene were selected by exposure to 500 μg/ml of G418 (Life Technologies, Inc.).

*RNA Isolation and Semiquantitative RT-PCR*—Cells were harvested and pelleted. Total RNA was extracted using a total RNA isolation kit (PharMingen). Semiquantitative RT-PCRs were achieved in the exponential linear zone of amplification for each gene studied in one step with the Access RT-PCR kit (Promega) in presence of [α-$^{32}$P]dideoxycytosine (0.025 μCI per reaction). RT-PCRs were performed in the common exponential range of the PCR amplification using 50 and 100 ng of total RNA in 50 μl containing 5 units of avian myeloblastosis virus reverse transcripts and 5 units of *Pfu* polymerase.

We used GAPDH mRNA level as reference. GAPDH mRNA level was checked to be stable in all experimental conditions tested (specific primers for GAPDH and each gene tested in Table I). RT-PCR products were electrophoresed on a 5% (w/v) polyacrylamide gel and analyzed (Instant Imager, Packard Instrument Co.). The dried gels were exposed to β-max films (Amersham Pharmacia Biotech, Anvers, Belgium). Negative controls were performed without RNA. A PCR without reverse transcription was always performed on RNA, prior to reverse transcription, to check for DNA contamination. The sequences of the RT-PCR products were checked for amplification specificity. The results were expressed as mean value ± S.D. on three independent experiments.

*RNase Protection Assay*—RNase protection assays were performed following the instruction of the multi-probe hCK-3 (catalog number 45033P, PharMingen). The antisense probes were synthesized with bacteriophages T7 RNA polymerase in the presence of [α-$^{32}$P]UTP and purified by phenol-chloroform extraction. The probe set was hybridized in excess to specific target mRNAs in solution. Free probes and single-stranded RNA were digested by RNases. The remaining protected RNA/probes were resolved in denaturing polyacrylamide gels and quantified by Instant Imager (Packard Instrument Co.). The results were expressed as percentages of the corresponding values found in the non-stressed IMR-90 HDFs transfected with the control PLXSN without insert. The results of RNase protection assays are given as mean value ± S.D. on three independent experiments.

*Senescent-associated β-Galactosidase Activity*—The proportion of HDFs positive for the SA β-gal activity was determined as described by Dimri *et al.* (20). The cells were plated at a low density and fixed with 2% formaldehyde and 0.2% glutaraldehyde. The presence of the SA β-gal activity was determined by incubation with 1 mg/ml of solution of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside in 0.04 M citric acid/sodium, 0.005 M $K_3FeCN_6$, 0.005 M $K_4FeCN_6$, 0.15 M NaCl, 0.002 M $MgCl_2$ diluted in phosphate-buffered saline (pH 6). The cells were rinsed twice with phosphate-buffered saline and washed with methanol. The results were expressed as mean value ± S.D. on three independent experiments.

*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*—The active TGF-β1 present in the culture medium was quantified using the TGF-β1 Emax ImmunoAssay System of Promega (Madison, WI). For each sample the quantification was made twice. The results were expressed as mean value ± S.D. on three independent experiments.

*Analysis of the Rb Phosphorylation Status by Western Blot*—The cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed on ice with 700 μl of lysis buffer (25 mM HEPES, 0.3 M NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 20 mM β-glycerophosphate, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 10 μg/ml each aprotinin and leupeptin, 100 mM NaF, 1 mM $Na_3VO_4$, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). After lysis, the material was homogenized several times through a 21-gauge needle and centrifuged at 13,000 × *g* for 20 min at 4 °C. Samples of 20 μg of protein were electrophoresed on 7.5% SDS-polyacrylamide gels. The proteins were transferred overnight on Immobilone-P membrane (Millipore). Rb was detected with anti-Rb (c-15, Santa Cruz Biotechnology) antibody and thereafter with horseradish peroxidase-linked secondary antibody. The bands were visualized after incubation with chemoluminescent substrates using ECL detection kit (RPN 2106, Amersham Pharmacia Biotech, Anvers, Belgium).

## RESULTS

*SA β-Galactosidase Activity and mRNA Level of Four Senescence-associated Genes after Stimulation with TGF-β1*—IMR-90 HDFs were stimulated for 3 days with 1–10 ng/ml of human TGF-β1 diluted in culture medium + 10% FBS. The proportion of HDFs positive for the SA β-gal activity was determined in three independent experiments. A significant dose-dependent increase in the proportion of SA β-gal-positive HDFs was obtained, ranging from a 103 to a 160% increase, when the absolute value of 15% of SA β-gal-positive cells in controls cells was considered as 100%. In comparison, the proportion of SA β-gal-positive cells at 72 h after treatment with 150 μM $H_2O_2$ for 2 h reached an absolute value of 55% (Fig. 1).

Semiquantitative RT-PCR was used to determine the mRNA level of four genes that undergo a senescence-related overexpression: fibronectin, apolipoprotein J, SM22, and osteonectin. After 72 h of stimulation with 1–10 ng/ml TGF-β1, the steady-state level of mRNA of the four genes was found to be increased when compared with nontreated cells. A dose-dependent overexpression was obtained for fibronectin, osteonectin, and SM22. Two transcripts of fibronectin were detected and displayed a dose-dependent overexpression, reaching a 2.15-fold increase at 10 ng/ml TGF-β1. SM22 overexpression was maximum at 10 ng/ml TGF-β1, with a 2.30-fold increase in mRNA

level. Osteonectin was similarly overexpressed at the three TGF-β1 concentrations with an increase ranging from 1.48- to 1.70-fold. Apolipoprotein J was maximally overexpressed at 1 ng/ml TGF-β1, with a 1.90-fold increase and minimally overexpressed at 10 ng/ml TGF-β1 (Fig. 2).

These data suggest that TGF-β1 triggers the appearance of SA β-gal in IMR-90 HDFs as well as the overexpression of at least four genes that show a senescence-related overexpression. The next step was to know whether TGF-β1 is overexpressed during the establishment of $H_2O_2$-induced premature senescence.

*Expression of TGF-β1 in $H_2O_2$-induced Premature Senescence*—At first, semiquantitative RT-PCR was performed on mRNA extracted at 72 h after 2-h exposures of IMR-90 HDFs to 150 μM $H_2O_2$. When compared with nontreated cells, a 1.8-fold increase in the mRNA level of TGF-β1 was obtained (Fig. 3). RNase protection assay showed that TGF-β2 was not overexpressed at 72 h after stress. TGF-β3 mRNA was not detected by RNase protection assay in any condition. RNase protection assay also confirmed TGF-β1 overexpression (not shown). Similar experiments were performed on FS AG04437B HDFs exposed to four $H_2O_2$ concentrations ranging from 150 to 300 μM. Higher $H_2O_2$ concentrations were used, since cytotoxicity curves showed that FS AG04437B HDFs are much more resistant to $H_2O_2$ (not shown). The amount of TGF-β1 mRNA at 72 h after stress raised from 130% at 150 μM $H_2O_2$ to 190% at 300 μM in $H_2O_2$ when compared with the 100% control values (not shown). A second set of semiquantitative RT-PCR was performed on IMR-90 HDFs mRNA extracted from independent cultures at various times after exposures to $H_2O_2$. The mRNA steady-state level of TGF-β1 decreased during the first 4 h after stress and increased up to 140% at 24 h. The level of mRNA returned to the basal level at 36 h after stress and increased again to 150% at 48 h.

We used enzyme-linked immunosorbent assay to detect active TGF-β1 protein released in the culture medium during the 48 h following the stress. The level of TGF-β1 protein was also measured in non-$H_2O_2$-exposed control cells. At each time after the stress, the amount of active TGF-β1 released by the

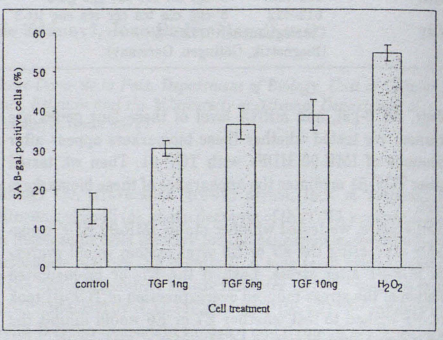
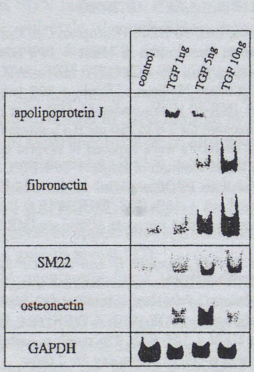



FIG. 1. **Percentage of IMR-90 HDFs positive for SA β-galactosidase activity after 3 days of stimulation with TGF-β1 at 1, 5, and 10 ng/ml.**



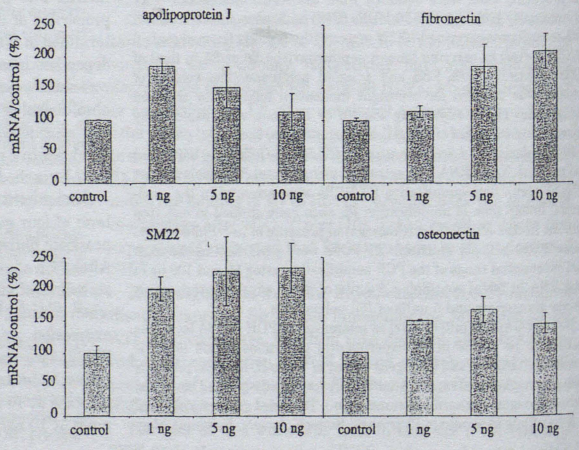
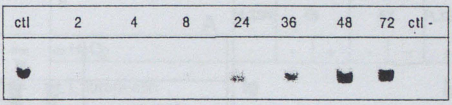




FIG. 2. **Steady-state level of fibronectin, apolipoprotein J, osteonectin, and SM22 mRNA after 3 days of stimulation of IMR-90 HDFs with TGF-β1 at 1, 5, and 10 ng/ml.** *Top panel*, autoradiography after migration of the products obtained by semiquantitative RT-PCR performed on fibronectin, osteonectin, apolipoprotein J, and SM22 mRNA with GAPDH mRNA as reference. *Bottom panel*, quantification performed at 72 h after the stress.



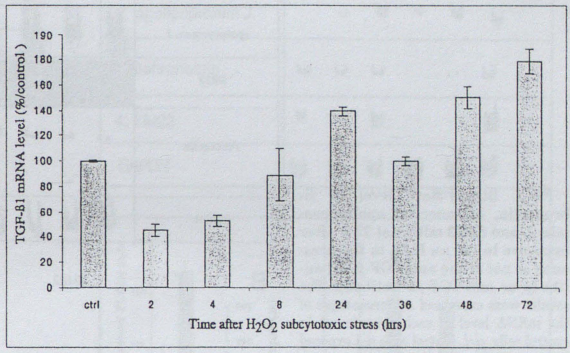




FIG. 3. **Steady-state level of the TGF-β1 mRNA at various times after exposure to 150 μM $H_2O_2$.** *Top panel*, autoradiography after migration of the products obtained by semiquantitative RT-PCR performed on TGF-β1 mRNA with GAPDH mRNA as reference. –, RT-PCR without RNA. *Bottom panel*, quantification performed at 72 h after the stress.

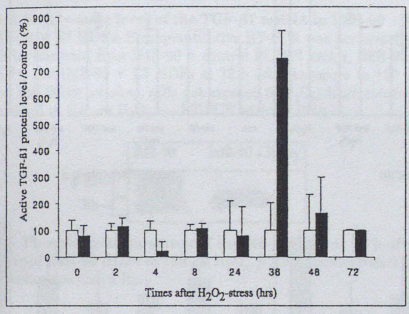



FIG. 4. **Quantification of the active TGF-β1 released in the culture medium after the $H_2O_2$ stress and in control cells.** The results are expressed as percentage of the amount of active TGF-β1 present in the control at each time after the stress.

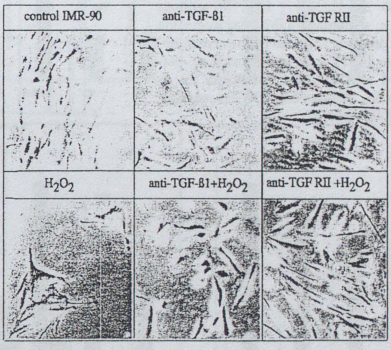



FIG. 5. **Effect of anti-TGF-β1 or anti-TGF-β receptor II antibody on the morphology of IMR-90 HDFs at 72 h after exposure to 150 μM $H_2O_2$ stress or not.**

stressed cells was expressed as percentage of the amount released by the control cells. Surprisingly, the level of released TGF-β1 underwent a 7.5-fold increase from 24 to 36 h after the stress (Fig. 4). This increase disappeared from 36 to 48 h after the stress. Given these spectacular results, we wished to neutralized the TGF-β receptor II (TGF-β RII) and TGF-β1 to know whether this would influence the appearance of the biomarkers of stress-induced premature senescence.

*Neutralization of TGF-β RII and TGF-β1*—IMR-90 HDFs were stressed with 150 μM $H_2O_2$ for 2 h. They were incubated with culture medium + 10% FBS + antibodies against either TGF-β1 (TGF-β1-Ab) or TGF-β R II (TGF-β RII-Ab). New culture medium + 10% FBS + 10 μg/ml TGF-β RII-Ab or 3 μg/ml TGF-β1 Ab was provided to the cells for three successive days after the stress.

The non-$H_2O_2$-exposed HDFs incubated with TGF-β1 RII-Ab or TGF-β1-Ab had a normal morphology. Senescent-like morphology was obtained at 72 h after $H_2O_2$ treatment as shown previously (4). No senescent-like morphology was obtained in the stressed HDFs incubated with anti-TGF-β II or TGF-β1-Abs for 3 days after the stress (Fig. 5).

We determined the percentage of HDFs positive for the SA β-gal activity in these different conditions. After incubation with TGF-β1- or TGF-β RII-Abs for 72 h, no significant modification of the percentage of SA β-gal-positive cells was observed in normal conditions when compared with control cells (no stress, no antibody).

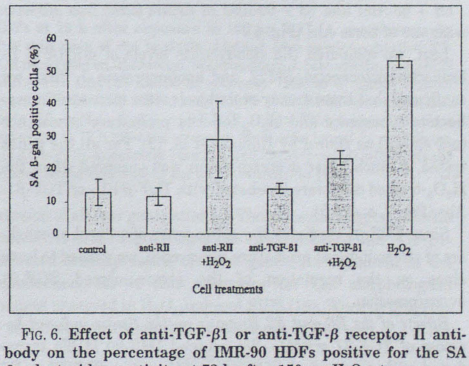



FIG. 6. **Effect of anti-TGF-β1 or anti-TGF-β receptor II antibody on the percentage of IMR-90 HDFs positive for the SA β-galactosidase activity at 72 h after 150 μM $H_2O_2$ stress.**

The cells incubated with anti-TGF-β1- or -TGF-β RII-Abs for 3 days after stress displayed a significantly decreased proportion of SA β-gal-positive cells in comparison with the $H_2O_2$-treated cells. Indeed, only a 2.40-fold and a 1.70-fold increase in the percentage of SA β-gal-positive cells was observed, respectively, in the HDFs incubated with anti-TGF-β RII- or anti-TGF-β1-Abs after stress, while a 4.40-fold increase was observed in the $H_2O_2$-treated HDFs, which were not incubated

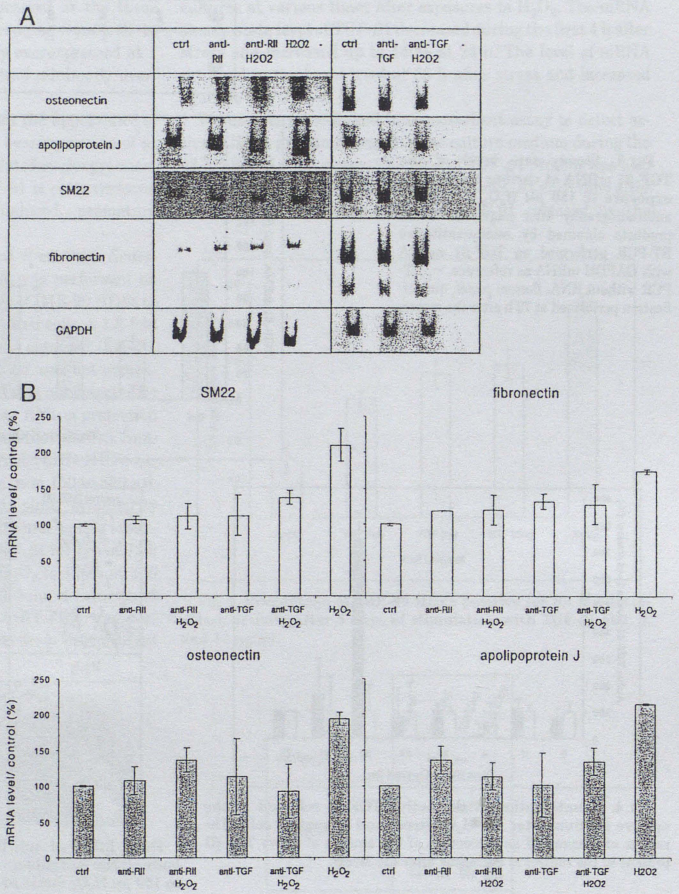



FIG. 7. **Steady-state level of fibronectin, osteonectin, apolipoprotein J, and SM22 mRNA at 72 h after exposure to 150 μM $H_2O_2$ in the presence or not of the anti-TGF-β RII antibody or anti-TGF-β1 antibody.** The results were expressed as percentages of the mRNA level of each gene found in control cells. *ctrl*, control cells not exposed to $H_2O_2$; $H_2O_2$, cells at 72 h after exposure to 150 μM $H_2O_2$; −, RT-PCR without RNA. *a*, autoradiography after migration of the products obtained by the semiquantitative RT-PCR. *b*, quantifications performed at 72 h after the stress for fibronectin, apolipoprotein J, osteonectin, and SM22 mRNA.

with one of these Abs (Fig. 6).

Last, we compared the steady-state levels of mRNA of fibronectin, osteonectin, SM22, and apolipoprotein J. First, we confirmed that these steady-state levels were increased in replicative senescence and $H_2O_2$-induced premature senescence (not shown) as shown by Dumont *et al.* (9). For all the genes tested, a much lower overexpression was observed when the $H_2O_2$-treated cells were incubated with TGF-β RII- or TGF-β1-Abs (Fig. 7, *a* and *b*).

Since TGF-β1 mediates the appearance of several biomarkers of stress-induced premature senescence, we wished to have clues on the regulation of the stress-induced TGF-β1 overexpression.

*Effects of the E6 and E7 Proteins on the Stress-induced Increase of TGF-β1 mRNA*—We exposed IMR-90 HDFs transfected with a retroviral PLXSN control vector, PLXSN + E6 cDNA or PLXSN + E7 cDNA, to 150 μM $H_2O_2$ for 2 h in three independent experiments. Total RNA was extracted at 72 h after the stress. At first, we have shown by Western blots (10) that IMR-90 HDFs transfected with E6 or E7 cDNA have a very low respective level in p53 and Rb proteins. Semiquantitative RT-PCR was performed using GAPDH as reference gene, whose transcription level was checked to be stable in IMR-90 HDFs transfected by E6, E7, exposed to $H_2O_2$ or not (not shown). A 1.55-fold increase in TGF-β1 mRNA level was shown at 72 h after the stress in HDFs transfected with a retroviral PLXSN control vector, as shown herein in nontransfected HDFs exposed to $H_2O_2$.

In normal conditions (no $H_2O_2$ treatment), the level of TGF-β1 mRNA raised by about 50% in IMR-90 HDFs transfected with E6 or E7. More interestingly, the TGF-β1 mRNA level of IMR-90 HDFs + E6 was much higher in $H_2O_2$-stressed cells when compared with nonstressed cells, while this level was not further increased in $H_2O_2$-stressed IMR-90 + E7 HDFs when compared with nonstressed IMR-90 + E7 HDFs (Fig. 8). Using enzyme-linked immunosorbent assay, we measured the release of active TGF-β1 at increasing times after treatment of IMR-90 + E7 HDFs with $H_2O_2$. No increased release of TGF-β1 level was observed in IMR-90 + E7 HDFs and in IMR-90 + E6 HDFs treated with $H_2O_2$ (data not shown). These results suggest that p53 and Rb are necessary for the stress-induced increase in the release of TGF-β1.

Moreover, Western blotting was carried out to analyze the phosphorylation status of Rb at 72 h after stress. Rb were found to be hypophosphorylated (Fig. 9), confirming the results obtained by Chen *et al.* (10) after $H_2O_2$ and by Dumont *et al.* (2000) after *tert*-butylhydroperoxide stress (9). Rb must be hypophosphorylated to interact with ATF-2 and transactivate the TGF-β promoter. Therefore our results suggest that hypophosphorylated Rb protein mediates the stress-induced overexpression of TGF-β1. Further experiments are being performed to confirm the role of Rb in this overexpression.

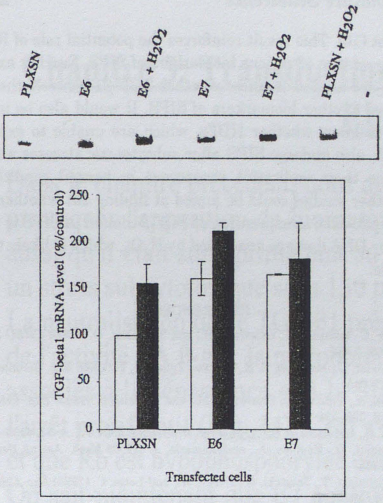



FIG. 8. **Steady-state level of the TGF-β1 mRNA in IMR-90 + E6 or IMR-90 + E7 HDFs.** Semiquantitative RT-PCR was performed on total RNA extracted from IMR-90 + control PLXSN vector, IMR-90 + E6 HDFs, and IMR-90 + E7 HDFs at 72 h after exposure to 150 μM $H_2O_2$ or not. *White columns*, cells not exposed to $H_2O_2$; *black columns*, cells exposed to 150 μM $H_2O_2$. −, RT-PCR without RNA.

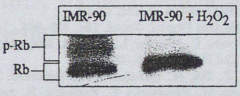



FIG. 9. **Phosphorylation status of the Rb protein at 72 h after exposure of IMR-90 HDFs to 150 μM $H_2O_2$.** *p-Rb*, phosphorylated Rb; *Rb*, hypophosphorylated Rb.

*Regulation of the Expression of Senescence-related Genes in $H_2O_2$-treated Cells*—According to the hypothesis mentioned in the introduction, an E7-mediated inhibition of the stress-induced overexpression of TGF-β1 should lead to an inhibition of the stress-induced overexpression of fibronectin, osteonectin, apolipoprotein J, and SM22. We performed semiquantitative RT-PCR to evaluate the mRNA level of these four genes. We exposed normal IMR-90 HDFs, IMR-90 + control PLXSN vector, IMR-90 + E6 HDFs, and IMR-90 + E7 HDFs to 150 μM $H_2O_2$ for 2 h and extracted total RNA at 72 h after the stress. The results of the quantifications were expressed as percentages of the value recorded for the nonstressed IMR-90 HDFs + control PLXSN vector. Similar results were obtained for normal IMR-90 HDFs transfected or not with control PLXSN vector.

We confirmed that all four genes were overexpressed at 72 h after $H_2O_2$ stress in IMR-90 cells as shown previously (9). The stress-induced overexpression of osteonectin and apolipoprotein J observed in the normal HDFs disappeared in IMR-90 + E7 HDFs. The stress-induced overexpression of SM22 was highly decreased, by more than 60%, in $H_2O_2$-treated IMR-90 + E7 HDFs when compared with the $H_2O_2$-treated IMR-90 HDFs transfected or not with control PLXSN vector. In IMR-90 + E7 HDFs, a 2-fold reduction in fibronectin mRNA level was found in the nontreated cells. No stress-induced overexpression of fibronectin was found in these cells (Fig. 10 *a* and *b*).

When IMR-90 + E6 cells were stressed with $H_2O_2$, the overexpression of osteonectin disappeared. E6 caused a marked down-regulation of the mRNA of fibronectin in nonstressful conditions.

These data show that E7 regulates the stress-induced expression of all four genes studied. These results suggest that Rb is involved in the regulation of the stress-induced and TGF-β1-mediated overexpression of these genes. As explained in the introduction, Rb is also necessary for the morphological changes observed in $H_2O_2$-induced SIPS (10). Work in progress is aimed at confirming this involvement of Rb.

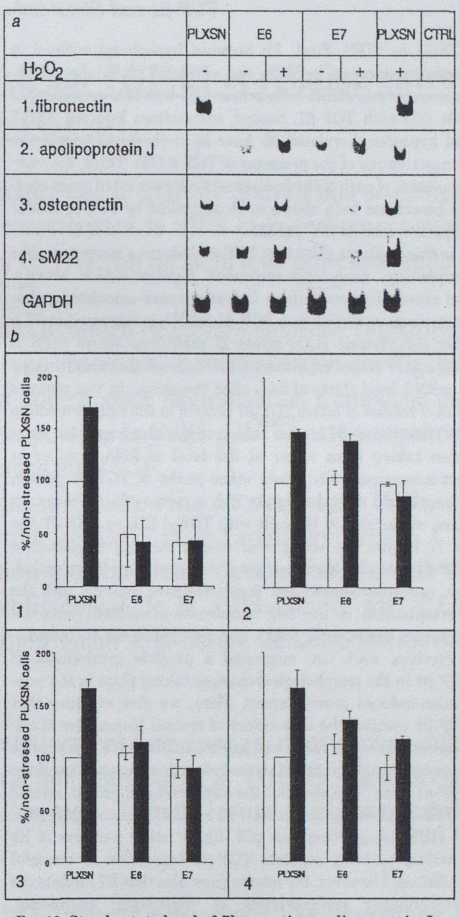



FIG. 10. **Steady-state level of fibronectin, apolipoprotein J, osteonectin, and SM22 mRNA in IMR-90 + E7 and IMR-90 + E6 HDFs at 72 h after exposure to 150 μM $H_2O_2$.** *a*, autoradiography after migration of the products obtained after semiquantitative RT-PCR performed on fibronectin, apolipoprotein J, osteonectin, and SM22 mRNA with GAPDH mRNA as reference. IMR-90 + control PLXSN vector, IMR-90 + E6 HDFs, and IMR-90 + E7 HDFs were exposed or not to 150 μM $H_2O_2$ for 2 h. −, RT-PCR without RNA. *b*, quantifications performed at 72 h after the stress for fibronectin (*panel 1*), apolipoprotein J (*panel 2*), osteonectin (*panel 3*), and SM22 (*panel 4*) mRNA of cells exposed (*black columns*) or not (*gray columns*) to $H_2O_2$.

## DISCUSSION

The concept of SIPS is widely accepted (1). However, the mechanisms responsible for its occurrence remain poorly understood.

Many biomarkers of replicative senescence have been shown to be induced in SIPS (9). A typical morphology, senescence-associated β-galactosidase activity and overexpression of fibronectin, osteonectin, SM22, and apolipoprotein J are among these biomarkers.

Several observations were in favor of the involvement of

TGF-β1 in SIPS. First, Rb becomes hypophosphorylated in normal senescence, in SIPS, and also after stimulation of human monocytic JOSK-1 leukemia cells line (21) or mesengial cells (22) with TGF-β1. Second, interactions between ATF-2 and hypophosphorylated Rb have been shown to trigger the transactivation of the promoter of TGF-β (18). Third, the overexpression of each of the four senescence-associated genes studied herein has been shown to be controlled by TGF-β, in four respective models (11–14, 23).

In this work, we show that TGF-β1 induces a senescence-like morphology, senescence-associated β-galactosidase activity, and overexpression of these four senescence-associated genes. Then we have shown that TGF-β1 mRNA is increased at 72 h after subcytotoxic $H_2O_2$ stress in conditions where SIPS is triggered. Further experiments have shown that this increase in mRNA level starts at 24 h after the stress. In this study, a peak of release of active TGF-β1 protein in the culture medium was observed at 36 h after stress, suggesting a complex regulation taking place either at the level of RNA stability or post-transcriptionally. Since other peaks of TGF-β1 protein release might exist during the 72 h necessary for SIPS to take place, we incubated the cells with TGF-β RII- or TGF-β1-Abs for 72 h after the stress. Our results strongly suggest that TGF-β1 mediates the induction of the senescence-like morphology, senescence-associated β-galactosidase activity, and the overexpression of the four senescence-associated genes (fibronectin, osteonectin, SM22, and apolipoprotein J) studied.

Previous work (24) suggested a possible involvement of TGF-β1 in the morphological changes taking place in the γ-radiation-induced growth arrest. Here, we give evidence that TGF-β1 controls the appearance of several biomarkers of cellular senescence in conditions leading to SIPS. We also provide clues for the mechanism of stress-induced overexpression of the TGF-β1 gene. We show that the stress-induced protein release of TGF-β1 disappeared in IMR-90 + E6 HDFs and IMR-90 + E7 HDFs, suggesting that p53, Rb, or other partners of Rb signaling pathway regulate TGF-β1 expression in stressful conditions. Moreover, the results show also that E7 inhibits the stress-induced overexpression of fibronectin, osteonectin, SM22, and apolipoprotein J and therefore reinforce the notion that Rb might control the overexpression of these senescence-associated genes through TGF-β1 overexpression. Further experiments are necessary to confirm this likely role of Rb in the overexpression of TGF-β1 in conditions leading to SIPS.

Nevertheless, it has been shown, in the same experimental system, that deletion of amino acids 21–24 of E7 cDNA, as well as mutations at positions 24–26, which eliminate the binding of E7 to Rb, allow the appearance of SIPS, while wild type E7 does not (10). This result reinforces the potential role of Rb in the appearance of various biomarkers of SIPS. Further experiments are needed to know whether TGF-β1 controls the appearance of other biomarkers of SIPS. It would also be interesting to know whether HDFs, which are unable to express TGF-β1, also undergo SIPS after subcytotoxic stresses and/or postpone their replicative senescence in normal conditions. Last, other studies could be aimed at finding out whether the stress-induced overexpression of TGF-β1 found in SIPS is triggered by DNA damage generated by $H_2O_2$, which is likely to be the case.

REFERENCES


1. Brack, C., Lithgow, G., Osiewacz, H., and Toussaint, O. (2000) *EMBO J.* **19**, 1929–1934
2. Toussaint, O., Medrano, E. E., and von Zglinicki, T. (2000) *Exp. Gerontol.* **35**, 927–945
3. Mocali, A., Caldini, R., Chevanne, M., and Paoletti, F. (1995) *Exp. Cell Res.* **216**, 388–395
4. Chen, Q., and Ames, B. M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4130–4134
5. Toussaint, O., Houbion, A., and Remacle, J. (1992) *Mech. Ageing Dev.* **65**, 65–83
6. von Zglinicki, T., Saretzki, G., Döcke, W., and Lotze, C. (1995) *Exp. Cell Res.* **220**, 186–193
7. Bayreuther, K., Rodemann, H. P., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M., and Francz, P. I. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 5112–5116
8. Bumann, J., Santo-Holtje, L., Loffler, H., Bamberg, M., and Rodemann, H. P. (1995) *Strahlenther. Onkol.* **171**, 35–41
9. Dumont, P., Burton, M., Chen, Q. M., Gonos, E. S., Frippiat, C., Mazarati, J.-B., Eliaers, F., Remacle, J., and Toussaint, O. (2000) *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 361–373
10. Chen, Q. M., Bartholomew, C. J., Campisi, J., Acosta, M., Reagan, J. D., and Ames, B. N. (1998) *Biochem. J.* **332**, 43–50
11. Owens, G. K. (1998) *Acta Physiol. Scand.* **164**, 623–635
12. Wegrowski, Y., Perreau, C., Martiny, L., Haye, B., Maquart, F. X., and Bellon, G. (1999) *Exp. Cell Res.* **247**, 475–483
13. Shiba, H., Fujita, T., Doi, N., Nakamura, S., Nakanishi, K., Takemoto, T., Hino, T., Noshiro, M., Kawamoto, T., Kurihara, H., and Kato, Y. (1998) *J. Cell. Physiol.* **174**, 194–208
14. Hocevar, B. A., Brown, T. L., and Howe, P. H. (1999) *EMBO J.* **18**, 1345–1356
15. Garbi, C., Colletta, G., Cirafici, A. M., Marchisio, P. C., and Nitsh, L. (1990) *Eur. J. Cell Biol.* **53**, 281–289
16. Katakura, Y., Nakata, E., Miura, T., and Shirata, S. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 110–115
17. Herrera, R. E., Mäkelä, T. P., and Weinberg, R. A. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **7**, 1335–1342
18. Kim, S.-J., Wagner, S., Liu, F., O'Reilly, M. A., Robbins, P. D., and Green, M. (1992) *Nature* **358**, 331–334
19. Demers, G. W., Espling, E., Harry, J. B., Etscheid, B. G., and Galloway, D. A. (1996) *J. Virol.* **70**, 6862–6869
20. Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelly, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubeli, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M., and Campisi, J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9363–9367
21. Furukawa, Y., Uenoyama, S., Tsunoda, A., Griffin, J. D., and Saito, M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 17121–17127
22. Schoecklmann, H. O., Rupprecht, H. D., Zauner, I., and Sterzel, R. B. (1997) *Kidney Int.* **51**, 1228–1236
23. Reed, M. J., Vernon, R. B., Abrass, I. B., and Sage, E. H. (1994) *J. Cell. Physiol.* **158**, 169–179
24. Rodemann, H. P., Binder, A., Güven, N., Löffler, H., and Bamberg, M. (1996) *Kidney Int.* **49**, S32–S36

# Chapitre 3: Transduction du signal TGF-ß1 et relation entre Rb et le TGF-ß1.

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que le TGF-ß1 pouvait non seulement provoquer l'apparition de biomarqueurs caractérisant la SIPS et la sénescence mais aussi qu'il était surexprimé tant au niveau de l'ARNm qu'au niveau protéique suite à un stress subcytotoxique sous 150 µM d'$H_2O_2$.
La neutralisation de ce TGF-ß1 présent dans le milieu de culture empêche l'apparition de l'activité SA ß-gal, la morphologie de type sénescent, la surexpression des 4 gènes associés à la sénescence et à la SIPS. Par contre, cette neutralisation n'empêche pas l'arrêt prolifératif (Fig. 34). Ceci s'explique puisque la CdKI $p21^{Waf-1}$ est surexprimée et que Rb est hypophosphorylée emprisonnant ainsi E2F.
On sait maintenant que E7 contrôle la surexpression, suite au stress sous $H_2O_2$, du TGF-ß1, de la fibronectine, de l'ostéonectine, de SM22 et de l'apolipoprotéine J. Ces résultats suggèrent qu'il existe une relation plus ou moins directe entre la voie du TGF-ß1 et la voie de Rb, lors de l'établissement de la SIPS induite par $H_2O_2$. Toutefois, ils ne donnent aucune indication quant à la nature de cette interaction potentielle.

Les composants de la voie de Rb étant relativement bien connus, nous avons voulu, avant de nous attaquer à la possible interaction entre Rb et le TGF-ß1, identifier au moins une des voies potentiellement activées par le TGF-ß1 lors de l'établissement de la SIPS.

## 3.1 Article 4: Signal transduction in $H_2O_2$-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts (en révision).

### 3.1.1 Identification de la voie de transduction du signal TGF-ß1.

Rappelons tout d'abord brièvement les voies de transduction déclenchées par le TGF-ß1.
Le TGF-ß1 comme tous les membres de sa sous-famille transmettent leurs signaux à travers la membrane plasmique via un complexe hétérodimèrique constitué des récepteurs sérine/thréonine kinase de type I et de type II.
Suite à la fixation du TGF-ß1, le récepteur de type II phosphoryle le récepteur de type I et active ce dernier. Le signal intracellulaire induit par ce complexe est transmis par la famille des Smads. A ce jour, 8 Smads ont été identifiées et chacune d'elles à un rôle différent dans la transduction de signal.
Dans le cas du TGF-ß1, Smad 2 et 3 s'associent au récepteur de type I qui les phosphoryle. Une fois phosphorylées, Smad 2 et 3 peuvent se lier à la protéine Smad 4. Le complexe ainsi formé peut pénétrer à l'intérieur du noyau où il active soit

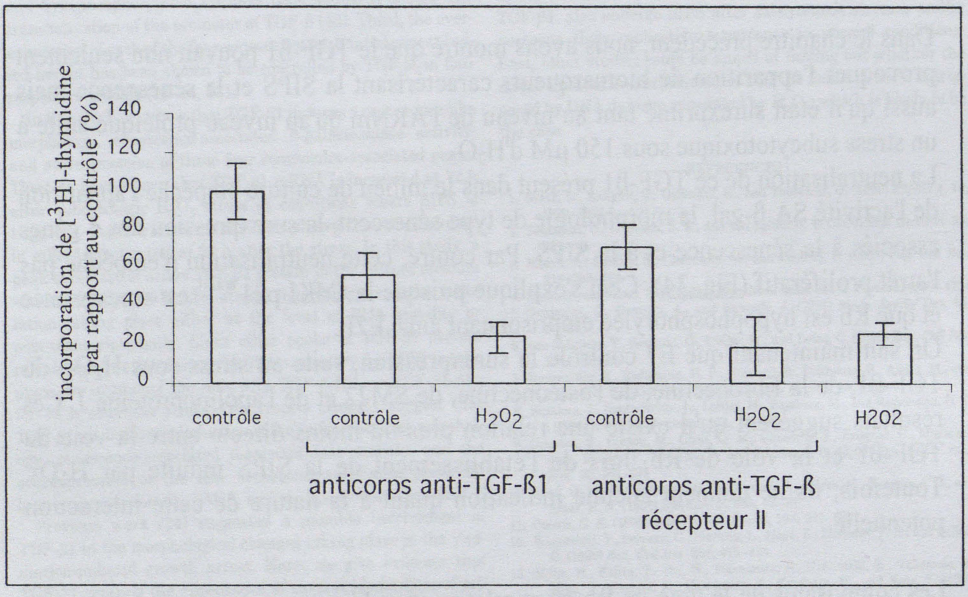



Fig. 34: Effet des anticorps neutralisant la voie du TGF-ß1 sur la prolifération des FDHs IMR-90 et estimée par la méthode d'incorporation de [$^3$H]-thymidine. Les FDHs IMR-90 stressés ou non ont été incubés 72 heures en présence soit d' anticorps anti-TGF-ß1 (3 µg/ml) soit en présence d'anticorps anti-TGF-ß récepteur II (10 µg/ml). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle.

directement la transcription de gènes cibles spécifiques, soit indirectement en coopérant avec d'autres facteurs de transcription (Attisano and Lee-Hoeflich, 2001).
Un des facteurs de transcription sur lequel vient se fixer le complexe Smad est ATF-2. Selon Hanafusa *et al.*, ATF-2 serait indirectement transactivé par le TGF-ß1 via la voie des Tak1. En effet, une fois Tak1 activé, il phosphoryle la protéine activatrice de p38 $^{MAPK}$, MKK6. Le complexe formé pénètre alors à l'intérieur du noyau où il active ATF-2 en le phosphorylant (Hanafusa et al., 1999).
$H_2O_2$ est connu pour activer la voie de p38 $^{MAPK}$ (Guyton et al., 1996; Wang et al., 1998a). Nous nous sommes donc logiquement tournés vers la voie de p38 $^{MAPK}$. Nous avons tout d'abord étudié la phosphorylation de p38 $^{MAPK}$ à différents temps après stress subcytotoxique sous $H_2O_2$ en présence ou non d'anticorps neutralisant le TGF-ß1.
Nous avons aussi étudié l'apparition des différents biomarqueurs d'intérêts après un stress sous $H_2O_2$ en présence d'un inhibiteur spécifique de p38 $^{MAPK}$. Cet inhibiteur, le SB203580 est un dérivé de pyridinyl imidazole qui se fixe dans le site de phosphorylation de p38 $^{MAPK}$ empêchant sa phosphorylation par MKK6 (Young et al., 1997).

### 3.1.2 Implication du facteur de transcription ATF-2 en SIPS.

p38$^{MAPK}$ peut activer le facteur de transcription ATF-2, lorqu'elle est activée par la voie du TGF-ß1.
Nous avons donc voulu savoir si une activation de ce facteur de transcription était bien à la base de l'apparition des différents biomarqueurs que nous avons utilisés comme outils jusqu'à présent.
L'activité d'ATF-2 étant dépendante de sa phosphorylation, la forme phosphorylée d'ATF-2 a été détectée par Western Blot en présence ou non de SB203580 ou d'oligonucléotide antisens après un stress subcytotoxique sous $H_2O_2$.
Des oligonucléotides antisens anti-ATF-2 ont été utilisés pour bloquer l'apparition des biomarqueurs de la sénescence en SIPS. Nous avons aussi étudié la liaison d'ATF-2 à sa séquence consensus.

### 3.1.3 Interaction physique entre ATF-2 et Rb.

Hollingworth *et al.*, ont montré que le facteur de transcription ATF-2 pouvait se lier à Rb. Cette association avec Rb active ATF-2 alors qu'une association de Rb à E2F inhibe ce dernier (Hollingsworth et al., 1993). Nous avons donc réalisé des coimmunoprécipitations pour pouvoir détecter un éventuel complexe Rb/ATF-2 formé lors de l'établissemnt de la SIPS.
E2F étant considéré comme la cible majeure de Rb (Nevins, 1992; Weinberg, 1996), nous nous sommes aussi intéressés à ce facteur de transcription.

# Article 4:

ELSEVIER

Free Radical Biology & Medicine, Vol. 33, No. •, pp. 000, 2002
Copyright © 2002 Elsevier Science Inc.
Printed in the USA. All rights reserved
0891-5849/02/$–see front matter

PII S0891-5849(02)01044-4

*Original Contribution*

## SIGNAL TRANSDUCTION IN $H_2O_2$-INDUCED SENESCENCE-LIKE PHENOTYPE IN HUMAN DIPLOID FIBROBLASTS

CHRISTOPHE FRIPPIAT, JANIQUE DEWELLE, JOSÉ REMACLE, and OLIVIER TOUSSAINT

Research Unit of Cellular Biology, University of Namur, Namur, Belgium

(*Received* 21 *February* 2002; *Revised* 8 *July* 2002; *Accepted* 25 *July* 2002)

**Abstract**—A stress-induced senescence-like phenotype is induced by exposure of human diploid fibroblasts to subcytotoxic $H_2O_2$ stress. Previous studies showed that TGF-β1 is responsible for the induction of several biomarkers of replicative senescence within 72 h after stress: senescence-like morphology, senescence-associated β-galactosidase activity, and an increase in the mRNA steady state level of four senescence-associated genes. Other studies showed that the retinoblastoma protein is responsible for the appearance of these biomarkers in the same conditions. Here we show that sustained $p38^{MAPK}$ phosphorylation is responsible for both $H_2O_2$-induced overexpression of TGF-β1 and subsequent TGF-β1-induced appearance of these biomarkers. $p38^{MAPK}$ phosphorylation is shown to be necessary for a self-sustained TGF-β1 overexpression after $H_2O_2$ stress through the activation of ATF-2 transcription factor, thereby creating a regulatory loop between sustained $p38^{MAPK}$ activation and sustained TGF-β1 overexpression after stress. $p38^{MAPK}$ activation is also shown to be responsible in part for the growth arrest observed in stress-induced senescence-like phenotype. At 48 h after stress, ATF-2 starts to interact with hypophosphorylated Rb, which allows the biomarkers of stress-induced senescence-like phenotype to appear. This report gives an overall explanation of how a senescence-like phenotype is established after subcytotoxic $H_2O_2$ stress. © 2002 Elsevier Science Inc.

**Keywords**—Stress-induced senescence-like phenotype, $p38^{MAPK}$, Apolipoprotein J, Oxidative stress, TGF-β1, ATF-2, Rb, Free radicals

### INTRODUCTION

Normal human diploid fibroblasts (HDFs) exposed to various types of subcytotoxic oxidative stress display a senescence-like phenotype [1–9]. Some of the many biomarkers of replicative senescence that appear in these conditions are: senescence-like cell morphology [5], lack of response to mitogenic stimuli and irreversible growth arrest [4], sharp decrease of DNA synthesis, and an increase in the proportion of cells positive for senescence-associated β-galactosidase activity (SA β-gal) [6]. A sustained overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor $p21^{waf-1}$ is observed after subcytotoxic $H_2O_2$ or *tert*-butylhydroperoxide (t-BHP) stress. $p21^{waf-1}$ inhibits the activity of the cyclin D/cyclin-dependent kinase 4 and 6 complexes, leading to hypophosphorylation of the retinoblastoma protein (Rb) [10,11].

Address correspondence to: Dr. Olivier Toussaint, University of Namur-FUNDP, Research Unit of Cellular Biology, 61 Rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium; Tel: +32 81 72 4132; Fax: +32 81 72 4135; E-Mail: olivier.toussaint@fundp.ac.be.

Stable transfection of human papillomavirus type-16 E7 cDNA was used for probing the role of Rb in growth arrest. HPV E7 protein binds Rb and Rb-related proteins and facilitates their degradation by ubiquitin-dependent proteolysis [12,13] in our experimental conditions [10]. After subcytotoxic $H_2O_2$ treatment, wild-type IMR-90 HDFs develop a senescent morphology and an increase of cell surface and volume whereas IMR-90 HDFs expressing E7 gene do not [10,14]. Deletion of amino acids 21 to 24 or mutations at positions 24 or 26 eliminate the pRb-binding activity of E7 [15] and bring back these senescent features after $H_2O_2$ treatment.

Transforming growth factor-β1 (TGF-β1) is overexpressed after subcytotoxic $H_2O_2$ stress. Incubating IMR-90 HDFs with antibodies against TGF-β1 receptor II (RII) or against TGF-β1 for 72 h after stress prevents the appearance of SA β-gal, senescence-like morphology and overexpression of fibronectin, osteonectin, apo J, and SM22 [16].

How is TGF-β1 overexpression induced in this system? How does TGF-β1 trigger the appearance of the

senescence-associated biomarkers? How does TGF-β1 pathway interact with Rb pathway? The aim of this study was to tackle these questions and establish a molecular mechanism of appearance of $H_2O_2$-induced senescence-like phenotype.

## MATERIALS AND METHODS

### *Cell culture and semiquantitative RT-PCR*

Fetal lung IMR-90 HDFs (ECACC, France) were grown in MEM medium (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) + 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS). Confluent IMR-90 HDFs at 45–50% of in vitro proliferative life span were exposed for 2 h to 150 μM $H_2O_2$ (Merck, Darmstadt, Germany) diluted in MEM + 10% FBS, which represents subcytotoxic conditions [16]. The cells were rinsed with MEM and given fresh MEM + 10% FBS. Human TGF-β1 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) was diluted in MEM + 10% FBS for 72 h. TGF-β1 was neutralized using a specific antibody from R&D Systems Inc. (MAB-240) diluted at 3 μg/ml of MEM + 10% FBS. New medium plus neutralization antibody was provided at 12 h before $H_2O_2$ stress, during stress, and for 72 h after stress, with new antibody provided every 24 h [16]. $p38^{MAPK}$ was inhibited by SB203580 hydrochloride (Merck) added to the medium at 10 or 25 μM. In all conditions tested, SB203580 was added to MEM + 10% FBS at 12 h before $H_2O_2$ stress, during stress, and for 72 h after stress with new inhibitor provided every 24 h. Anti-ATF-2 and anti-$p38^{MAPK}$ antisense oligonucleotides (Biognostik GmbH, Göttingen, Germany) were added at 10 μM to the medium 2 d before stress, during stress, and for 3 d after stress.

Semiquantitative RT-PCRs were achieved on total RNA in the exponential zone of amplification for each gene in one step with the Access RT-PCR kit (Promega, Madison, WI, USA) in the presence of [α-$^{32}$P] dCTP (sequence of the primers used and the RT-PCR conditions in [16]).

### *SA β-gal activity and estimation of proliferative capability*

The proportion of SA β-gal positive HDFs was determined in nonconfluent cells as described earlier [17]. The results were expressed as mean values ± SD on 400 cells in three independent experiments. The proliferative potential of the HDFs was estimated by measuring the incorporation of [$^3$H]-thymidine into DNA of 5500 HDFs per cm$^2$, as described previously [6].

### *$p38^{MAPK}$, ATF-2, and Rb phosphorylation level*

The cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed on ice (lysis buffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.1 SDS, 10% (V/V) glycerol, 1% (v/w) bromophenol blue, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). The cell lysates were sonicated on ice and electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gels. After transfer, the membranes were probed with antiphosphorylated $p38^{MAPK}$ (n°9211, New England Biolabs, Beverly, MA, USA); anti-$p38^{MAPK}$ (n°9212, New England Biolabs), Phosphoplus ATF-2 kit (n°9220, New England Biolabs), or Phosphoplus Rb kit (n°9300, antibodies, New England Biolabs); and, a horseradish peroxidase-linked secondary antibody (Amersham Life Science, UK). The bands were visualized after incubation with chemiluminescent substrates (ECL detection kit RPN 2106, Amersham Life Science). $p38^{MAPK}$ phosphorylation level was determined by integration of the optical density (Image Master V3.0 software, Amersham Life Science). The membranes were also probed with antitubulin α antibody (n°H-300, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) to check protein loading and normalize the results.

### *Coimmunoprecipitation of Rb*

After cells lysis in RIPA buffer, the lysates were incubated overnight at 4°C with ATF-2 antibodies (n°9222, New England Biolabs). A/G sepharose beads were incubated with lysates for 2 h with gentle shaking. The beads were pelleted and rinsed 3 times in RIPA buffer. The pellets were resuspended in 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.1 SDS, 10% (V/V) glycerol, and 1% (v/w) bromophenol blue. Rb was detected by Western blot using anti-Rb antibodies (sc-50, Santa Cruz Biotechnology).

### *DNA binding assay*

The binding activity of ATF-2 and c-Fos transcription factors was assayed (Mercury Transfactor Profiling Kit Inflammation 1, K2062-1, Clontech, Palo Alto, CA, USA). Nuclear proteins were extracted according to the manufacturer's instructions. The extracts were transferred into a 96-well plate coated with the consensus sequence of ATF-2. Anti-ATF-2, anti-c-Fos antibodies, and secondary antibodies were provided with the kit.

### *E2F1 dominant negative*

pMV-7 $E_2F_1$d87 vector expressing a truncated form of tagged $E_2F_1$ and a neomycine resistance gene were gifts of Dr. Hall (Jefferson University, Philadelphia, PA, USA). Cells were plated at half confluency in 25 cm$^2$ culture dishes (Corning, Corning, NY, USA). At 24 h later, the cells were transfected with 7 μg of the indicated vectors with 30 μg/ml DOTAP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). The cells were incubated in the DNA/DOTAP/MEM mix for 6 h. The cells were given

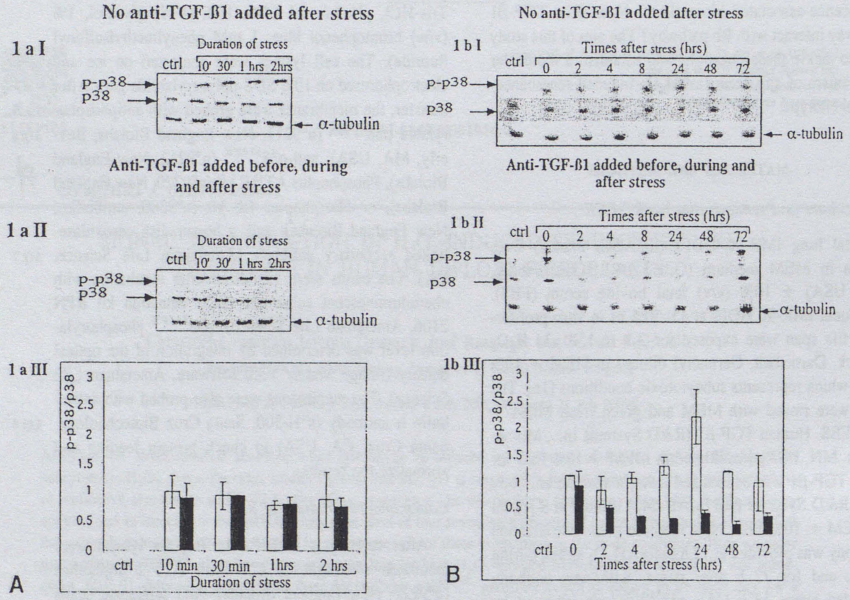



Fig. 1. Role of TGF-β1 on $p38^{MAPK}$ phosphorylation status during and after $H_2O_2$ subcytotoxic stress. IMR-90 HDFs were submitted to a 2 h stress with 150 μM $H_2O_2$. At various times during (a) and after (b) stress, the phosphorylation status of $p38^{MAPK}$ was analyzed. The protein loading was normalized by detecting α-tubulin; p-p38 = phosphorylated form of $p38^{MAPK}$. (aI and bI) No anti-TGF-β1 antibodies added before, during, and after stress, ctrl = control; (aII and bII) anti-TGF-β1 antibodies added before, during, and after stress, ctrl = control; (aIII and bIII) ratio between phosphorylated $p38^{MAPK}$ (p-$p38^{MAPK}$/α-tubulin) and total $p38^{MAPK}$ (total $p38^{MAPK}$/α-tubulin) at increasing times after stress. Each band was quantified considering the respective α-tubulin band as reference at each time. Total $p38^{MAPK}$/α-tubulin was stable in all conditions. White columns = no anti-TGF-β1 antibody; black columns = anti-TGF-β1 antibody. This figure gives mean values ± standard deviation of three independent experiments.

fresh MEM + 10% FBS + G418 for one week before RNA extraction.

The results presented in this report were all expressed as mean values ± SD of three independent experiments.

AQ: 11

## RESULTS

### *Role of TGF-β1 on $p38^{MAPK}$ phosphorylation status after subcytotoxic $H_2O_2$ stress*

$p38^{MAPK}$ is a stress- and mitogen-activated protein kinase activated, for instance, by $H_2O_2$ [18], arsenite [19], and UV radiation [20,21]. IMR-90 HDFs were stressed for 2 h with 150 μM $H_2O_2$, which represents subcytotoxic conditions [16]. During the stress, $p38^{MAPK}$ was phosphorylated at 10 min after the beginning of the stress and remained phosphorylated throughout the stress (Fig. 1I). At various times after stress, the phosphorylation status of $p38^{MAPK}$ was determined by Western blot. Phosphorylated $p38^{MAPK}$ was detected at 0, 2, 4, 8, 24, 48, and 72 h after stress (Fig. 1I). This did not correspond to the general idea that stress-activated protein kinases are only transiently activated after oxidative stress. The phosphorylated form of $p38^{MAPK}$ (p-p38) remained undetectable in the control cells (no stress) before (Fig. 1I) and at 72 h after medium change (not shown).

FI

IMR-90 HDFs were exposed to subcytotoxic $H_2O_2$ stress and incubated with anti-TGF-β1 antibodies. The ratio of phosphorylated $p38^{MAPK}$/total $p38^{MAPK}$ was analyzed using α-tubulin level as reference level (Figs. 1aII and 1bII). Figures 1aIII and 1bIII give the quantification of the phosphorylation status of $p38^{MAPK}$ in IMR-90 HDFs incubated or not with anti-TGF-β1 antibodies for increasing durations after stress. Just after stress, $p38^{MAPK}$ was phosphorylated at similar levels in both situations. As time after stress increased, the level of $p38^{MAPK}$ phosphorylation rapidly decreased in the presence of anti-TGF-β1 antibodies, whereas it remained

high in the absence of these antibodies. These results strongly suggest that the immediate activation of $p38^{MAPK}$ is independent of TGF-$\beta$1, while its sustained activation becomes dependent on TGF-$\beta$1 as time after stress increases.

### *Inhibition of $p38^{MAPK}$ blocks the appearance of $H_2O_2$-induced senescence-like phenotype*

The proportion of SA $\beta$-gal positive IMR-90 HDFs at 72 h after treatment with 150 $\mu$M $H_2O_2$ for 2 h reached 51 ± 2% (Fig. 2a). The addition of SB203580 at 10 or 25 $\mu$M inhibited the stress-induced increase of the proportion of SA $\beta$-gal positive HDFs, which remained at 20 ± 5% and 17 ± 1% at 10 and 25 $\mu$M SB203580, respectively. When IMR-90 HDFs were stimulated for 72 h with 10 ng/ml TGF-$\beta$1, the proportion of the SA $\beta$-gal positive HDFs increased to 33 ± 4% in HDFs, as previously shown. There was no significant change in the percentage of SA $\beta$-gal positive HDFs after treatment with TGF-$\beta$1 + 10 $\mu$M SB203580 (Fig. 2a). A senescence-like morphology is observed at 72 h after subcytotoxic $H_2O_2$ stress. This morphology is characterized by an irregular shape and increased size [4,16]. HDFs exposed to $H_2O_2$ did not display this stress-induced morphological change when SB203580 was present (Fig. 2b). After stimulation with TGF-$\beta$1 for 72 h, IMR-90 HDFs displayed a senescence-like morphology [16,22,23], which did not appear in the presence of SB203580 (Fig. 2b).

Fibronectin, apo J, SM22, and osteonectin undergo a senescence-related overexpression and are overexpressed at 72 h after subcytotoxic $H_2O_2$ stress [6,16]. When 10 or 25 $\mu$M SB203580 was added, no overexpression of these genes was found at 72 h after stress (Fig. 2c). After 72 h of stimulation with 5 ng/ml TGF-$\beta$1, the mRNA steady state level of SM22, fibronectin, osteonectin, and apo J was maximally increased when compared to nonstimulated IMR-90 HDFs, reaching 1.7-, 1.8-, 1.7-, and 2.5-fold overexpression, respectively. In the presence of 25 $\mu$M SB203580, these mRNA steady state levels fell to basal levels (not shown).

To confirm the results obtained with SB203580, we used antisense oligonucleotides against $p38^{MAPK}$ mRNA. Two sequences of $p38^{MAPK}$ antisense oligonucleotides induced a sharp decrease of the protein level of $p38^{MAPK}$ (Fig. 3a). We checked the proliferation capability of HDFs treated with these antisense oligonucleotides by measuring [$^3$H]-thymidine incorporation. No important change of incorporation was found in the presence of the antisense oligonucleotides. These antisense oligonucleotides sharply diminished the stress-induced increase of the proportion of SA $\beta$-gal positive HDFs,

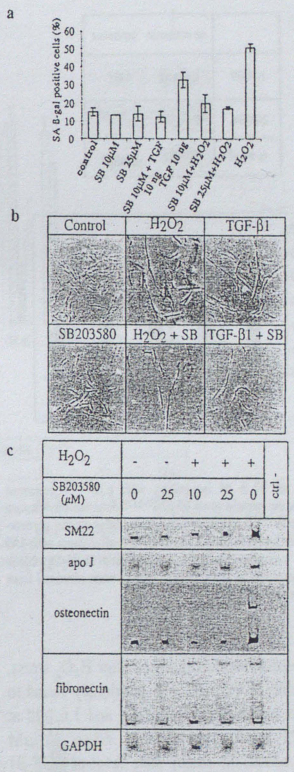



Fig. 2. (a) Effect of $p38^{MAPK}$ inhibitor SB203580 on the percentage of IMR-90 HDFs positive for SA $\beta$-gal after 72 h stimulation with TGF-$\beta$1 or at 72 h after 2 h stress with 150 $\mu$M $H_2O_2$. These results were obtained from three independent experiments. (b) Effect of $p38^{MAPK}$ inhibitor SB203580 on the morphology of IMR-90 HDFs after 72 h stimulation with TGF-$\beta$1 or at 72 h after 2 h stress with 150 $\mu$M $H_2O_2$. The increase of cell size induced by $H_2O_2$ does not occur in the presence of SB203580. These results were obtained from three independent experiments. (c) Effect of $p38^{MAPK}$ inhibitor SB203580 (10 or 25 $\mu$M) on the steady state level of fibronectin, osteonectin, apolipoprotein J, and SM22 mRNA at 72 h after exposure of IMR-90 HDFs to 150 $\mu$M $H_2O_2$. Control = HDFs not exposed to $H_2O_2$; – = RT-PCR without RNA. Autoradiography after migration of the products obtained by the semiquantitative RT-PCR with GAPDH mRNA as a reference level. Very similar results were obtained from three independent experiments.

which remained at 23 ± 2.6% and 19 ± 0.5%, respectively, with the antisense oligonucleotide sequence 104939 and 204938 (Fig. 3b). After treatment with $H_2O_2$ for 2 h in the presence of any of the two random antisense oligonucleotides, IMR-90 displayed a senescence-like morphology. This morphology did not appear when $p38^{MAPK}$ antisense oligonucleotides were present.

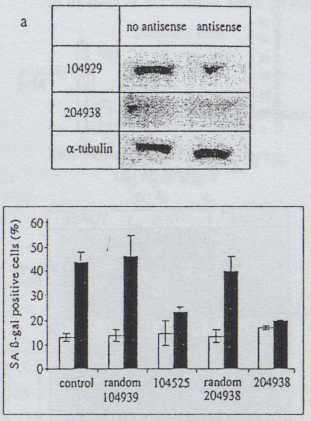



Fig. 3. (a) Effect of 72 h of incubation with $p38^{MAPK}$ antisense oligonucleotides on the protein level of $p38^{MAPK}$ detected by Western blot. (b) Effect of $p38^{MAPK}$ antisense oligonucleotides on the percentage of IMR-90 HDFs positive for SA β-gal at 72 h after stress with 150 μM $H_2O_2$. White columns = HDFs not exposed to $H_2O_2$; black columns = HDFs exposed to $H_2O_2$. These results were obtained from three independent experiments.

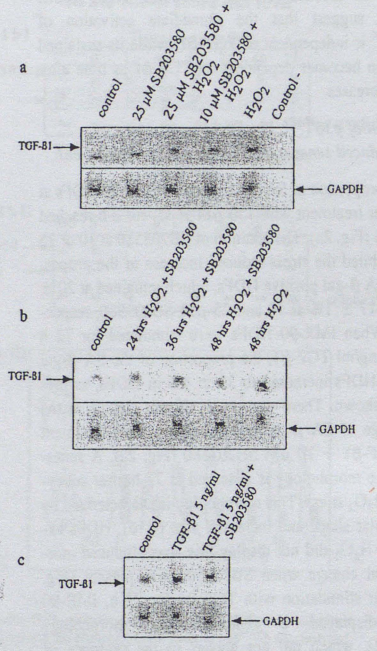
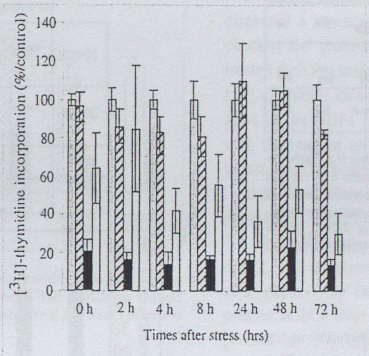



Fig. 4. Effect of $p38^{MAPK}$ inhibitor SB203580 on the steady state level of TGF-β1 mRNA. (a) At 72 h after exposure of IMR-90 HDFs to 150 μM $H_2O_2$. Control = IMR-90 HDFs not exposed to $H_2O_2$; control– = RT-PCR without RNA. Autoradiography after migration of the products obtained by semiquantitative RT-PCR with GAPDH mRNA as a reference level. Very similar results were obtained from three independent experiments. (b) At 24, 36, and 48 h after exposure of IMR-90 HDFs to 150 μM $H_2O_2$. Control = HDFs not exposed to $H_2O_2$; control– = RT-PCR without RNA. Autoradiography after migration of the products obtained by semiquantitative RT-PCR with GAPDH mRNA as a reference level. Very similar results were obtained from three independent experiments. (c) After stimulation of IMR-90 HDFs with 5 ng/ml TGF-β1 in the presence of 25 μM SB203580. Control = HDFs not exposed to TGF-β1; control– = RT-PCR without RNA. Autoradiography after migration of the products obtained by the semiquantitative RT-PCR with GAPDH mRNA as a reference level. Very similar results were obtained from three independent experiments. At 24, 36, and 48 h after exposure of IMR-90 HDFs to 150 μM $H_2O_2$. Control = HDFs not exposed to $H_2O_2$; control– = RT-PCR without RNA. Autoradiography after migration of the products obtained by semiquantitative RT-PCR with GAPDH mRNA as a reference level. Very similar results were obtained from three independent experiments.

When followed at increasing times after $H_2O_2$ stress, the overexpression of TGF-β1 was previously found to reach respective increases of 1.4-, 1.5-, and 1.6-fold at 24, 48, and 72 h after stress [16]. When 25 μM SB203580 was added, the steady state level of TGF-β1 mRNA remained close to the basal level at 24, 36, 48, and 72 h after stress. Increases of 1.6- ± 0.1-fold at 48 h and 1.6- ± 0.2-fold at 72 h were still found after $H_2O_2$ stress without SB203580 (Figs. 4a and 4b). The increase of TGF-β1 mRNA level observed after stimulation with TGF-β1 was less sensitive to SB203580 than $H_2O_2$-induced increase of TGF-β1 mRNA level. TGF-β1 induced its own overexpression through $p38^{MAPK}$ activation. Indeed, when IMR-90 HDFs were stimulated with 5 ng/ml TGF-β1, a 2.2-fold overexpression of TGF-β1 mRNA was found after the addition of TGF-β1 protein to the medium. Incubation with TGF-β1 + SB203580 led only to a 1.4-fold increase of TGF-β1 mRNA steady state level (Fig. 4c).

The proliferative potential of IMR-90 HDFs exposed to 150 μM $H_2O_2$ ± SB203580 was estimated at increasing times after stress by measuring [$^3$H]-thymidine incorporation into DNA. A sharp decrease of [$^3$H]-thymidine incorporation was observed immediately after stress and represented 20 ± 7% of the control values. A similar decrease was observed at 2, 4, 8, 24, 48, and 72 h after stress. At the shorter times after stress, IMR-90 HDFs treated with $H_2O_2$ + SB203580 showed a much lower decrease of [$^3$H]-thymidine incorporation compared to the cells exposed to $H_2O_2$ alone (Figs. 5a and 5b). These results were confirmed using $p38^{MAPK}$ antisense oligonucleotides. IMR-90 HDFs stressed in the presence of one of these oligonucleotides had a much lower decrease

a




| b | Time after stress (hrs) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 2 | 4 | 8 | 24 | 48 | 72 |
| (1) no SB203580 | 79.5 | 83.7 | 86.7 | 83.3 | 84.0 | 77.0 | 86.2 |
| (2) + SB203580 | 33.4 | 1.2 | 49.3 | 31.5 | 67.1 | 49.5 | 63.6 |

Calculations:(1) 100-(($H_2O_2$/ctrl)*100)) (2) 100-(($H_2O_2$ SB/ctrl SB)*100))

c

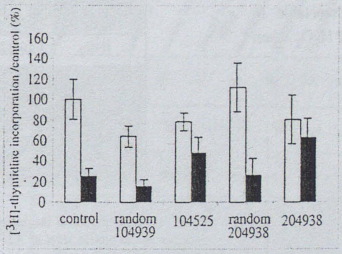



Fig. 5. Effect of $p38^{MAPK}$ inhibitor SB203580 (25 $\mu$M) and $p38^{MAPK}$ antisense oligonucleotides on the incorporation of [$^3$H]-thymidine in IMR-90 HDFs submitted to 2 h stress with 150 $\mu$M $H_2O_2$. At increasing times after stress, the HDFs were plated at 5500 cells/cm$^2$ and incubated with 1 $\mu$Ci/ml of [$^3$H]-thymidine. (a) Effect of SB203580. The results are expressed in percentages of the values found in nontreated HDFs. Gray columns = HDFs not exposed to $H_2O_2$; hatched columns = HDFs not exposed to $H_2O_2$ and incubated with SB203580; black columns = HDFs exposed to $H_2O_2$; white columns = HDFs exposed to $H_2O_2$ and incubated with SB203580. These results were obtained from three independent experiments. (b) Percentage of inhibition of [$^3$H]-thymidine incorporation at increasing times after exposure to 150 $\mu$M $H_2O_2$ in the absence (1) or presence (2) of 25 $\mu$M SB203580. (c) Effect of $p38^{MAPK}$ antisense oligonucleotides. The results are expressed in percentages of the values found in nontreated HDFs. White columns = HDFs not exposed to $H_2O_2$; black columns = HDFs exposed to $H_2O_2$. These results were obtained from three independent experiments.

of [$^3$H]-thymidine incorporation at 72 h after stress, which confirmed the results obtained with SB203580 (Fig. 5c). This $p38^{MAPK}$-related effect seemed independent of the $H_2O_2$-induced overexpression of TGF-$\beta$1. Indeed IMR-90 HDFs treated with $H_2O_2$ and incubated with anti-TGF-$\beta$1 antibodies showed a similar decrease of [$^3$H]-thymidine incorporation. Thus, the strong antiproliferative effect TGF-$\beta$1 exerted in normal conditions in IMR-90 HDFs did not seem to exist after $H_2O_2$ stress.

*Long-term ATF-2 phosphorylation after subcytotoxic $H_2O_2$ stress*

Activated $p38^{MAPK}$ is known to activate ATF-2 [24,25]. IMR-90 HDFs cells were stressed for 2 h with 150 $\mu$M $H_2O_2$. Phosphorylated ATF-2 was detected by Western blot at 0, 2, 4, 8, 24, 48, and 72 h after stress. The phosphorylated form of ATF-2 (p-ATF-2) remained undetectable in the control cells (no stress) before and at

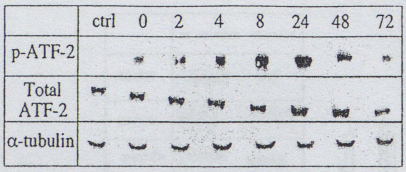



Fig. 6. Analysis of ATF-2 phosphorylation status after $H_2O_2$ subcytotoxic stress. IMR-90 HDFs were submitted to 2 h stress with 150 $\mu$M $H_2O_2$. At various times after stress, the phosphorylation status of $p38^{MAPK}$ was analyzed. The protein loading was normalized by detecting α-tubulin. p-ATF-2 = phosphorylated form of ATF-2; ctrl = control. Very similar results were obtained from three independent experiments.

72 h after medium change. A 2.5-fold increase in the phosphorylation status of ATF-2 was observed at 24 h F6 after stress (Fig. 6). The DNA-binding activity of ATF-2 showed a sharp increase immediately after stress with a F7 peak at 24 h after stress (Fig. 7).

IMR-90 HDFs treated with 25 $\mu$M SB203580 were stressed for 2 h with 150 $\mu$M $H_2O_2$ and the phosphorylation status of ATF-2 was determined at 24 h after stress. Phosphorylated ATF-2 was detected at 24 h after stress in HDFs stressed without SB203580. The phosphorylated form of ATF-2 remained undetectable in IMR-90 HDFs stressed or not with 150 $\mu$M $H_2O_2$ when SB203580 was present (not shown).

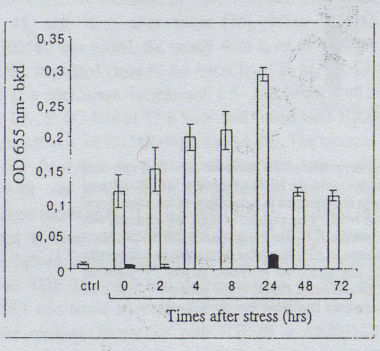



Fig. 7. Analysis of the DNA-binding activity of ATF-2 at increasing times after stress. The same amount of nuclear extract for each sample was loaded on a multiwell plate coated with the consensus binding sequence of ATF-2. The bound transcription factor ATF-2 was detected by a specific primary antibody. A horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody is used to detect the bound primary antibody. The results are expressed as the optical density minus background (O.D. 655 nm − bkd). No competition oligonucleotide (white columns) or competition oligonucleotides (black columns) corresponding to the wild-type ATF-2 consensus sequence were added to the sample. These results were obtained from three independent experiments.

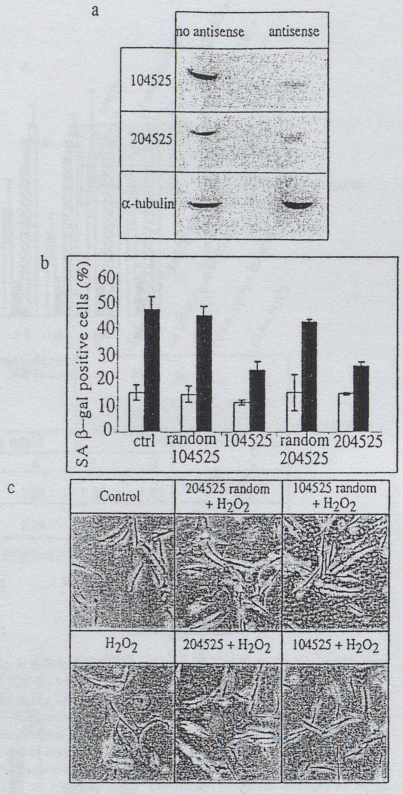



Fig. 8. (a) Effect of 72 h of incubation with ATF-2 antisense oligonucleotides on the protein level of ATF-2 detected by Western blot. (b) Effect of ATF-2 antisense oligonucleotides on the percentage of IMR-90 HDFs positive for SA β-gal 72 h after 2 h stress with 150 $\mu$M $H_2O_2$. White columns = HDFs not exposed to $H_2O_2$; black columns = HDFs exposed to $H_2O_2$. These results were obtained from three independent experiments. (c) Effect of ATF-2 antisense oligonucleotides on the morphology of IMR-90 HDFs at 72 h after 2 h stress with 150 $\mu$M $H_2O_2$. The increase in cell size induced by $H_2O_2$ does not occur in the presence of ATF-2 antisense oligonucleotides.

### *ATF-2 antisense oligonucleotides block the appearance of $H_2O_2$-induced senescence-like phenotype*

Two sequences of ATF-2 antisense oligonucleotides induced a sharp decrease of the protein level of ATF-2 (Fig. 8a). The proportion of SA β-gal positive IMR-90 F8 HDFs at 72 h after treatment with 150 $\mu$M $H_2O_2$ for 2 h reached 45.7 ± 5%. The addition of ATF-2 antisense oligonucleotides inhibited the stress-induced increase of the proportion of SA β-gal positive HDFs, which remained at 24 ± 3% and 25 ± 1% for the antisense

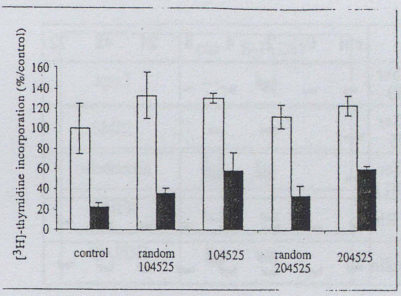
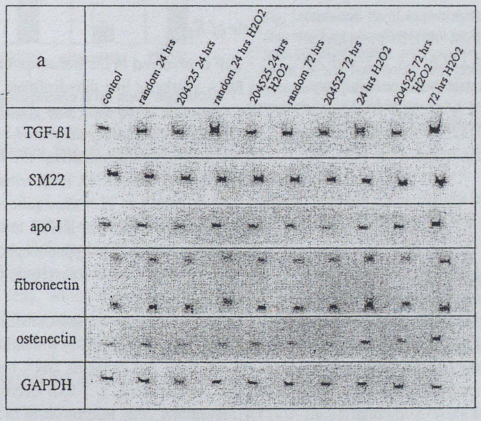



Fig. 9. Effect of ATF-2 antisense oligonucleotides on the incorporation of [$^3$H]-thymidine at 72 h after exposure of IMR-90 HDFs to 150 $\mu$M $H_2O_2$. White columns = HDFs not exposed to $H_2O_2$; black columns = HDFs exposed to $H_2O_2$.

oligonucleotide sequences 104525 and 204525, respectively (Fig. 8b). HDFs exposed to $H_2O_2$ did not display a stress-induced senescence-like morphology when ATF-2 antisense oligonucleotides were present. At 72 h after treatment with $H_2O_2$ in the presence of any of the two random antisense oligonucleotides, IMR-90 HDFs displayed a senescence-like morphology (Fig. 8c). We checked the proliferation capability of IMR-90 HDFs treated with the antisense oligonucleotides by measuring [$^3$H]-thymidine incorporation. No change in the proliferation of the HDFs was found between the cells treated with the random and ATF-2 antisense oligonucleotides in nonstressful conditions (Fig. 9). F9

IMR-90 HDFs were treated with the antisense oligonucleotides 204525 and stressed with 150 $\mu$M $H_2O_2$ for 2 h. The mRNA steady state levels of fibronectin, apo J, SM22, and osteonectin were analyzed at 24 and 72 h after stress. Only fibronectin was found to be overexpressed at 24 h after stress. All four genes were overexpressed at 72 h after stress. When 10 $\mu$M antisense sequence 204525 was added, no overexpression was found at 24 and 72 h after stress. When no stress was applied, oligonucleotide sequence 204525 alone (10 $\mu$M) did not change the mRNA steady state level of the four genes (Fig. 10). F10




| b | control | 24 hrs after stress | | | | | | 72 hrs after stress | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | random | | 204525 | | $H_2O_2$ | | random | | 204525 | | $H_2O_2$ | |
| $H_2O_2$ | - | - | + | - | + | + | | - | - | + | | + | |
| TGF-ß1 | 100 % | 109± 15.6 | 225± 14.2 | 84 ±15.8 | 120±15.2 | 146± 4.0 | | 128± 6.0 | 117±12.2 | 105±20.1 | | 201± 3.5 | |
| SM22 | 100 % | 84 ±14.5 | 123±13.2 | 102±1.5 | 102±16.4 | 114± 9.4 | | 119± 3.2 | 97± 5.8 | 128± 10.2 | | 198± 12.4 | |
| apo J | 100 % | 117± 5.0 | 126±13.5 | 92±1.0 | 110± 4.0 | 94±16.4 | | 81± 9.1 | 69± 16.7 | 140± 9.6 | | 229± 21.0 | |
| fibronectin | 100 % | 105± 7.5 | 149±11.0 | 96 ±10.6 | 99± 5.0 | 169± 2.0 | | 104±10.1 | 104± 7.5 | 95± 18.9 | | 166± 3.0 | |
| osteonectin | 100 % | 101± 9.7 | 99± 8.1 | 112± 5.2 | 82±17.4 | 114± 13.1 | | 91±10.0 | 118± 8.0 | 102± 20.0 | | 172± 15.3 | |

Fig. 10. Effect of ATF-2 antisense oligonucleotides on the steady state level of TGF-ß1, fibronectin, osteonectin, apolipoprotein J, and SM22 mRNA at 24 and 72 h after exposure of IMR-90 HDFs to 150 $\mu$M $H_2O_2$. Control = HDFs not exposed to $H_2O_2$. – = RT-PCR without RNA.

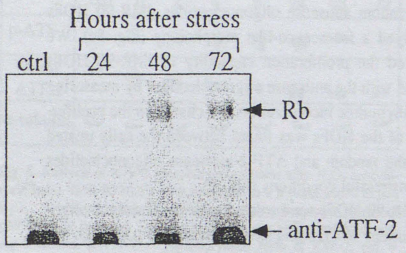



Fig. 11. Coimmunoprecipitation of Rb with ATF-2. IMR-90 HDFs were stressed with 150 $\mu$M $H_2O_2$. The HDFs were lysed at 24, 48, and 72 h after stress.

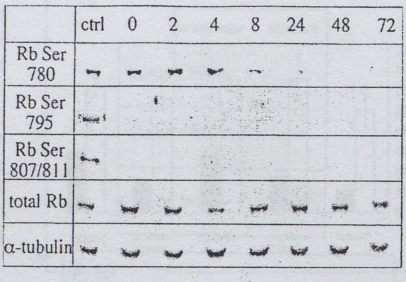



Fig. 12. Analysis of Rb phosphorylation status at increasing times after $H_2O_2$ subcytotoxic stress. IMR-90 HDFs were submitted to 2 h stress with 150 $\mu$M $H_2O_2$. At various times after stress, the phosphorylation status of Rb was analyzed using three different antibodies specific of different phosphorylation sites (Ser 780, Ser 795, Ser 807/811). The protein loading was normalized by detecting α-tubulin.

An overexpression of TGF-β1 mRNA at 24 and 72 h after subcytotoxic $H_2O_2$ stress was found in control HDFs and in HDFs treated with the random oligonucleotides. When HDFs were treated with the oligonucleotide 204525 and stressed with $H_2O_2$, the steady state level of TGF-β1 mRNA remained close to the control value: 1.20- ± 0.15-fold and 1.05- ± 0.20-fold of the control at 24 and 72 h after stress, respectively (Fig. 10). The ratio of [$^3$H]-thymidine incorporation level between nonstressed and $H_2O_2$-stressed IMR-90 HDFs reached at 72 h after stress, respectively, 4.3, 3.6, 3.3, 2.2, and 2.1 in control cells, cells incubated with both random oligonucleotides, and cells incubated with ATF-2 antisense oligonucleotides 104525 and 204525. This indicated that ATF-2 antisense oligonucleotides lowered the $H_2O_2$-induced growth arrest (Fig. 9).

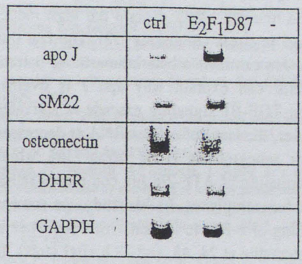
*Relationship between $p38^{MAPK}$ and Rb signaling pathways*

ATF-2 is able to interact with Rb on the TGF-β1 and TGF-β2 promoter [26]. At increasing times after a 2 h stress with 150 $\mu$M $H_2O_2$, IMR-90 HDFs were lysed and ATF-2 was immunoprecipitated. The samples were analyzed by Western blot using anti-Rb antibodies. At 0, 2, 4, and 8 h after stress, these antibodies did not allow detection of any ATF-2/Rb complex. A minimal coimmunoprecipitation of ATF-2 and Rb could be observed at 24 h after stress. Rb was found to coimmunoprecipitate with ATF-2 at 48 and 72 h after stress (Fig. 11). Moreover since ATF-2 was shown to be phosphorylated at 0, 2, 4, 8, 24, 48, and 72 h after stress, the interaction between ATF-2 and Rb did not occur directly after ATF-2 phosphorylation. However, ATF-2 phosphorylation is necessary for this interaction to occur. Indeed when SB203580 was added, no phosphorylation of ATF-2 and no coimmunoprecipitation of ATF-2/Rb complex was observed (not shown). Lastly, as long as Ser 780 of Rb was phosphorylated, that is until 24 h after stress, no coimmunoprecipitation of ATF-2/Rb was observed. At 48 h after stress, the phosphorylation sites tested were unphosphorylated and large coimmunoprecipitation with ATF-2 was observed, which suggests that Rb must be hypophosphorylated before interacting with ATF-2 (Fig. 12).

*Role of $E_2F$*

$E_2F$ is involved in the transcription of genes involved in DNA synthesis like dihydrofolate reductase (DHFR). We were able to confirm that the steady state level of DHFR mRNA is sharply decreased in senescent IMR-90 HDFs using semiquantitative RT-PCR. Interestingly, DHFR steady state mRNA level remained close to 100% in IMR-90 HDFs at 72 h after subcytotoxic $H_2O_2$ stress (not shown). The fact that DHFR mRNA level remained unchanged despite Rb hypophosphorylation suggested the intervention of other transcription factors like ATF-2 after stress.

In normal conditions, the transfection of a dominant negative of $E_2F_1$ ($E_2F_1$-d87, which has lost its transactivation activity but keeps its DNA-binding activity [27]) caused, as expected, a 2-fold decrease in the level of DHFR mRNA. The mRNA level of osteonectin fell by 3-fold (Fig. 13). Fibronectin mRNA level was already known to depend on $E_2F_1$ in normal conditions [27]. Interestingly, when native $E_2F_1$ could not bind DNA due to the presence of the dominant negative, the steady state mRNA levels of apo J and SM22 were multiplied by 3.5- and 1.5-fold, respectively (Fig. 13), indicating that, in normal conditions, $E_2F_1$ limits the expression level of apo J and SM22. This suggested that in conditions where Rb is hyperphosphorylated, $E_2F$ sits on the promotor of these genes and downregulates their expression level. In stressing conditions, $E_2F$ is inhibited by hypophosphorylated Rb, allowing ATF-2 to upregulate the expression of these genes. It would be worth knowing the evolution



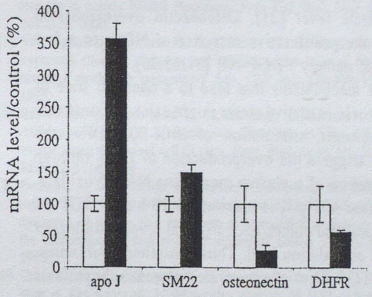




Fig. 13. Autoradiography and quantifications of the steady state mRNA level of apolipoprotein J, osteonectin, SM22, and DHFR after transfection of IMR-90 HDFs with $E_2F_1$-d87. White columns = wild-type IMR-90; black columns = wild-type IMR-90 transfected with the cDNA of $E_2F_1$-d87.

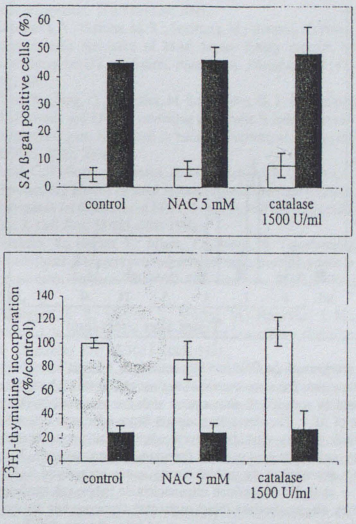



Fig. 14. Effect of the addition of catalase or N-acetylcystein for 24 h after stress on the stress-induced appearance of SA β-gal, and on the level of [$^3$H]-thymidine incorporation. IMR-90 HDFs were submitted to 2 h 150 μM $H_2O_2$ stress. After stress, the medium was changed and catalase (500 U/ml) or N-acetylcystein (5 mM) were added to the medium for 24 h. White columns = no stress; black columns = $H_2O_2$ stress. (a) Percentage of SA β-gal positive cells; (b) level of [$^3$H]-thymidine incorporation.

of these mRNA levels after stress on HDFs transfected with the dominant negative. Unfortunately, these cells do not survive the stress probably because fibronectin is downregulated in these cells, which decreases the anchorage of cells and facilitates stress-induced apoptosis that normally occurs at higher doses of $H_2O_2$ [28].

*Effects of antioxidants present for 24 h after stress*

A direct activation of TGF-β receptor II by oxidative stress can not be ruled out. A similar effect was shown by Rosette and Karin [29], as concerns the activation of EGF receptor by UV stress. If TGF-β1 present in the extracellular matrix or bovine TGF-β1 were to activate TGF-β-receptor II, this would lead to $H_2O_2$ production [30]. Catalase and N-acetylcystein did not protect against the increase in SA β-gal positive HDFs when present for 24 h after stress (Fig. 14a) and had no effect on the level of incorporation of [$^3$H]-thymidine after stress (Fig. 14b). F14

*DNA-binding activity of c-Fos after stress*

The binding of c-Fos to the AP-1 consensus sequence was no more detectable at 24, 48, and 72 h after $H_2O_2$ stress, whereas it was sharply increased at 2, 4, 6, and 8 h after stress (Fig. 15). F15

## DISCUSSION

The present study allows us to propose the following model of establishment of $H_2O_2$-induced senescence-like phenotype: $p38^{MAPK}$ is phosphorylated during stress and $p38^{MAPK}$ activation triggers the overexpression of TGF-β1 via activation of ATF-2. TGF-β1 secretion and TGF-β receptor II activation allow a sustained phosphorylation of $p38^{MAPK}$ and ATF-2. A closed regulatory loop establishes between TGF-β1 overexpression and $p38^{MAPK}$ phosphorylation. This activation allows the appearance of SA β-gal, senescent-like morphology and the overexpression of four senescence-associated genes.

However, these biomarkers do not appear immediately after $p38^{MAPK}$ and ATF-2 activation, together with TGF-β1 overexpression. ATF-2 starts to interact with Rb at 24 h after stress. Therefore, Rb alone is not enough for these biomarkers to appear [10,14]; Rb is hypophosphorylated when it starts to interact with phosphorylated ATF-2, which allows the biomarkers of SIPS to appear.

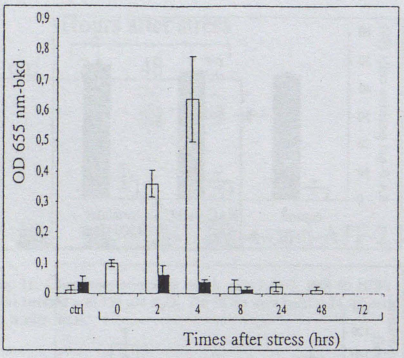



Fig. 15. Analysis of the DNA-binding activity of c-Fos at increasing times after stress. The same amount of nuclear extract for each sample was loaded on a multiwell plate coated with the consensus binding sequence of AP-1. The bound transcription factor c-Fos was detected by a specific primary antibody. A horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody is used to detect the bound primary antibody. The results are expressed as the optical density minus background (O.D. 655 nm − bkd). No competition oligonucleotide (white columns) or competition oligonucleotides (black columns) corresponding to the wild-type AP-1 consensus sequence were added to the sample. These results were obtained from three independent experiments.

As concerns the stress-induced growth arrest, Rb does not become hypophosphorylated just after stress. Other mechanisms can participate in the immediate growth arrest following stress. We showed that $p38^{MAPK}$ and ATF-2 phosphorylation play a significant role in the immediate growth arrest. This occurs probably through the repression of immediate early genes other than c-Fos.

In conditions of subcytotoxic $H_2O_2$ stress, the $p38^{MAPK}$-mediated phosphorylation of ATF-2 seems to be sufficient to replace $E_2F$, which is inactivated by Rb hypophosphorylation. This explains the overexpression of osteonectin and fibronectin. This could also explain the DHFR mRNA level remaining at 100% after stress, whereas it is downregulated in senescent cells. As for SM22 and apo J, phosphorylated ATF-2/hypophosphorylated Rb complexes become able to trigger their overexpression when $E_2F$ is inactivated by hypophosphorylated Rb. Indeed, we showed in this study that ATF-2 antisense oligonucleotides allow these overexpressions to occur no more.

Ectopic retrovirally mediated overexpression of apo J decreases the appearance of senescence-like morphology and SA $\beta$-gal after subcytotoxic t-BHP and ethanol stress. This overexpression also increases the survival of SV-40 WI-38 HDFs and WI-38 HDFs after exposure to cytotoxic stress with t-BHP and ethanol [31]. The apo J-regulating sequences contain several binding sites for the AP-1 transcription factor family. These findings likely explain the high inducibility of apo J in stress conditions [32]. The fact that ATF-2 and c-Jun can form a heterodimeric AP-1 transcription factor can explain why apo J is overexpressed when TGF-$\beta$1 signaling cascade is activated [33]. Moreover, the level of *c-fos* mRNA is decreased at 72 h after subcytotoxic $H_2O_2$ stress [34], which favors the formation of ATF-2/c-Jun complexes rather than c-Fos/c-Jun complexes. In this study, we showed that the binding of c-Fos to its consensus sequence is no longer detectable at 24, 48, and 72 h after stress. In addition, ectopic retrovirally mediated apo J overexpression results in an increase in osteonectin mRNA steady state level [31]. Osteonectin overexpression inhibits the proliferative response of HDFs to a few mitogens, namely PDGF-AB [31,35,36].

Other mechanisms that lead to a constant state of subcytotoxic oxidative stress might exist. In nonstressing conditions, stimulation of IMR-90 HDFs with TGF-$\beta$1 triggers the overproduction of $H_2O_2$ through the activation of a plasma membrane NADH oxidase. The release of $H_2O_2$ is maximal at 20 h after TGF-$\beta$1 stimulation and comes back to basal level at 48 h after TGF-$\beta$1 stimulation [30]. Thus, sustained overexpression of TGF-$\beta$1 might generate constant subcytotoxic oxidative stress for days, long after the initial 2 h subcytotoxic $H_2O_2$ stress. This would explain why Rb remains hypophosphorylated. This sustained production of $H_2O_2$ might also explain the increase of the amount of 8-oxo-deoxyguanine, an oxidatively modified DNA base, observed in $H_2O_2$-induced premature senescence [37].

In conclusion, this report gives an integrated molecular mechanism explaining the establishment of a stress-induced premature senescence-like phenotype. The next question is whether this phenotype establishes in vivo. Along these lines, it is worth recalling that HDFs in $H_2O_2$-induced premature senescence have been shown to favor the growth of preneoplasic keratinocytes [39]. If this is true in vivo, pharmacological interventions against these prematurely senescent HDFs might be of medical interest.

*Acknowledgments* — O. Toussaint is a Research Associate of the FNRS and C. Frippiat has a Fellowship of the FRIA, Belgium. We thank the European Fifth Framework Projects "Protage" (QLK6-CT-1999-02193) and "Functionage" (QLK-CT-2001-00310), which supported this work in part.

## REFERENCES

[1] Brack, C.; Lithgow, G.; Osiewacz, H.; Toussaint, O. Molecular and cellular gerontology. *EMBO J.* **19**:1929–1934; 2000.

[2] Toussaint, O.; Medrano, E.; Von Zglinicki, T. Stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp. Gerontol.* **35**:927–945; 2000.

[3] Mocali, A.; Caldini, R.; Chevanne, M.; Paoletti, F. Induction, effects, and quantification of sublethal oxidative stress by hydrogen peroxide on cultured human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **216**: 388–395; 1995.

[4] Chen, Q.; Ames, B. M. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:4130–4134; 1994.

[5] Toussaint, O.; Houbion, A.; Remacle, J. Aging as a multistep 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. Aging Dev.* **65**:65–83; 1992.

[6] Dumont, P.; Burton, M.; Chen, Q. M.; Gonos, E. S.; Frippiat, C.; Mazarati, J.-B.; Eliaers, F.; Remacle, J.; Toussaint, O. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblasts. *Free Rad. Biol. Med.* **28**: 361–373; 2000.

[7] Von Zglinicki, T.; Saretzki, G.; Döcke, W.; Lotze, C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp. Cell Res.* **220**:186–193; 1995.

[8] Bayreuther, K.; Rodemann, H. P.; Hommel, R.; Dittmann, K.; Albiez, M.; Francz, P. I. Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:5112–5116; 1988.

[9] Bumann, J.; Santo-Holtje, L.; Loffler, H.; Bamberg, M.; Rodemann, H. P. Radiation-induced alterations of the proliferation dynamics of human skin fibroblasts after repeated irradiation in the subtherapeutic dose range. *Strahlenther Onkol.* **171**:35–41; 1995.

[10] Chen, Q. M.; Bartholomew, C. J.; Campisi, J.; Acosta, M.; Reagan, J. D.; Ames, B. N. Molecular analysis of $H_2O_2$-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem. J.* **332**: 43–50; 1998.

[11] Frippiat, C.; Chen, Q. M.; Remacle, J.; Toussaint, O. Cell cycle regulation in $H_2O_2$-induced premature senescence of human diploid fibroblasts and regulatory control exerted by the papillomavirus E6 and E7 proteins. *Exp. Gerontol.* **35**:733–745; 2000.

[12] Tommasino, M.; Crawford, L. Human papillomavirus E6 and E7: proteins which deregulate the cell cycle. *BioEssays* **17**:509–518; 1995.

[13] Boyer, S. N.; Wazer, D. E.; Band, V. E7 protein of human papillomavirus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.* **15**:4620–4624; 1996.

[14] Chen, Q. M.; Tu, V. C.; Catania, J.; Burton, M.; Toussaint, O.; Dilley, T. Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins, and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide. *J. Cell Sci.* **113**:4087–4097; 2000.

[15] Demers, G. W.; Espling, E.; Harry, J. B.; Etscheid, B. G.; Galloway, D. A. Abrogation of growth arrest signals by human papillomavirus type 16 E7 is mediated by sequences required for transformation. *J. Virol.* **70**:6862–6869; 1996.

[16] Frippiat, C.; Chen, Q. M.; Zdanov, S.; Magalhaes, J. P.; Remacle, J.; Toussaint, O. Subcytotoxic $H_2O_2$ stress triggers a release of TGF-β1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **276**:2531–2537; 2001.

[17] Dimri, G. P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelly, C.; Medrano, E. E.; Linskens, M.; Rubeli, I.; Pereira-Smith, O.; Peacocke, M.; Campisi, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:9363–9367; 1995.

[18] Volonte, D.; Galbiati, F.; Pestel, R. G.; Lisanti, M. P. Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-src kinase. *J. Biol. Chem.* **276**:8094–8103; 2001.

[19] Namgung, U.; Xia, Z. Arsenic induces apoptosis in rat cerebellar neurons via activation of JNK3 and p38 MAP Kinases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **174**:130–138; 2001.

[20] Kabuyama, Y.; Homma, M. K.; Sekimata, M.; Homma, Y. Wavelength-specific activation of MAP kinase family proteins by monochromatic UV irradiation. *Photochem. Photobiol.* **73**:147–152; 2001.

[21] Chen, W.; Tang, Q.; Gonzales, M. S.; Bowden, G. T. Role of p38 MAP kinase and ERK in mediating ultraviolet B-induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes. *Oncogene* **20**:3921–3926; 2001.

[22] Garbi, C.; Colletta, G.; Cirafici, A. M.; Marchisio, P. C.; Nitsh, L. Transforming growth factor-β induces cytoskeleton and extracellular matrix modifications in FRTL-5 cells thyroid epithelial cells. *Eur. J. Cell Biol.* **53**:281–289; 1990.

[23] Katakura, Y.; Nakata, E.; Miura, T.; Shirata, S. Transforming growth factor-β triggers two independent senescence programs in cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**:110–115; 1999.

[24] Chellappan, S. P.; Hiebert, S.; Mudryj, M.; Horowitz, J. M.; Nevins, J. R. The $E_2F$ transcription factor is a cellular target for the Rb protein. *Cell* **65**:1053–1061; 1991.

[25] Cheong, J.; Coligan, J. E.; Shuman, J. D. Activating transcription factor-2 regulates phosphoenolpyruvate carboxykinase transcription through a stress-inducible mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **273**:22714–22718; 1998.

[26] Waas, W. F.; Lo, H.-H.; Dalby, K. N. The kinetic mechanism of the dual phosphorylation of the ATF2 transcription factor by the p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase. *J. Biol. Chem.* **276**:5676–5684; 2001.

[27] Kim, S.-J.; Wagner, S.; Liu, F.; O'Reilly, M. A.; Robbins, P. D.; Green, M. Retinoblastma gene product activates expression of the human TGF-β2 gene through transcripton factor ATF-2. *Nature* **358**:331–334; 1992.

[28] Jordan-Sciutto, K. L.; Logan, T. J.; Norton, P. A.; Derfoul, A.; Dodge, G. R.; Hall, D. J. Reduction in fibronectin expression and alteration in cell morphology are coincident in NIH3T3 cells expressing a mutant E2F1 transcription factor. *Exp. Cell Res.* **236**:527–536; 1997.

[29] Chen, Q. M.; Liu, J.; Merrett, J. B. Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21, and bax in $H_2O_2$ response of normal human fibroblasts. *Biochem. J.* **15**: 543–551; 2000.

[30] Rosette, C.; Karin, M. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* **274**:1194–1197; 1996.

[31] Thannickal, V. J.; Fanburg, B. L. Activation of an $H_2O_2$-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor-β1. *J. Biol. Chem.* **270**:30334–30338; 1995.

[32] Dumont, P.; Chainiaux, F.; Eliaers, F.; Petropoulou, C.; Remacle, J.; Koch-Brandt, C.; Gonos, E. S.; Toussaint, O. Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and *tert*-butylhydroperoxide. *Cell Stress Chaper.* **7**:23–35; 2002.

[33] Michel, D.; Chatelain, G.; North, S.; Brun, G. Stress-induced transcription of the clusterin/apo J gene. *Biochem. J.* **328**:45–50; 1997.

[34] Hai, T.; Curran, T. Cross-familly dimerization of transcription factors Fos/jun and ATF/CREB alters DNA-binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:3720–3724; 1991.

[35] Dumont, P.; Burton, M.; Chen, Q. M.; Frippiat, C.; Pascal, T.; Dierick, J.-F.; Eliaers, F.; Chainiaux, F.; Remacle, J.; Toussaint, O. Human diploid fibroblasts display a decreased level of *c-fos* mRNA at 72 h after exposure to sublethal $H_2O_2$ stress. *Ann. NY Acad. Sci.* **908**:306–309; 2000.

[36] Pichler, R. H.; Bassuk, J. A.; Hugo, C.; Reed, M. J.; Eng, E.; Gordon, K. L.; Pippin, J.; Alpers, C. E.; Couser, W. G.; Sage, E. H.; Johnson, R. J. SPARC is expressed by mesangial cells in experimental mesangial proliferative nephritis and inhibits platelet-derived growth factor-medicated mesangial cell proliferation in vitro. *Am. J. Pathol.* **148**:1153–1167; 1996.

[37] Raines, E. W.; Lane, T. F.; Iruela-Arispe, M. L.; Ross, R.; Sage,

AQ: 13

E. H. The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1281–1285; 1992.

[38] Chen, Q.; Fisher, A.; Reagan, J. D.; Yan, L. J.; Ames, B. N. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4337–4341; 1995.

[39] Krtolica, A.; Parrinelo, S.; Lockett, S.; Desprez, P. Y.; Campisi, J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:12072–12077; 2001.

## ABBREVIATIONS

apo J—apolipoprotein J
FBS—fetal bovine serum
GAPDH—glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HDF—human diploid fibroblast
$H_2O_2$—hydrogen peroxide
MEM—minimal essential medium
NAC—N-acetylcystein
Rb—retinoblastoma protein
RT-PCR—reverse transcription polymerase chain reaction
SA $\beta$-gal—senescence-associated $\beta$-galactosidase activity
SB203580—pyrimidine-imidazol inhibitor of $p38^{MAPK}$
t-BHP—*tert*-butylhydroperoxide
TGF-$\beta$1—transforming growth factor-$\beta$1
TGF-$\beta$ RII—TGF-$\beta$ receptor II

UNCORRECTED PROOF

# Conclusions

# Chapitre 1: Régulation de la phosphorylation de Rb et rôle de E2F en SIPS.

## 1.1 Contrôle de la phosphorylation de Rb.

L'activité de Rb est contrôlée par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation (De Caprio et al., 1989)(pour une revue: (Herwig and Strauss, 1997)). En phase G0 et G1 précoce, Rb est principalement déphosphorylée, alors qu'en phase G1 tardive, S, G2 et M, Rb est hyperphosphorylée. Rb joue le rôle fondamental de gardien du point de restriction (R point, restriction point), une transition clé dans le cycle cellulaire (Fig. 18)(Lodish et al., 1995). Une fois passé ce point de restriction, gardé par Rb, la cellule quitte la phase G1 et entre irréversiblement en phase S (Bartek et al., 1996).

A ce moment, le domaine "poche" ("pocket") de Rb est encombré par de nombreuses phosphorylations. Ces phosphorylations empêchent l'accès du domaine "poche" aux facteurs de transcription, comme ceux de la famille E2F. Ces facteurs de transcription peuvent alors déclencher la phase S du cycle cellulaire (Hansens et al., 1999).

Lors de la sénescence réplicative mais aussi suite à des stress oxydatifs subcytotoxiques, une hypophosphorylation de Rb est observée permettant l'interaction de Rb avec le facteur de transcription E2F. Cette association est considérée comme responsable de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. On savait, au début de cette étude, que la CdKI $p21^{Waf-1}$ est surexprimée pendant plusieurs semaines suite à un stress subcytotoxique sous $H_2O_2$ ou suite à plusieurs stress sous t-BHP résultant en l'hypophosphorylation de Rb. Le niveau de p53 quant à lui augmente après le stress subcytotoxique sous $H_2O_2$ puis retourne à son niveau basal 44 h après le stress (Chen et al., 1998; Dumont et al., 2000c). Le niveau d'ARNm de p53 n'est pas augmenté à 72 heures après stress subcytotoxique sous $H_2O_2$, ce qui peut être corrélé avec le niveau basal de protéine p53 observé 72 heures après stress (Chen et al., 1998). Comme observé au niveau protéique, le niveau d'ARNm de p53 augmente fortement chez les fibroblastes IMR-90 + E7 (article 1).

On sait que $p19^{Ink-4d}$ est capable d'inhiber la protéine MDM2, ce qui conduit à une augmentation de l'activité de p53 car MDM2 est un inhibiteur de p53 (Weber et al., 1999). La diminution de la quantité d'ARNm de $p19^{Ink-4d}$, pourrait donc conduire à l'inhibition de l'activité de p53 par MDM2, si cette diminution ce confirme au niveau protéique. Ceci est aussi un argument supplémentaire en faveur d'une surexpression de $p21^{Waf-1}$ indépendante de p53 après stress.

Fig. 35: Voie proposée de régulation du blocage du cycle cellulaire suite à un stress subcytotoxique sous $H_2O_2$. Les numèros en gras donnent la chronologie relative d'activation de cette voie

Nous avons tout d'abord voulu comprendre plus complètement le mécanisme déterminant l'hypophosphorylation de Rb.
Premièrement, il fallait vérifier que la protéine Rb était bien hypophosphorylée à long terme suite à un stress subcytotoxique sous $H_2O_2$ ce qui est bien le cas (article 3). Lorsque trois anticorps reconnaissant trois sites différents de phosphorylation sont utilisés, on remarque que Rb ne devient pas complètement déphosphorylée dès les premières heures après le stress subcytotoxique sous $H_2O_2$ (article 4) . Pour expliquer l'origine de cette hypophosphorylation, nous nous sommes, dans un premier temps, intéressés au niveau d'expression des CdKIs impliquées dans la phase G1 et S du cycle cellulaire et de p53. Ces niveaux d'expression ont aussi été déterminés chez des fibroblastes IMR-90 exprimant de manière stable l'ADN complémentaire des oncoprotéines E6 et E7 du papillomavirus HPV 16.

Nous avons observé une forte augmentation de la quantité d'ARNm de $p21^{Waf-1}$ (article 1) qui s'accompagne également d'une forte augmentation de la quantité de protéine de $p21^{Waf-1}$ (article 2) à 72 heures après le stress subcytotoxique sous $H_2O_2$, confirmant les résultats de Chen et *al.* (Chen et al., 1998) et expliquant au moins partiellement, l'hypophosphorylation de Rb, et donc l'arrêt prolifératif observé en SIPS.
Nous confirmons aussi que cette surexpression de $p21^{Waf-1}$ est indépendante de p53 comme montré par les fibroblastes IMR-90 + E6 à 72 heures après stress, ce qui reste inexpliqué. Une telle surexpression de $p21^{Waf-1}$, indépendamment de p53 avait déjà été démontré suite à des stress générant des dégâts à l'ADN (Macleod et al.,1995) sans qu'aucune explication n'ait été trouvée. L'étude du promoteur de $p21^{Waf-1}$ a permis de mettre en évidence la présence de sites Sp1 et E2F en plus des sites p53. La présence d'un site sensible au TGF-ß1 via les Mapkinase a également été montré (Liu et al., 1996). De plus, ce mécanisme d'activation est indépendant de p53 (Yoneda et al, 1999). Il est donc possible que la surexpression de $p21^{Waf-1}$ soit due à l'activation de la Mapk p38 suite au stress. Une autre possibilité serait la présence d'une boucle de rétroaction entre Rb et $p21^{Waf-1}$. En effet, la présence de sites E2F suppose l'existence d'une telle boucle. Cependant, à 72 hrs après stress, Rb est hypophosphorylé, inhibant de fait E2F.
De plus, nous avons montré que cette augmentation de la quantité d'ARNm de $p21^{Waf-1}$ 72 hrs après stress est aussi indépendante de Rb. Cependant, le niveau basal d'ARNm de $p21^{Waf-1}$ comme celui des autres CdKIs est régulé par Rb. En effet, nous constatons une augmentation du niveau basal d'ARNm de $p21^{Waf-1}$ chez les FHDs IMR-90 + E7. Ces résultats sur $p21^{Waf-1}$ suggèrent que Rb pourrait partiellement réguler son propre niveau de phosphorylation via un mécanisme contrôlant la quantité de $p21^{Waf-1}$ en conditions normales. Chez les FHDs IMR-90 + E7 soumis à un stress subcytotoxique sous $H_2O_2$, nous observons, en plus de l'augmentation de la quantité d'ARNm de $p21^{Waf-1}$ due à l'expression de E7, une surexpression encore plus importante due au stress.

Les CdKIs sont les régulateurs des complexes formés d'une cycline et d'une CdK. Ce sont ces complexes cycline-CdK qui phosphorylent Rb. Fort logiquement, nous nous sommes ensuite intéressés aux complexes cycline-CdK.

Nous avons montré que suite à un stress subcytotoxique sous $H_2O_2$, les niveaux d'ARNm des cyclines D1, D2, D3 et G1 et la CdK4 ne varient que peu en comparaison aux FHDs IMR-90 contrôles non-stressés. Des résultats identiques sont obtenus en ce qui concerne le niveau protéique de ces cyclines et de CdK4 (article 2). De plus, il semble que le niveau d'expression de ces gènes soit indépendant de Rb et de p53 car l'expression du cDNA codant pour l'oncoprotéine E6 ou E7 ne semble pas avoir d'effet sur leur niveau d'ARNm (article 2).
Par contre, nous observons une diminution dépendante de Rb et de p53 du niveau d'ARNm de CdK2. Au niveau protéique, une diminution de la quantité de CdK2 a aussi été mise en évidence (article 2).

Nous avons également mis en évidence une forte diminution de l'activité kinase de CdK2. Cet amenuisement de l'activité kinase n'est pas à corréler avec la diminution de cette protéine ni à une inhibition par des CdKIs. En effet, CdK2 a été précipitée avec un anticorps ne reconnaissant que la forme libre de CdK2. Comment CdK2 est-elle régulée ? L'activation maximale de CdK2 est essentielle pour une progression normale du cycle cellulaire et nécessite plusieurs événements:
-la liaison à une cycline
-la déphosphorylation de la Thr14 et de la Tyr 15, qui lorsqu'elles sont phosphorylées inhibent l'activité de CdK2.
-la présence d'une phosphorylation activatrice (Thr160 pour CdK2) (Johnson et al., 1996; Solomon and Kaldis, 1998)
-une translocation dans le noyau (Montserrat et al., 1999).
Les phosphorylations inactivatrices sont retirées par la phosphatase Cdc25 ou la protéine phosphatase de type 2C (Cheng et al., 1999) et mises en place par les kinases Wee1 et Myt1 (Morgan, 1996; Solomon and Kaldis, 1998).
Des études structurales et biochimiques ont mis en évidence que la phosphorylation activatrice modifie l'interface entre CdK2 et son substrat, ce qui favorise leur interaction (Morgan, 1996; Russo et al., 1996). Cette phosphorylation stabilise aussi son interaction avec les cyclines (Desai et al., 1992; Ducommun et al., 1991).
Cette phosphorylation activatrice est catalysée par les CdK-Activating Kinases (CAK) (Kaldis, 1999). En absence de ces CAKs, Rb ne peut plus être phosphorylée (Wu et al., 2001) puisque les CAKs interagisssent aussi avec CdK4 et CdK6. Ces CAKs sont des complexes composés d'une sous-unité catalytique $p40^{MO15}$ appelée aussi CdK7 (Fesquet et al., 1993; Poon et al., 1993; Solomon et al., 1993; Tassan et al., 1994), d'une sous-unité régulatrice, la cycline H (Fisher and Morgan, 1994; Mäkelä et al., 1994) et d'un facteur de "regroupement" p35 (Mat1 chez la levure) (Fisher et al., 1995; Tassan et al., 1995). Ces CAKs peuvent être inhibées par $p21^{Waf-1}$ ou $p27^{Kip1}$ (Rank et al., 2000; Schneider et al., 1998).

Actuellement, aucune étude n'a été réalisée pour savoir si le niveau d'expression et d'activité de ces protéines régulant la phosphorylation de CdK2 varie suite au stress. Une telle étude est intéressante car la possible inhibition ou chute du niveau d'expression de ces CAKs par $p21^{Waf-1}$ ou par un autre mécanisme expliquerait la diminution de l'activité de CdK et l'hypophosphorylation de Rb.

Une autre question reste en suspens. Est-il possible que l'hypophosphorylation de Rb soit partiellement due à l'action de phosphatase?

La protéine phosphatase de type 1 (PP1) peut s'associer à Rb durant la phase G1 du cycle cellulaire, cette association conduisant à l'hypophosphorylation de Rb (Durfee et al., 1993; Nelson et al., 1997). Cette association temporaire entre PP1 et Rb coïncide avec l'arrêt prolifératif dû à Rb (Rubin et al., 1998). Donc PP1 peut être considérée comme jouant un rôle important dans le cycle cellulaire.
Toutefois, il reste à vérifier si cette phosphatase est activée suite au stress sous $H_2O_2$ en utilisant par exemple un inhibiteur de phosphatase, l'acide okadaïque (Yamashita et al., 1990). Des expériences prélimaires semblent suggérer que PP1 n'est pas activée par le stress subcytotoxique sous $H_2O_2$. En effet, des FHDs IMR-90 stressés sous $H_2O_2$ en présence d'acide okadaïque montrent une proportion de cellules positives pour l'activité SA ß-gal voisine de celle observée chez les IMR-90 stressées sous $H_2O_2$ sans acide okadaïque.

1.2 Contrôle de la surexpression de 4 gènes associés à la sénescence par Rb et p53.

Comme décrit dans l'introduction, Rb contrôle, en SIPS, l'apparition de la morphologie de type sénescent ainsi que l'activité SA ß-galactosidase. L'expression de l'oncoprotéine E7 empêche l'apparition de ces deux biomarqueurs suite à un stress sous $H_2O_2$ tandis que les FHDs IMR-90 transfectés par le vecteur vide (PLXSN) ou un vecteur codant une forme tronquée d'E7 ne pouvant lier Rb présentent bien ces deux biomarqueurs suite au stress (Chen et al., 1998; Chen et al., 2000a). A l'opposé la neutralisation de p53 n'empêche pas l'apparition de la morphologie sénescente après stress (Chen et al., 2000a).
Qu'en est-il de la surexpression de la fibronectine, l'ostéonectine, l'apolipoprotéine J et SM22 observée en SIPS sous $H_2O_2$ et t-BHP?

Les RT-PCR semi-quantitatives (article 3) ont confirmé la surexpression de la fibronectine, l'ostéonectine, de SM22 et de l'apolipoprotéine J induite suite au stress sous $H_2O_2$ comme cela avait déjà été décrit en utilisant des Northern-Blots (Dumont et al., 2000c). L'expression du cDNA de l'oncoprotéine E7 dans les FHDs IMR-90, empêche la surexpression des 4 gènes à 72 heures après traitement sous $H_2O_2$. E7 provoque même une forte diminution du niveau basal d'expression de la fibronectine.
Ces résultats suggèrent que Rb contrôle aussi la surexpression de ces 4 gènes.

On peut se demander quel est le rôle de ces gènes en SIPS.

L'ostéonectine (SPARC) est clairement impliquée dans la régulation de la prolifération. Elle est surexprimée par les FHDs sénescents (Wang et al., 1996) et est réprimée dans les lignées transformées par SV40. La transfection de SPARC dans des lignées de carcinomes produit une inhibition de leur prolifération (Mok et al., 1996). Elle inhibe la prolifération des cellules endothéliales (Sage et al., 1995) et les effets mitogéniques du PDGF et du VEGF par sa capacité de liaison directe à ces facteurs de croissance (Kupprion et al., 1998; Pichler et al., 1996; Raines et al., 1992). Paradoxalement, par rapport à ces effets qui vont dans le sens d'une répression de la division, l'introduction d'un vecteur d'expression anti-sens contre SPARC dans des lignées de mélanomes diminue leur capacité invasive *in vitro* et de formation de métastases *in vivo* (Ledda et al., 1997). De même, à partir d'un cancer de la prostate, la formation de métastases osseuses est favorisée par SPARC (Jacob et al., 1999). Chez les FHDs en SIPS, SPARC peut aussi moduler la réponse des FHDs à des facteurs de croissance. La surexpression de SPARC résulte en une diminution des effets mitogéniques du PDGF sur les FHDs WI-38 en conditions normales. Puisque SPARC est surexprimée ches les FHDs sénescents ou à faible nombre de CPDs exposés à des stress subcytotoxiques oxydatifs, on peut supposer que cette protéine peut participer aux mécanismes d'inhibition de la prolifération chez ces cellules (Dumont et al., 2002).
A l'instar de l'ostéonectine, il a été proposé que la fibronectine puisse elle aussi avoir un rôle dans la prolifération cellulaire. En effet, il a été montré que la fibronectine pouvait réguler la prolifération et la différentiation cellulaire en fonction de sa configuration tridimensionelle (Garcia et al., 1999). De plus, la fibronectine pourrait également protéger contre l'apoptose. Etant un composé majeur de la matrice extracellulaire, la fibronectine, en renforçant l'accrochage cellulaire au substrat, favoriserait la résistance de ces cellules à l'apoptose (Dumont et al., 2002). Il a en effet été démontré que la culture de cellules dans des boîtes de culture préalablement couverte de fibronectine permettait de diminuer l'activation de l'apoptose par privation de sérum (Garcia-Gila et al., 2002).
Rb pourrait donc induire un arrêt prolifératif via le blocage du cycle cellulaire et par la surexpression de l'ostéonectine et de la fibronectine.
L'apolipoprotéine J semble avoir un rôle protecteur contre les stress. En effet, la surexpression de l'apolipoprotéine J diminue la cytotoxicité et la SIPS observée chez les FHDs WI-38 suite à des stress respectivement à des doses cytotoxiques ou subcytotoxiques sous t-BHP et éthanol mais pas sous $H_2O_2$. L'apolipoprotéine J peut lier les régions hydrophobes des protéines partiellement dépliées et solubiliser ces protéines mais en aucun cas elle ne permet le "refolding" de ces protéines (Wilson and Eastbrook-Smith, 2000). Ce mécanisme de solubilisation protégerait les cellules de la cytotoxicité due à la précipitation des protéines (pour une revue: Humphreys et al., 1999). Ces données pourraient expliquer pourquoi l'apolipoprotéine J protège de l'effet des stress sous t-BHP et éthanol mais pas des stress sous $H_2O_2$ celui-ci étant

plus hydrophile. L'$H_2O_2$ générerait moins de dégâts dans les compartiments plus hydrophobes de la cellule (Dumont et al., 2002).
Etant donné son hydrophobicité, l'apolipoprotéine J secrétée peut protéger contre la précipitation des cibles majeures des ROIs comme les protéines de la matrice extracellulaire ou la partie extracellulaire des protéines membranaires participant alors à la stabilisation de la membrane (Wilson and Eastbrook-Smith, 2000).
La fonction de SM22 est aujourd'hui encore mal connue, on sait que SM22 peut se lier à la fibronectine (Fu et al., 2000) et aux fibres de stress (Small and Gimona, 1998). Il est donc possible qu'il intervienne directement dans la morphologie cellulaire suite au stress. L'utilisation d'oligonucléotides antisens premettrait peut-être de répondre à cette question.
Comme dans le cas de la fibronectine, l'apolipoprotéine J semble elle aussi jouer un rôle anti-apoptotique. La surexpression de l'apolipoprotéine J dans des cellules de carcinome rénal diminue l'apoptose induite par l'ajout de cis-platine dans le milieu de culture (Hara et al, 2001).
La surexpression de la fibronectine et de l'apolipoprotéine J pourrait donc expliquer l'absence d'induction de l'apoptose dans notre modèle de stress sous $H_2O_2$ à concentration subcytotoxique. Des niveaux de stress de plus forte intensité provoqueraient l'apoptose malgrè ces surexpressions.

1.3 Rôle de E2F en SIPS (article n°4).

Le facteur de transcription E2F est un hétérodimère composé d'une unité DP (DP1 et DP2) et d'une unité E2Fx (Helin et al., 1993; Zhang and Chellappan, 1995).
Après un stress subcytotoxique sous 150 µM d'$H_2O_2$, nous avons étudié par RNAse protection assay le niveau d'ARNm des principaux composés du facteur de transcription E2F. Ces études ont permis de montrer que la quantité d'ARNm des membres de la famille de E2Fx et de DP ne varie pas à 72 heures après stress (les ARNm de E2F2 et E2F3 sont indétectables). Des conclusions similaires sont obtenues en ce qui concerne la quantité de protéine de ces sous-unités de E2F.

Actuellement, il est admis que la déficience en E2F actif chez les cellules sénescentes serait responsable de la répression des gènes de la transition G1/S (Nevins, 1992); pour une revue: (Farnham et al., 1993). Dans les cellules sénescentes, E2F n'est pas seulement inactif en raison de l'hypophosphorylation de Rb. Il est également inactif parce que l'expression de E2F1 est réprimée. La régulation du cycle cellulaire dépend de E2F1 est normalement exprimée plusieurs heures avant la phase S, est réprimée (Dimri and Campisi, 1994; Dimri et al., 1994b; Slansky and Farnham, 1996). Certains de ces gènes sont impliqués dans la réplication de l'ADN et le métabolisme des nucléotides comme l'ADN polymérase α, PCNA, la DHFR, la TK et la TS (Good et al., 1996).

Quand nous étudions le niveau d'ARNm de DHFR chez les FHDs IMR-90 + E7, nous observons une augmentation importante de ce niveau d'ARNm. Cette augmentation suggère la profonde implication de Rb dans l'expression du gène *DHFR*. En effet, avec l'oncoprotéine E7, nous empêchons l'inactivation de E2F par Rb. Nous avons confirmé que le niveau d'ARNm de DHFR est diminué chez des FHDs IMR-90 sénescents. En SIPS, DHFR n'est pas sous-exprimée et ce, malgré l'hypophosphorylation de Rb. Le fait que le promoteur de *DHFR* contienne aussi des sites de liaisons Sp1 suggère que d'autres facteurs de transcription comme Sp1 (Jensen et al., 1997) pourraient compenser la diminution d'activité de E2F. Le promoteur du gène de $p21^{Waf-1}$ contient aussi 6 sites Sp1 (Vogt and Reed, 1998). Cette hypothèse est séduisante car elle expliquerait pourquoi le niveau d'ARNm de DHFR ne varie pas suite au stress, suite à l'activation de Sp1 et comment $p21^{Waf-1}$ est surexprimée à long terme après les stress, d'une manière indépendante de p53.

Nous avons utilisé un dominant négatif de E2F1 appelé E2F1-d87. Ce dominant négatif garde sa capacité de liaison à l'ADN mais a perdu son domaine de transactivation (Jordan-Sciutto et al., 1997). Après transfection de ce dominant négatif, nous avons observé une diminution de plus de 2 fois du niveau d'ARNm de la DHFR.
Cette transfection a également montré une forte diminution de la quantité d'ARNm de l'ostéonectine. A l'opposé, l'ARNm de l'apolipoprotéine J et de SM22 augmente suite à la transfection de E2F1-d87. Ceci suggère que, en conditions normales, E2F1 limite l'expression de ces deux gènes. Une interprétation est que, en absence de stress induisant la SIPS, E2F inhiberait la surexpression de l'apolipoprotéine J alors que, en SIPS, Rb inhiberait E2F permettant l'expression de l'apolipoprotéine J et la protection des cellules contre des stress ultérieurs.
Le niveau d'ARNm de la fibronectine n'a pas été étudié dans ce cadre. Toutefois, il est connu que le niveau d'expression de la fibronectine est régulé positivement par E2F1 (Jordan-Sciutto et al., 1997).
En conclusion, E2F ne semble pas être responsible totalement du mécanisme par lequel ces 4 gènes sont surexprimés en SIPS.

## Chapitre 2 : Effets du TGF-ß1 sur l'apparition des biomarqueurs caractérisant la SIPS.

De précédents résultats additionnés aux nôtres démontrent que la protéine Rb peut réguler l'apparition de la morphologie sénescente, de l'activité SA ß-galactosidase, l'arrêt du cycle cellulaire et la surexpression de l'ostéonectine, l'apolipoprotéine J, la fibronectine et SM22.
Le TGF-ß1 a été démontré comme pouvant induire une surexpression de chacun de ces gènes. Toutefois, ces travaux ont été réalisés pour chacun de ces gènes dans différents types cellulaires, tels que des cellules musculaires lisses pour SM22, des cellules épithéliales de thyroïde pour l'apolipoprotéine J, des cellules pulpaires pour la fibronectine et l'ostéonectine (Hocevar et al., 1999; Owens, 1998; Reed et al., 1994; Shiba et al., 1998; Wegrowski et al., 1999).
De plus, il a également été démontré que le TGF-ß1 peut induire un arrêt du cycle cellulaire (Herrera et al., 1996) et l'apparition d'une morphologie cellulaire sénescente (Garbi et al., 1990; Katakura et al., 1999). Cet arrêt du cycle cellulaire se fait par surexpression de $p21^{Waf-1}$ ou d'autres CdKIs (Moustakas and Kardassis, 1998; Polyak et al., 1994b), ce qui aurait pu expliquer comment $p21^{Waf-1}$ est surexprimée, indépendamment de p53 (Miyazaki et al., 1998; Yoneda et al., 1999) en SIPS. Ceci était d'autant plus probable que la surexpression du TGF-ß1 est corrélée dans certains modèles avec une diminution de l'activité des CdK4 et 6 (Hannon and Beach, 1994).

Sur base de ces données, nous nous sommes demandés si le TGF-ß1 pouvait médier l'apparition de la morphologie sénescente, l'arrêt prolifératif, l'activité SA ß-gal et la surexpression des 4 gènes associés à la sénescence (fibronectine, SM22, apolipoprotéine J, ostéonectine) en conditions normales sur un même type cellulaire.

Dans l'article n°3, nous avons montré qu'une stimulation par du TGF-ß1 est suffisante pour induire, dans les FHDs IMR-90, l'apparition des différents biomarqueurs cités ci-dessus. Nous avons également montré en introduction à cet article que le TGF-ß1 peut provoquer un arrêt du cycle cellulaire. En effet, des FHDs IMR-90 arrêtent d'incorporer la thymidine tritiée dans l'ADN après stimulation sous TGF-ß1 (Figure 33 dos page 74).
Ensuite, nous avons montré que la quantité d'ARNm du TGF-ß1 augmentait à 24 heures après stress subcytotoxique sous $H_2O_2$ pour se maintenir à un niveau élevé plus de 72 heures après stress. Nous avons montré que la quantité de protéine TGF-ß1 active augmente dans le milieu de culture à 36 heures après stress.

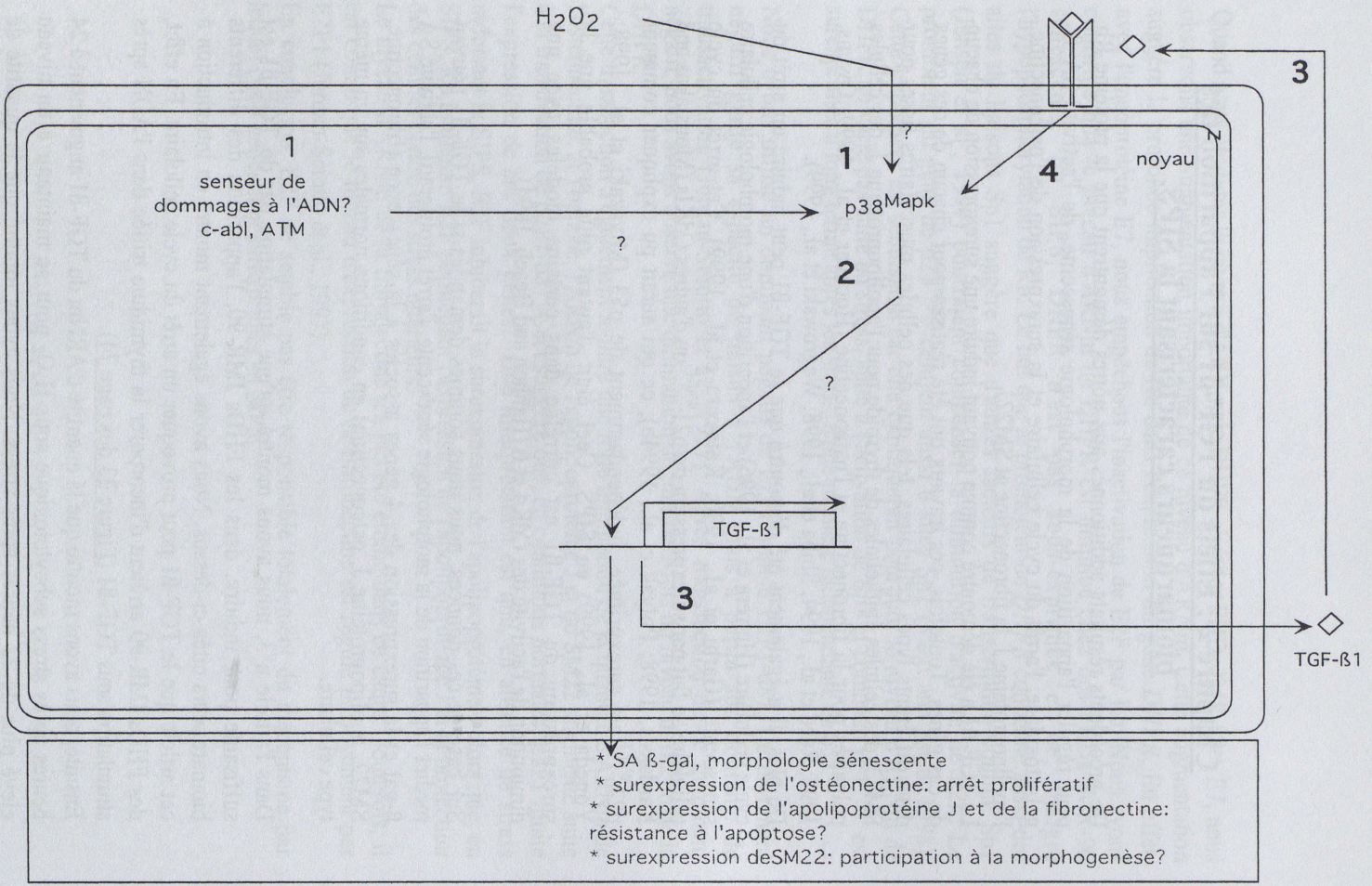



Fig. 36: Voie de p38Mapk régulant la surexpression du TGF-ß1 suite à un stress subcytotoxique sous $H_2O_2$. Les numéros en gras donnent la chronologie relative d'activation de cette voie

Pour ces raisons, nous avons testé si la neutralisation du TGF-ß1, libéré par les cellules, pouvait empêcher l'apparition des biomarqueurs de la sénescence induite prématurément par les stress. Dans ce but, nous avons incubé les FHDs IMR-90 avec des anticorps spécifiques soit du TGF-ß1, soit du récepteur II du TGF-ß avant, pendant et après que les cellules aient été soumises à un stress subcytotoxique sous $H_2O_2$. Dans ces conditions, nous montrons que l'apparition des biomarqueurs de la sénescence est beaucoup moins marquée, que ce soit au niveau de la morphologie cellulaire, de l'activité SA ß-gal ou de la surexpression de la fibronectine, de l'ostéonectine, de SM22 et de l'apolipoprotéine J.
Par contre, l'utilisation d'anticorps neutralisants ajoutés au milieu de culture n'a pas eu d'effet sur l'incorporation de thymidine tritiée: ces anticorps n'empêchent pas l'arrêt prolifératif probablement induit par d'autres mécanismes (réponse aux dommages à l'ADN, etc) (montré en annexe de l'article 3 dos p83) renforçant le fait que $p38^{MAPK}$ est activée bien avant la surexpression du TGF-ß1.

Ce dernier résultat va à l'encontre de l'hypothèse du contrôle de la surexpression de $p21^{Waf-1}$ par le TGF-ß1. En effet, si le TGF-ß1 induisait l'expression de $p21^{Waf-1}$ dans notre modèle, la neutralisation de celui-ci empêcherait le blocage en phase G1 du cycle cellulaire en SIPS. Il est donc plausible que deux mécanismes différents soient mis en route suite au stress subcytotoxique sous $H_2O_2$. Selon cette hypothèse, d'une part, on aurait activation de $p21^{Waf-1}$ conduisant à l'hypophosphorylation de Rb et donc à l'arrêt du cycle cellulaire et d'autre part la libération de TGF-ß1 induisant l'apparition des autres biomarqueurs de la SIPS.

Cependant, en utilisant les fibroblastes IMR-90 + E6 et les fibroblastes IMR-90 + E7, nous démontrons que la surexpression du TGF-ß1 semble être partiellement dépendante de p53 et totalement de Rb suggérant que la voie de Rb peut réguler la production d'ARNm du TGF-ß1 en SIPS. De plus, les ELISA réalisés sur ces mêmes cellules montrent qu'il n'y a plus libération de TGF-ß1 par les fibroblastes IMR-90 + E6 ou + E7 après stress.
Ces résultats s'additionnent à ceux qui montrent un contrôle de la surexpression de la fibronectine, l'ostéonectine, l'apolipoprotéine J et SM22 par Rb causée par les stress subcytotoxiques sous $H_2O_2$.
Ceci signifie que ces deux voies (TGF-ß1, Rb) sont profondément entrelacées et semblent s'additionner dans la régulation des biomarqueurs de la SIPS.

A la vue de cette conclusion, on pourrait imaginer que le blocage du TGF-ß1 puisse être utilisé préventivement pour limiter l'effet à long terme des stress oxydatifs dans divers types cellulaires où la SIPS est observée. Toutefois, ce serait oublier que l'action du TGF-ß1 est dépendante du type cellulaire. Selon, le type cellulaire, il peut-être anti- ou pro-prolifératif. A cette donnée s'additionne la notion de dose. En effet, comme c'est le cas pour de nombreux facteurs de

croissance, l'effet du TGF-ß1 sur la prolifération cellulaire peut être diamètralement opposé selon la dose de TGF-ß1 utilisée. Un exemple est le niveau d'expression de l'apolipoprotéine J suite à une stimulation au TGF-ß1. Si, sous 1 ng/ml de milieu on observe une forte augmentation de son niveau d'ARNm, il n'y a plus de surexpression à 10 ng/ml (voir article n°3).

# Chapitre 3: Voie d'action du TGF-ß1 et relation TGF-ß1-Rb.

La Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) p38 est connue pour être activée suite à des stress sous UV ou sous $H_2O_2$ (Chen et al., 2001b; Volonte et al., 2001). La cible principale de cette kinase est le facteur de transcription ATF-2 (Waas et al., 2001).
Le promoteur du gène du TGF-ß1 comme celui de son récepteur de type II, présente outre des sites Sp1, un site sur lequel peut se fixer le facteur de transcription ATF-2 (Bae et al., 1995; Gaiser et al., 1993). Qui plus est, il a été montré que l'activation du facteur de transcription ATF-2 pouvait conduire à l'expression du TGF-ß1 (Hollingsworth et al., 1993; Kim et al., 1992).
Ensemble, ces données suggèraient que suite à un stress sous $H_2O_2$, la MAPK p38 serait activée et provoquerait une surexpression du TGF-ß1 via l'activation du facteur de transcription ATF-2. C'est pourquoi, nous avons utilisé le SB203580, un inhibiteur spécifique de la $p38^{MAPK}$, et aussi des oligonucléotides antisens anti-ATF-2.
Outre le contrôle de l'expression du TGF-ß1 par $p38^{MAPK}$, on a déjà vu que la protéine Rb est elle aussi responsable de la surexpression du TGF-ß1 dans notre modèle.
Ces résultats renforcent l'hypothèse d'un mécanisme comprenant la voie de Rb et de $p38^{MAPK}$ lors de l'établissement de la SIPS.

## 3.1 Comment le TGF-ß1 régule-t-il l'apparition des biomarqueurs de la sénescence en SIPS ? (article 4)

Précédemment, nous avons démontré que $p38^{MAPK}$ est responsable avec Rb de la surexpression du TGF-ß1 suite à un stress subcytotoxique sous $H_2O_2$. Paradoxalement, l'équipe de Hanafusa a montré que le TGF-ß1 pouvait activer la voie de $p38^{MAPK}$ (Hanafusa et al., 1999).
Dès lors, nous nous sommes intéressés à $p38^{MAPK}$ comme cible du TGF-ß1 et non plus comme facteur déclenchant la surexpression du TGF-ß1. Si une activation de $p38^{MAPK}$ est observée suite à la libération du TGF-ß1 dans le milieu de culture, il est envisagable de supposer un système de boucle où $p38^{MAPK}$ serait à la fois responsable de la surexpression du TGF-ß1 et, subséquemment, la cible de celui-ci.
Nous observons une activation de $p38^{MAPK}$ suite au stress (1 voir schèma récapitulatif). Cette activation qui apparaît directement après stress se maintient plus de 72 heures après ce même stress tandis que comme déjà décrit précédemment, l'augmentation du niveau protéique du TGF-ß1 n'apparaît que 36

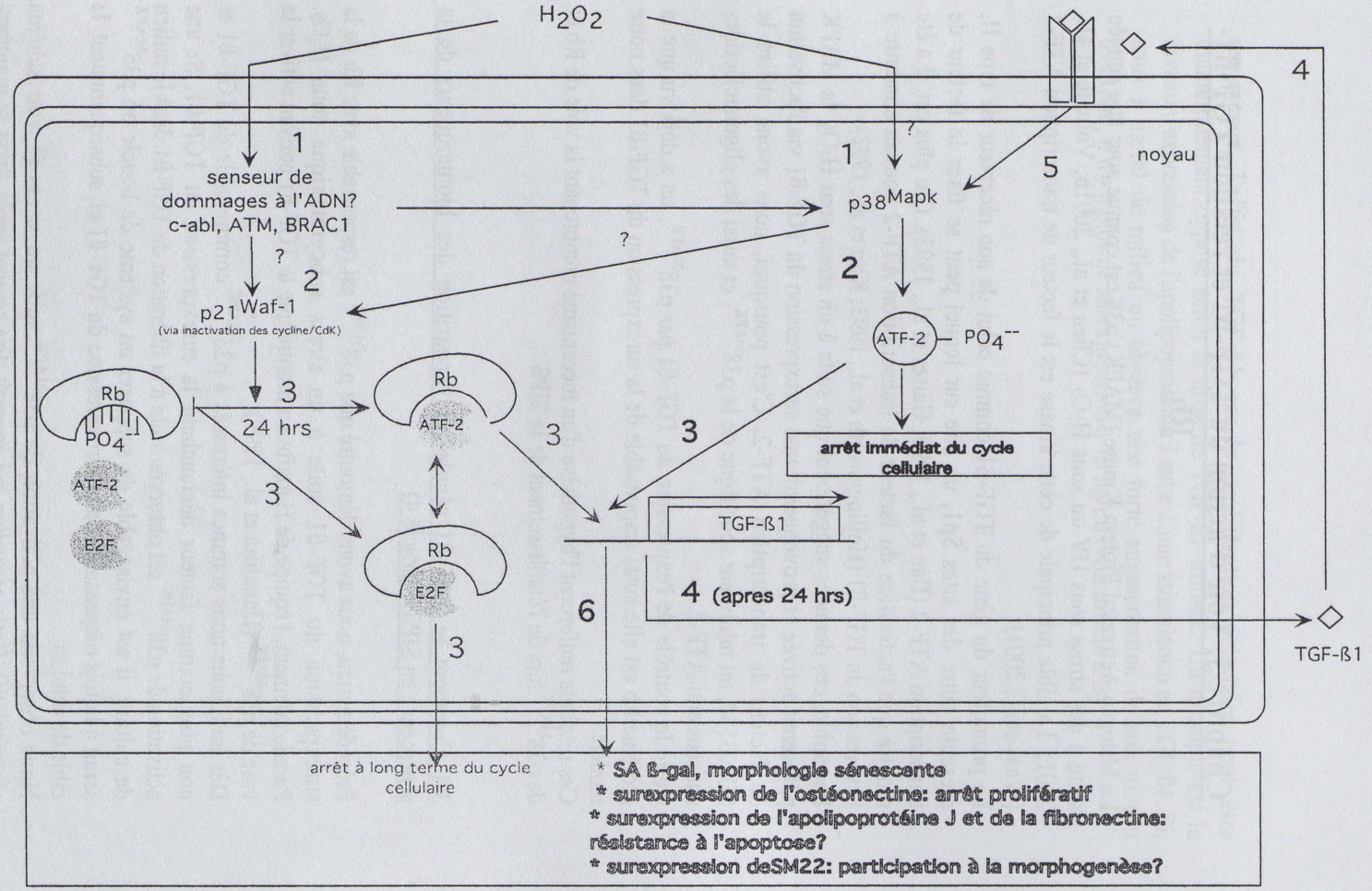



Fig. 37: Voie proposée de régulation de l'apparition des biomarqueurs de la sénescence réplicative suite à un stress subcytotoxique sous $H_2O_2$. Les numéros en gras donnent la chronologie relative d'activation de cette voie

heures après le stress. L'activation de $p38^{MAPK}$ à donc lieu bien avant la surexpression du TGF-ß1.
De plus, l'inhibition de $p38^{MAPK}$ par un inhibiteur spécifique (SB203580) bloque l'apparition de la morphologie cellulaire sénescente, l'activité SA ß-gal, la surexpression de la fibronectine, l'ostéonectine, SM22 et l'apolipoprotéine J.
$p38^{MAPK}$ semble également intervenir dans l'arrêt de croissance observé après stress. En effet, l'inhibition de $p38^{MAPK}$ entraîne une diminution plus faible de l'incorporation de thymidine tritiée des FHDs IMR-90 après stress. Toutefois cette diminution reste importante suggérant que d'autres mécanismes sont responsables partiellement de cet arrêt. Un bon candidat est Rb qui est progressivement hypophosphorylée s'associant ainsi à E2F n'autorise plus l'expression de nombreux gènes tels la TK, la DHFR, etc tous nécessaires à la formation de l'ADN.

Ces résultats suggèrent que le TGF-ß1 active la voie de $p38^{MAPK}$ pour réguler l'apparition des biomarqueurs de la sénescence en SIPS.
En parallèle, nous montrons aussi que la neutralisation du TGF-ß1 par l'utilisation d'anticorps spécifiques ajoutés dans le milieu de culture n'empêche pas l'activation à court terme de $p38^{MAPK}$ suite au stress. Par contre, l'activation de $p38^{MAPK}$ à long terme diminue fortement.

Il y a donc au moins deux types de contrôle de l'activation de $p38^{MAPK}$. $p38^{MAPK}$ est activée (étape 1 Fig. 37), dans un premier temps, directement suite au stress. Ce premier temps d'activation permet la surexpression et la libération du TGF-ß1 dans le milieu de culture (étapes 2 à 4 Fig. 37). Dans un second temps, ce TGF-ß1 active la voie de $p38^{MAPK}$ et induit l'apparition des biomarqueurs de la sénescence en SIPS (étape 5 Fig. 37).
Cette activation de $p38^{MAPK}$ pourrait aussi expliquer pourquoi la neutralisation du TGF-ß1 par des anticorps n'empêche pas le blocage du cycle cellulaire après stress puisque ce blocage est dû à l'activation à court terme de $p38^{MAPK}$.
Il se met donc en place, suite au stress subcytotoxique sous $H_2O_2$, une boucle. La seconde phase d'activation de $p38^{MAPK}$ permettant alors la surexpression à long terme du TGF-ß1, cette surexpression maintenant l'activation de $p38^{MAPK}$.
Cette boucle pourrait aussi s'auto-entretenir par un niveau en $H_2O_2$ plus élevé. En effet, il a été montré que le TGF-ß1 peut activer une NAD(P)H oxydase membranaire qui produit, 16 hrs après stimulation par le TGF-ß1, de l'$H_2O_2$ (Thannickal and Fanburg, 1995; Thannickal et al., 1993). $H_2O_2$ qui à son tour réactiverait la boucle TGF-ß1-$p38^{MAPK}$. De même, l'activation de $p38^{MAPK}$ suite à un stress sous UV-B chez des kératinocytes humains est connue comme induisant une surexpression de la cyclooxygénase-2 entraînant la production de ROI (Chen et al., 2001b). La cyclooxygénase-2 est un enzyme qui catalyse la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines (Dubois, 1998).

Des travaux récents montrent que les cellules Hela et des kératinocytes surexprimant le facteur de transcription c-Rel, entrent dans un état de sénescence prématurée. Selon ces travaux, cette surexpression pousse les mitochondries à surproduire de l'$H_2O_2$ via une surexpression de la Mn-SOD (Bernard et al., 2001). De plus, le facteur de transcription c-Rel peut induire la surexpression de la cyclooxygénase-2 (Yamamoto et al., 1995) bien que la surexpression de c-Rel dans des kératinocytes n'a pas conduit à la surexpression de la COX-2 (Thèse de Bernard David, Université des Sciences et Techniques de Lille 1).

3.2 Relation entre Rb et la voie de $p38^{MAPK}$.

Nous avons suggéré une relation plus ou moins directe entre la voie du TGF-ß1 et la voie de Rb en SIPS (article 3 et 4).
Outre l'activité inactivatrice de Rb, ce dernier sous sa forme hypophosphorylée peut lier et activer le facteur de transcription ATF-2 (Hollingsworth et al., 1993; Kim et al., 1992). ATF-2 est composé d'un domaine de liaison à l'ADN divisé en une région d'acides aminés basiques et une région ZIP (tirette à leucine). ATF-2 peut, pour interagir avec l'ADN, former des hétérodimères avec le facteur de transcription c-JUN. Cette affinité pour c-JUN et son site de liaison à l'ADN très proche de celui des membres de la famille AP-1 lui permet de se lier au site CRE (cAMP Responsive Element) (Hai and Curran, 1991).

ATF-2 était donc un point commun potentiel entre la voie de Rb et celle de $p38^{MAPK}$. Nos expériences de co-immunoprécipitations ont montré que ATF-2 se lie à Rb à 24 heures après stress, montrant une sorte d'effet coopératif entre $p38^{MAPK}$ et Rb dans l'établissement de la SIPS (étapes 1 et 2 sur le schéma récapitulatif). L'utilisation d'oligonucléotides antisens anti-ATF-2 a permis de mettre en évidence que $p38^{MAPK}$ active ATF-2 pour médier la surexpression du TGF-ß1 induite par les stress. De même, l'utilisation de ces antisens supprime l'apparition des biomarqueurs de la sénescence en SIPS. Toutefois, la "protection" engendrée par les oligonucléotides antisens anti-$p38^{MAPK}$ ou anti-ATF-2 (article 4) contre l'arrêt prolifératif est partielle confirmant que d'autres mécanismes sont aussi responsables de cet arrêt, comme l'inhibition progressive de E2F par Rb. ATF-2 serait-il partiellement responsable de la surexpression de $p21^{Waf-1}$? Cette hypothèse est soutenue par la présence d'un site AP-1 dans le promoteur de $p21^{Waf-1}$ (El-Deiry, 1998).

En conclusion, nous avons montré que $p38^{MAPK}$ est activée suite au stress subcytotoxique sous $H_2O_2$. Cette activation conduit à une surexpression du TGF-ß1, ce qui réactive la voie de $p38^{MAPK}$. Nous montrons également que les voies de Rb et de $p38^{MAPK}$ sont interconnectées par le facteur de transcription ATF-2, ce qui ne semble pas être le cas dans la sénescence réplicative. En effet, des EMSA réalisées avec la séquence CRE sur laquelle ATF-2 se fixe ne montrent

aucune différence entre les FHDs WI-38 jeunes et les sénescents (Atadja et al., 1995). Le TGF-ß1 ne semble pas non plus être responsable de la sénescence *in vivo*. Il a en effet été démontré que les cellules de muscles lisses sénescentes ne peuvent plus répondre au stimuli anti-prolifératif TGF-ß1 (McCaffrey et al., 1993). Ces résultats combinés suggérent que la sénescences réplicative et la SIPS sont deux processus discrets bien que possédant de nombreux point communs comme le phenotype très proches.

D'autres liens entre Rb et $p38^{MAPK}$ restent possibles et méritent d'être explorés comme par exemple l'oncoprotéine Ras ou encore la protéine c-abl.

La famille codant notamment le gène *Ras* comprend des protéines activées lors de la transduction du signal induite par les récepteurs tyrosine kinase (Barbacid, 1987; Cahill et al., 1996).
Il est intéressant de constater que de nombreux travaux ont mis en évidence la nécessité de la présence de Ras dans la transduction du signal du TGF-ß1 (Hartsoug et al., 1996; Thannickal et al., 2000; Yan et al., 1994; Yue and Mulder, 2000) mais aussi que la surexpression de *ras* dans des FHDs IMR-90 provoque un vieillissement prématuré de ces cellules (Serrano et al., 1997). Cette sénescence prématurée serait due à l'accumulation de p53 et de $p16^{Ink-4a}$. De plus Ras peut aussi réguler l'expression de $p21^{Waf-1}$ (El-Deiry, 1998).
Ras peut également être activée suite à un stress oxydatif comme cela été démontré dans des cellules épithéliales (Aikawa et al., 1997). De plus, il a été démontré que Ras intervient dans la voie du TGF-ß1. La suppression de Ras empêche l'activation Smad-dépendante de la voie du TGF-ß1 suite à une stimulation par du TGF-ß1 (Hartsoug et al., 1996; Yue and Mulder, 2000). De plus, Ras peut activer la voie de $p38^{MAPK}$ via TAK-1 comme cela a été démontré sur les cellules HeLa stimulées par de IL-1 (Palsson McDermott and O'neill, 2002). Il est intéressant de constater que TAK-1 peut également activer la voie de NF-kappaB suite à une stimulation à l'IL-1 (Ninomiya-Tsuji et al, 1999). Cela signifie donc que le TGF-ß1 libéré à 36 hrs après stress pourrait activer la voie de NF-kappaB conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire et/ou à l'activation d'une NO synthase inducible par NF-kappaB, provoquant la libération de ROI (Xie et al., 1994). Il faut donc peut-être ajouter NF-kappaB comme médiateur de l'inhibition de la prolifération, en plus de $p38^{MAPK}$ et Rb/E2F.
Face à ceci, il a été montré, au sein de notre laboratoire, que des fibroblastes WI-38 stimulés de manière répétée avec du TNF-α et de l'IL-1 présentent la morphologie caractéristique de la sénescence (Dumont et al., 2000c). L' IL-1α, le TNF-α et le TGF-ß1 peuvent induire une production transitoire d'espèces chimiques réactionnelles dérivées de l'oxygène moléculaire (Thannickal and Fanburg, 1995). Ce passage, induit par TNF-α et l'IL-1, vers la morphologie sénescente pourrait être dû à une augmentation de la production de ROS comme le suggère les expériences réalisées en présence de l'antioxydant N-

acetylcystéine (Dumont et al., 2000a). Il est donc possible que Ras soit activée suite au stress utilisé dans notre modèle de SIPS ou suite à des stimulations répétées au TNF-α et à l'IL-1α.

Comment $p38^{MAPK}$ est-elle activée suite au stress sous $H_2O_2$?

La réponse vient peut-être de la protéine c-Abl. Il s'agit d'une protéine tyrosine kinase dont la fonction exacte est encore inconnue. Cette protéine a été montrée comme pouvant activer $p38^{MAPK}$ chez des FHDs ayant subi un traitement avec du cis-platine ou avec de la 1-ß-D-arabinofuranosyl-cytosine, deux molécules générant des dommages au niveau de l'ADN. Des fibroblastes NIH-3T3 c-Abl $^{-/-}$ ne peuvent plus activer $p38^{MAPK}$ (Pandey et al., 1996). C-abl serait activée directement suite à la présence de dégâts à l'ADN ou indirectement via phosphorylation par ATM (Brown et al.,1997). ATM est une protéine senseur de dégâts à l'ADN qui a pour cible la protéine p53 (Banin et al.,1998). Il existe d'autres senseurs aux dommages à l'ADN comme les DNA-PK toutefois leur implication semble improbable car leur voie d'activation passe par p53 (Woo et al., 1998).

Une autre possibilité pour expliquer l'activation de $p38^{MAPK}$ est d'imaginer les ROI comme des messagers secondaires. Cette notion suppose que les ROI activeraient directement l'une ou l'autre voie de transduction du signal. La question principale est alors: comment les ROI sont-ils capable d'une telle activation? Une réponse vient des effets de ces ROI sur les protéines. Une protéine sous une forme inactive peut devenir active (ou inversément) suite à un changement de conformation due à la formation de ponts disulfures ou par oxydation de résidus cystéines (-SOH) (Thannickal et Fanburg, 2000). Ce mécanisme totalement réversible grâce notamment à l'oxydation de glutathion s'accorde très bien avec l'activation très rapide de $p38^{MAPK}$ suite au stress sous $H_20_2$. Ce mécanisme de régulation redox serait notamment impliqué dans dans la régulation de la liaison à l'ADN de différent facteurs de transcription comme c-jun ou p53. Par exemple, l'oxydation des résidus cystéine de p53 diminue sa capacité à se lier à l'ADN (Thannickal et Fanburg, 2000) expliquant peut-être l'indépendance de la surexpression de $p21^{Waf-1}$ vis à vis de p53. Un autre exemple de tels mécanismes de régulation redox nous vient d'*Escherichia Coli.* interviennent les facteurs de transcription SoxR et OxyR. L'activité transcriptionelle de SoxR est régulée par l'oxydation d'un domaine fer-soufre. Lorsque ce domaine est oxydé, le facteur de transcription est activé ce qui provoque une surexpression du gène soxS. Le produit de cette activation active à son tour de nombreuses protéines comme la catalase et la superoxyde dismutase. OxyR est lui activé par l'oxydation de résidus cystéines provoquant la mise en place d'une conformation tri-dimensionelle activatrice (Ruddock et Klappa, 1999).

# Chapitre 4: sénescence induite prématurément par les stress, sénescence réplicative et vieillissement *in vivo*.

Depuis la nuit des temps, tous les systèmes biologiques sont exposés à des stress de différentes natures. Ces derniers participent à la sélection naturelle et à l'évolution biologique. La réponse immédiate à des facteurs de croissance, à des cytokines et à des stress comme l'exposition à des dérivés de l'oxygène, les radiations ionisantes, les chocs thermiques, l'hypoxie,... est du plus grand intérêt. La réponse à long terme, de quelques jours à plusieurs semaines après stress est, elle aussi, le sujet de nombreux travaux.

Un cadre théorique a été développé pour comprendre la relation existant entre les stress et la sénescence réplicative. Nous allons maintenant expliquer ce cadre théorique.

## 4.1 Cadre théorique: effets des stress sur le comportement cellulaire

Les cellules, selon l'intensité et la durée des stress peuvent réagir différement. Premièrement, les stress d'intensité faible que nos cellules subissent constamment n'altèrent pas immédiatement la stabilité du système cellulaire. Néanmoins, ils représentent de petites variations de différents paramètres biologiques qui, s'ils ne sont pas corrigés ou réparés rapidement, peuvent devenir définitifs et s'accumuler sans nécessairement affecter immédiatement la cellule. Certains sous-systèmes cellulaires, en augmentant leur activité, compensent alors les défauts des autres. Toutefois, au-dessus d'un seuil, ces sous-systèmes ne peuvent plus compenser les modifications dues au stress et la stabilité du système est alors perdue (Toussaint et al., 1991). Les cellules peuvent alors, si les dégâts qui leur sont occasionnés ne sont pas trop importants, changer d'état d'organisation. Ce nouvel état thermodynamique est caractérisé par une importante accumulation de dégâts et par une activité biochimique moindre. Cette capacité, au cours du temps, à passer à travers différents états thermodynamiques semble être la manifestation du vieillissement normal. Quand l'accumulation de dégâts intracellulaires est trop importante, les cellules ne peuvent plus changer d'état thermodynamique et meurent alors par apoptose si l'activation de celle-ci est encore possible. Si ce n'est plus possible, les cellules sont éliminées par nécrose.
Ce long processus d'accumulation de dommages peut expliquer la sénescence. Les raccourcissements télomériques observés au cours du "vieillissement" cellulaire en sont l'illustration. En effet, ils peuvent être vu comme des dégâts à l'ADN qui s'accumulent suite à une déficience des systèmes de réparation et de duplication de l'ADN. Nous discuterons plus tard de l'apparition de la sénescence due à l'accumulation de dommages ou au raccourcissement télomérique.

Deuxièmement, si les stress sont d'intensité modérée, les stress peuvent être considérés comme ayant un effet stimulant sur les systèmes de réparation tant que ceux-ci ne provoquent pas l'accumulation de dommages irréversibles. Ceci est designé par le mot anglais "hormesis". Cette notion peut être illustrée par le pré-traitement de *C. elegans* à des températures sublétales qui lui confère alors une thermotolérance plus importante et une augmentation de la durée de vie (Lithgow et al., 1995).

Une troisième situation possible est celle où des stress oxydatifs intenses, courts et répétés sont générés. Il peut arriver dans ces situations que les systèmes de défense soient dépassés. Si les dégâts produits ne sont pas réparés rapidement, ils deviennent irréversibles. Cela correspond aux conditions thermodynamiques de perte de stabilité (Toussaint et al., 1991). La cellule passe alors a un nouvel état thermodynamique stable caractérisé par un niveau de dégâts plus important et une activité biochimique générale diminuée. Selon le type cellulaire, ces conditions peuvent mener au phénotype de la sénescence induite prématurément par les stress ou à l'apoptose.
Différents groupes ont montré que l'exposition de cellules humaines prolifératives comme des fibroblastes de peau ou de poumon, des mélanocytes, des cellules endothéliales, etc... à des stress subcytotoxiques sous UV, peroxyde d'hydrogène, éthanol, hyperoxie, peroxydes organiques, etc... induit la SIPS (pour une revue: (Toussaint et al., 2000b)). Les cellules en SIPS partagent avec les cellules sénescentes de nombreuses caractéristiques comme un arrêt irréversible du cycle cellulaire, une morphologie étalée, une forte augmentation de l'activité SA ß-gal, etc.

Un quatrième cas est l'activation cellulaire. D'une part, il a souvent été observé que des stimuli spécifiques ou les stress activent directement des voies de transduction du signal qui vont modifier le comportement cellulaire qui adopte alors des trajectoires fort différentes allant jusqu'à l'apoptose. D'autre part, il existe des processus d'activation qui ne semblent pas modifier le comportement cellulaire directement ou à la première stimulation.
La frontière entre l'activation cellulaire et la SIPS n'est pas une limite nette:
Il a été montré que la voie activée par le TNF-α induit une augmentation transitoire de la production d'espèces chimiques intermédiaires dérivées de l'oxygène (ROI) agissant alors comme messager secondaire (Meier et al., 1993). La SIPS peut donc être induite par des stimulations répétées à faibles doses avec du TNF-α ou avec de l'IL-1. L'addition d'un antioxydant comme la N-acetylcystéine dans le milieu de culture protège les cellules stimulées par du TNF-α ou de l'IL-1 de l'entrée en SIPS prouvant que la SIPS induite par ces cytokines est due à la production de ROI (Dumont et al., 2000a).
Le TNF-α et l'IL-1 sont des cytokines libérées par les cellules suite à un grand nombre de stimulis comme la présence de produits microbiens, de virus, de lymphocytes T activés, etc. On comprend donc que ces cytokines pourraient être partiellement responsables de la SIPS *in vivo*.

La cinquième situation est le cas de stress très cytotoxiques conduisant directement à la mort cellulaire par nécrose.

4.2 Deux types de sénescences?

Nous avons décrit un cadre théorique permettant de classifier le comportement cellulaire face aux stress. Evidemment, la SIPS, la nécrose, l'apoptose et l'activation sont le résultat de l'interaction des cellules avec leur environnement. Ce résultat ne dépend pas seulement de la magnitude (dose, concentration de la molécule stressante) et de la durée du stress mais aussi de l'efficacité du mécanisme de défense, d'élimination et de réparation cellulaire.
Ce cadre théorique permet de comprendre la relation complexe existant entre la sénescence réplicative et la SIPS et par-delà approcher la compréhension du vieillissement. En fait, l'accumulation faible mais progressive de dommages cellulaires permet le comptage "stochastique" du temps qui passe.
Dans les cellules normales prolifératives, ne présentant pas d'activité télomèrase, le raccourcissement télomérique a lieu de manière discrète à chaque division cellulaire. Ce raccourcissement des télomères peut être perçu comme une forme particulière de dégâts à l'ADN qui s'accumulent et permettent le comptage de nombre de divisions réalisées. L'effet particulier de ce raccourcissement sur la sénescence peut être appelé la sénescence dépendante du raccourcissement des télomères.
Il apparaît aujourd'hui que les télomères sont le signe d'un mécanisme universel qui limite la durée de vie proliférative des cellules normales n'exprimant pas la télomèrase. La plupart des cellules primaires n'expriment pas ou très peu de télomèrase, il en résulte donc une érosion des extrémités télomériques. Ces chromosomes courts peuvent induire une fusion chromosomique provoquant une déchirure de ceux-ci lors de la division cellulaire. Ces fusions, ces télomères courts sont probablement considérés par la cellule comme des dégâts à l'ADN. En accord avec cette théorie, p53 est surexprimé lors de la sénescence induite par les télomères courts (Gonzales-Suarez et al., 2000; Rudolph et al., 2001).

Actuellement, la définition de la sénescence est soumise à controverse, en effet deux théories s'affrontent sans qu'aucun consensus n'ait pu être établi.
La première définition est la sénescence comme un arrêt irréversible du cycle cellulaire induit par les télomères courts (définition 1) (Wright and Shay, 2001). D'autres auteurs ont élargi cette définition à une définition fonctionnelle de l'arrêt du cycle cellulaire. Cet arrêt pouvant alors avoir différentes causes comme la surexpression de proto-oncogènes ou encore la présence dans le milieu de culture de molécules générant des dommages (définition 2). Selon cette deuxième définition, la sénescence dépendante des télomères n'est qu'un sous-type de sénescence. Les télomères ont été décrits comme la barrière ultime contre l'immortalisation cellulaire. L'exclusivité de la sénescence dépendante des télomères courts réside dans le mot

«ultime». Toutes les autres formes de sénescence représentent aussi une barrière contre l'immortalisation cellulaire tant qu'un arrêt irréversible du cycle cellulaire est observé. Ceci exclu donc les stress ne générant qu'un arrêt transitoire du cycle cellulaire.
La pratique habituelle de cultiver les cellules sous une atmosphère contenant 20% d'oxygène est évidemment une source de stress pour les cellules (Serrano and Blasco, 2001). Dans cette perspective, considérant la définition 1 de la sénescence, toutes les cellules qui arrêtent de se diviser avant que leurs télomères n'aient rejoint une taille critique ne sont pas en sénescence mais en SIPS. Cela veut dire que, quand les fibroblastes humains (HDFs) en culture deviennent post-mitotiques, une partie de ceux-ci le sont suite aux conditions de culture et l'autre suite à une taille de télomère en dessous du seuil critique.
Cela veut donc aussi dire que si l'on compare deux cultures d'une même souche de HDFs dont l'une est soumise à un stress oxydatif plus faible, la proportion de cellules en SIPS dans la culture à stress oxydatif "intense" contiendra plus de cellules en SIPS tandis que l'autre culture contiendra plus de cellules répondant à la définition 1 de la sénescence, c'est-à-dire des cellules post-mitotiques ayant des télomères courts (à moins que les stress ne provoquent un raccourcissement des télomères dû à des cassures simple brin).

En conclusion, il est simpliste de considérer que la réponse aux stress est un processus tout ou rien impliquant l'ensemble des cellules d'une culture (ou d'un tissu).

Wright et Shay (Wright and Shay, 2001) ont supposé qu'il est possible, pour chaque type cellulaire, de trouver des conditions de culture qui minimisent les stress et permettent de garder les télomères courts comme seule barrière à l'immortalisation. Quand des kératinocytes humains sont cultivés dans un milieu de culture chimiquement défini, le nombre de passages en culture que ces cellules peuvent réaliser est largement en dessous de 50 (Green et al., 1977). Cinquante passages en culture correspondent bien mieux à une situation où les cellules entrent dans une sénescence réplicative dépendante des télomères plutôt que les 15 à 20 passages réalisés par les kératinocytes en culture dans ce milieu défini. Chez les kératinocytes n'effectuant que 20 CPD, l'arrêt prolifératif est dû à la surexpression de la CdKI $p16^{Ink-4a}$ et ce totalement indépendamment des télomères. La neutralisation de ce système avec une surexpression de la télomèrase immortalise les kératinocytes sans affecter d'autres mécanismes de différenciation ou de croissance (Dickson et al., 2000; Kiyono et al., 1998).
Il est aussi observé dans ces cultures confluentes une accumulation de la CdKi $p27^{Kip-1}$ et une sous-expression et une hypophosphorylation de Rb. En parallèle, ces cellules surexpriment $p21^{Waf-1}$ et $p16^{Ink-4a}$. Après sous-cultures de ces cellules confluentes, il est observé une diminution de $p27^{Kip-1}$ et la phosphorylation de Rb précédent une reprise de la prolifération normale et la sous-expression de $p16^{Ink-4a}$. Cela signifie que les cellules peuvent accumuler les CdKIs $p27^{Kip-1}$, $p21^{Waf-1}$ et $p16^{Ink-4a}$

indépendamment de la sénescence (Munro et al., 2001). Dans ce cas aussi, la capacité à reprendre les divisions cellulaires dépend du temps ou les cellules sont restées bloquées en phase G0. Dans le cas contraire, il serait étonnant d'observer des FDHs en arrêt prolifératif, suite à une culture sous 20 % d'oxygène, de reprendre la division suite à une diminution de la pression partielle en oxygène.
Les facteurs de croissance ou de survie peuvent induire une (sur)expression de systèmes de réparations, et le manque de ces différents facteurs peut favoriser l'accumulation de dommages suite à des stress oydatifs et même conduire à l'apoptose. Si ce manque se prolonge, il peut devenir létal. Si ces facteurs sont fournis à temps, la croissance cellulaire peut reprendre plus facilement. Ce concept n'est pas neuf. Il a été montré que l'insulin-like growth factor-1 augmente la capacité réplicative des cellules satellites musculaires en favorisant la transition G1/S via l'activation de la voie de la phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt (Chakravarthy et al., 2000).
Un fort pourcentage en sérum dans le milieu de culture ne signifie pas nécessairement que les cellules qui y sont cultivées vont rejoindre la sénescence réplicative dépendante des télomères courts. D'un côté, non seulement certains composés du sérum peuvent êtres oxydés et affectent directement la membrane cellulaire ou les effecteurs transmembranaires, ou indirectement en induisant des stress oxydatifs. Certains composants du sérum peuvent également produire des ROI comme l'amine oxydase (Parchment et al., 1990). D'un autre côté, le sérum contient des antioxydants comme la vitamine E ou des "quenchers" de ROI comme les protéines du sérum. Quand des FDHs sont exposés à des concentrations cytotoxiques en t-BHP, une meilleure survie est observée quand une quantité équivalente à celle apportée par le sérum est ajoutée dans le milieu de culture (Toussaint et al., 1994).
Les fibroblastes de souris étant plus sensibles aux stress de différentes natures que les FDHs (Kapahi et al., 1999), il n'est pas étonnant que ces fibroblastes acquièrent le phénotype sénescent suite à un stress dû à une culture sous 20 % d'$O_2$. L'arrêt du cycle cellulaire semble dû à la surexpression de la CdKI $p16^{Ink-4a}$. Par contre, chez les FDHs la sénescence induite prématurément par les stress semble être due à la surexpression de $p21^{Waf-1}$. Lors de la sénescence réplicative des FDHs une très forte surexpression de $p21^{Waf-1}$ est observée durant les deux ou trois passages précédant la sénescence puis, son niveau diminue. Durant cette période, l'ARNm et le niveau protéique de $p16^{Ink-4a}$ augmentent très fortement (Alcorta et al., 1996).

4.3 Le raccourcissement télomérique et la SIPS: discussion

L'hyperoxie sous 40 % d'oxygène est un stress suffisamment doux pour permettre plusieurs passages des FDHs WI-38 sur avant que l'arrêt irréversible de l'ensemble de la population cellulaire n'ait lieu. Les FDHs WI-38 cultivés sous 40% d'oxygène montrent un raccourcissement des télomères de l'ordre de 500 pb/CPD tandis que les cellules cultivées en normoxie ne présentent un raccourcissement que de 90 pb/CPD. Dans les deux situations, la normoxie et l'hyperoxie, les cellules rejoignent un arrêt

irréversible du cycle cellulaire quand la longueur télomérique atteint une moyenne de 2 kb (Von Zglinicki et al., 1995b).
Une interprétation évidente est que les dommages aux télomères sont directement responsables du raccourcissement de ceux-ci, conduisant alors à un arrêt du cycle cellulaire télomères dépendant. La difficulté dans cette interprétation réside dans l'idée que si les dommages à l'ADN induits par les stress sont seuls responsables du raccourcissement télomérique alors ce raccourcissement devrait être bien plus important. En fait, les dégâts à l'ADN généré par les stress sont "stochastiques" et ont lieu aussi dans d'autres parties des chromosomes que les extrémités télomèriques même s'il est connu que ces extrémités sont plus sensibles aux stress que le reste du chromosome (Petersen et al., 1998). Une autre interprétation est que la sénescence prématurée ait lieu sans raccourcissement télomérique. Des FDHs stressés 2 fois par semaine sous 75 µM d'$H_2O_2$ ne présentent pas de raccourcissement des télomères alors que les biomarqueurs classiques de la sénescence sont bien présents (Chen et al., 2001a). Il est fort probable que cette usure télomérique n'ait pas lieu car elle nécessite des divisions cellulaires pour apparaître et être détectable (Munro et al., 2001).
Une explication partielle de ces résultats doit considérer l'hétérogénéité de population cellulaire. D'une part, il y a la partie de la population qui est définitivement bloquée après chaque stress. Il n'y a donc pas de raccourcissement télomérique de cette tranche de la population puisque aucune division cellulaire n'est possible. D'autre part, la fraction de la population qui peut encore se diviser après chacun des stress subcytotoxiques (ou qui reste mitotique plusieurs semaines sous hyperoxie) doit le faire un grand nombre de fois pour rejoindre la confluence durant les sous-cultures. Toutefois cela ne veut pas dire que ces cellules, qui se divisent encore après stress, ne présentent pas des dommages comme des cassures simple brin, mais la chance qu'elles en présentent est faible. Dans tous les cas, cela veut dire que la sénescence prématurée peut être observée même si les télomères ne rejoignent pas la taille critique de 5 kb.

L'arrêt irréversible de la croissance cellulaire chez les cellules exposées à des stress subcytotiques oxydatifs, et qui ont accumulés des dommages à l'ADN semble donc être un mécanisme aussi efficace que le raccourcissement des télomères pour éviter l'immortalisation.

4.4 Les cellules en SIPS peuvent-elles affecter le vieillissement tissulaire.

Il a été proposé que la présence d'une minorité de cellules sénescentes au sein d'un tissu peut être suffisante pour en perturber l'homeostasie.
D'après la définition 1 de la sénescence, si des FDHs peuvent faire quelques passages supplémentaires en culture sous une faible concentration en oxygène, ce qui correspond mieux à la situation physiologique, alors la probabilité de rencontrer des cellules sénescentes *in vivo* est faible. Des deux premières cellules télomèrases

négatives qui apparaissent au cours de la différenciation cellulaire, et qui deviendront des fibroblastes, il faudra produire $2^{50}$ cellules avant de voir la première sénescence dépendante des télomères après 50 CPD sous 20% d'oxygène. Si ces FDHs font 30 CPD en plus à une pression partielle en $O_2$ physiologique, ce nombre atteint $2^{80}$ fibroblastes. $2^{80}$ fibroblastes représentent un volume de plusieurs kilomètres cubes. Bien sûr le renouvellement cellulaire et les divisions asymétriques doivent être considérées et diminuent alors ce volume. De longues périodes non-prolifératives au sein de tissus favorisent l'apparition de cassures simples brins dans l'ADN comme observé dans les cellules en cultures confluentes (Sitte et al., 1998). De plus, il y d'autres types cellulaires que les fibroblastes dans l'organisme augmentant encore le nombre de kilomètres cubes. Cela signifie que les cellules que l'on pense être en sénescence réplicative *in vivo* ont beaucoup de chance d'être en fait des cellules en SIPS. Bien que les cellules sénescentes pourraient être présentes, la proportion de celles-ci et leur signification physiologique semble donc être faible par comparaison aux cellules en SIPS.
Il semble que les cellules en SIPS affectent la physiologie tissulaire et le vieillissement. Des FDHs prélevés sur des ulcères gastriques présentent un phénotype sénescent : SA ß-gal, arrêt prolifératif, morphologie sénescente et surexpression de la fibronectine. Dans le fluide de ces ulcères, le TNF-α a été identifié en de fortes concentrations. De plus quand des FDHs gastriques sont stimulés avec du TNF-α , le phénotype sénescent apparaît (Mendez et al., 1998) ce qui confirme les résultats obtenus sur les cellules en culture (Dumont et al., 2000a).
Il a été observé, chez les FDHs de différents types de tissus, que l'exposition à des cytokines pro-inflammatoires peut provoquer l'apparition des biomarqueurs de la sénescence. Ces cytokines ont été décrites comme pouvant induire une dégradation de la matrice extracellulaire (Moore et al., 2000; Siwik et al., 2000; Yamamoto et al., 2000). Il est donc possible que ces cytokines interviennent dans les changements tissulaires observés avec le vieillissement. C'est d'autant plus probable qu'une élévation de la quantité de TNF-α et d'Il-1 circulant est observée avec le vieillissement (Franceschi et al., 1996).
Il est également observé des cellules positives pour la SA ß-gal dans les hépatites chroniques et les tissus voisins des hépatocarcinomes (Serrano and Blasco, 2001).

### 4.5 Les mots de la fin

Les mots "conditions de cultures inadéquates" sont parfois utilisés pour décrire le phénotype sénescent induit par les stress (Ramirez et al., 2001). Cette expression ne considère pas que les situations stressantes existent *in vivo* et plus spécialement les situations de stress répétés ou chroniques.
Des voies communes et différentes de transductions sont induites après des expositions à différents types de stress subcytotoxiques. Certaines de ces voies de transduction du signal se partagent des portions communes avec la sénescence induite par les télomères courts. Une étude protéomique a montré que l'expression de

différentes protéines varie de manière identique entre les cellules sénescentes et les cellules en SIPS mais il y a aussi de nombreuses modifications spécifiques de l'une ou l'autre de ces situations (Dierick et al., in press b). Une étude préliminaire menée à partir des microdamiers à ADN arrive à la même conclusion. Les changements à long terme observés suite aux stress ont été appelés les "cicatrices moléculaires" (Brack et al., 2000). Quand un niveau critique de dommages est atteint, un arrêt permanent de croissance est induit. Cet arrêt permanent est régulé par des voies présentant des similarités avec celles qui sont utilisées par la sénescence réplicative.

Les stress oxydatifs anormaux sont impliqués dans de nombreuses pathologies, les inflammations et intoxications. Pour l'instant, il serait intéressant de voir si des cellules soumises à un processus inflammatoire sont plus sujettes à la SIPS favorisant alors l'hypothèse de l'établissement de l'état pro-inflammatoire généralisé au cours du vieillissement humain (Franceschi et al., 2000).

Il serait également intéressant d'étudier les mécanismes régulant l'apparition de la SIPS suite à des stress répétés comme les stress sous U.V. par exemeple. Ces stress de faibles intensités minent bien la situation rencontrée par la peau tous les jours. On serait donc dans des situations physiologiques normales se distinguant des maladies et de l'inflammation. Une telle étude serait d'autant plus intéressante qu'il a été démontré par notre équipe que des stress subcytotoxiques répétés sous U.V. provoquent comme le peroxyde d'hydrogène, une surexpression du TGF-ß1 (Chainiaux et al., sous presse).

# Bibliographie

Adelfalk, C., Lorenz, M., Serra, V., von Zglinicki, T., Hirsh-Kaufmann, M., and Schweiger, M. (2001). Accelerated telomere shortening in fanconi anemia fibroblasts- a longitudinal study, FEBS Lett *506*, 22-26.

Aikawa, R., Komuro, I., Yamazaki, T., Zou, Y., Kudoch, S., Tanaka, M., Shiojima, I., Hiroi, Y., and Yazaki, Y. (1997). Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats, J Cli Invest *100*, 1813-1821.

Alani, R. M., Young, A. Z., and Shifflett, C. B. (2001). Id1 regulation of cellular senescence through transcriptional repression of $p16^{Ink-4a}$, Proc Natl Acad Sci USA *98*, 7812-7816.

Alcorta, D. A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., and Barrett, C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor $p16^{Ink-4a}$ in replicative senescence of normal human fibroblasts, Proc Natl Acad Sci USA *93*, 13742-13747.

Alevizopoulos, A., and Mermod, N. (1997). Transforming growth factor-ß: the breaking open of a black box., BioEssays *19*, 581-591.

Alexander, K., and Hinds, P. W. (2001). Requirement for $p27^{KIP1}$ in retinoblastoma protein-mediated senescence., Mol Cell Biol *21*, 3616-3631.

Allen, R. G., Tresini, M., Keogh, B. P., Doggett, D. L., and Cristofalo, V. J. (1999). Differences in electron transport potential, antioxidant defenses, and oxidant generation in young and senescent fetal lung fibroblasts (WI-38)., J Cell Physiol *180*, 114-122.

Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, A. B., Greider, C. W., and Harley, C. B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts., Proc Natl Acad Sci USA *89*, 10114-10118.

Atadja, P., Wong, H., Garkavtsev, I., Veilette, C., and Riabowol, K. (1995). Increased activity of p53 in senescing fibroblasts, Proc Natl Acad Sci USA *92*, 8348-8352.

Atadja, P. W., Stringer, K. F., and Riabowol, K. T. (1994). Loss of serum response element binding activity and hyperphosphorylation of serum response factor during cellular aging., Mol Cell Biol *14*, 4991-4999.

Atamna, H., Paler-Martinez, A., and Ames, B. (2000). N-t-butyl hydroxylamine, a hydrolysis product of alpha-phenyl-N-t-butyl nitrone, is more potent in delaying senescence in human lung fibroblasts, J Biol Chem *275*, 6741-6748.

Attisano, L., and Lee-Hoeflich, S. T. (2001). The Smads, Genome Biol *2*, 3010.1-3010.8.

Bae, H. W., Geiser, A. G., Kim, D. H., Chung, M. T., Burmester, J. K., Sporn, M. B., Roberts, A. B., and Kim, S.-J. (1995). Characterization of the promoter region of the human ransforming growth factor-ß type II receptor gene., J Biol Chem *270*, 29460-29468.

Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M. J., Pagano, M., and Draetta, G. (1993). Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1., Genes Dev *7*, 812-821.

Balin, A. K., Fisher, A. J., and Carter, D. M. (1984). Oxygen modulates growth of human cells at physiologic partial pressures., J Exp Med *160*, 152-166.

Balin, A. K., Goodman, D. B., Rasmussen, H., and Cristofalo, V. J. (1977). The effect of oxygen and vitamin E on the lifespan of human diploid cells *in vitro*., J Cell Biol *74*, 58-67.

Banin, S., Moyal, L., Shieh, S.-Y., Taya, Y., Anderson, C. W., Chessa, L., Smorodinsky, N. I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., and Ziv, Y. (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage, Science *281*, 1674-1676.

Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., and Oren, M. (1993). Mdm2 expression is induced by wild type p53 activity., EMBO J *12*, 461-468.

Barbacid, M. (1987). Ras genes, Annu Rev Biochem *56*, 779-827.

Bartek, J., Bartkova, J., and Lukas, J. (1996). The retinoblastoma protein pathway and the restriction point., Curr Opin Cell Biol *8*, 805-814.

Baserga, R. (1985). The biology of cell reproduction (Cambridge, Harvard Universty Press).

Baumgartner, B., Heiland, S., Kunze, N., Richter, A., and Knippers, R. (1994). Conserved regulatory elements in the type I DNA polymerase gene promoters of mouse and man, Biochim Biophys Acta *1218*, 123-127.

Bayreuther, K., Francz, P. I., and Rodemann, H. P. (1992). Fibroblasts in normal and pathological terminal differentiation, aging, apoptosis and transformation., Arch Gerontol Geriatr *S.3*, 47-74.

Bayreuther, K., Rodemann, H. P., Francz, P. I., and Maier, K. (1988b). Differentiation of fibroblast stem cells., J Cell Sci *S.10*, 115-130.

Bayreuther, K., Rodemann, H. P., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M., and Francz, P. I. (1988a). Human skin fibroblasts *in vitro* differentiate along a terminal cell lineage., Proc Natl Acad Sci USA *85*, 5112-5116.

Beckman, K. B., Ames, B. (1998). The free radical theory of aging matures., Phys. Rev. *78*, 547-581.

Benn, P. A. (1976). Specific chromosome aberration in senescent fibroblast cell lines derived from human embryos., Am J Hum Genet *28*, 465-473.

Benzi, G., Curti, D., Pastoris, O., Marzatico, F., Villa, R. F., and Dagani, F. (1991). Sequential damage in mitochondrial complexes by peroxidative stress, Neurochem Res *16*, 1295-1302.

Berlett, B. S., and Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress., J Biol Chem *272*, 20313-20316.

Bernard, D., Quatannens, B., Begue, A., vandenbunder, B., and Abbadie, C. (2001). Antiproliferative and antiapoptotic effects of c-Rel may occur within the same cells via the up-regulation of manganese superoxide dismutase, Cancer Res *61*, 2656-2664.

Bhaskar, M. S., and Rao, K. S. (1994). Altered conformation and increased strand breaks in neuronal and astroglial DNA of aging rat brain., Biochem Mol Biol Int *33*, 377-384.

Blackburn, E. H. (1991). Structure and function of telomeres, Nature *350*, 569-573.

Bladier, C., Wolvetang, E. J., Hutchinson, P., de Haan, J. B., and Kola, I. (1997). Response of a primary human fibroblast cell line to $H_2O_2$ : senescence-like growth arrest or apoptosis ?, Cell Growth & Diff *8*, 589-598.

Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C.-P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichsteiner, S., and Wright, W. E. (1998). Expension of live-span by introduction of telomerase into normal human cells, Sciences *279*, 349-352.

Bohr, V. A., Dianov, G., Balajee, A., May, A., and Orren, D. K. (1998). DNA repair and transcription in human premature aging disorders., J Invest Dermatol Symp Proc *3*, 11-13.

Bond, J. A., Haughton, M., Blaydes, J., Gire, V., Wynford-Thomas, D., and Wyllie, F. (1996). Evidence that transcriptional activation by p53 plays a direct role in the induction of cellular senescence., Oncogene *13*, 2097-2104.

Bond, J. A., Wyllie, F. S., and Wynford-Thomas, D. (1994). Escape from senescence in human diploid fibroblasts induced directly by mutant p53., Oncogene *9*, 1885-1889.

Boveris, A. (1984). Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria., Methods enzymol *105*, 429-435.

Boyer, S. N., Wazer, D. E., and Band, V. (1996). E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway, Cancer Res *15*, 4620-4.

Brack, C., Bechter-Thuring, E., and Labuhn, M. (1997). N-acetylcysteine slows down ageing and increases the life span of *Drosophila melanogaster*., Cell Mol Life Sci *53*, 960-966.

Brack, C., Lithgow, G. J., Osiewacz, H., and Toussaint, O. (2000). Molecular and Cellular Gerontology, EMBO J *19*, 1929-1934.

Bravo, R., Frank, R., Blundell, P. A., and MacDonald-Bravo, H. (1987). Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase $\partial$., Nature *326*, 515-517.

Brehm, A., and Kouzarides, T. (1999). Retinoblastoma protein meets chromatin, Trends In Bioch Sci *24*, 142-145.

Brehm, A., Miska, E. A., McCance, D.J., Reid, J. L., Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription, Nature *391*, 597-600.

Brossas, J. Y., Barreau, E., Courtois, Y., and Treton, J. (1994). Multiple deletions in mitochondria DNA are present in senescent mouse brain, Biochem Biophys Res Comm *202*, 654-659.

Brown, L., and McCarthy, N. (1997). A sense-abl response?, *Nature* 387, 450-451.

Bruce, S. (1991). Ultrastructure of dermal fibroblasts during development and aging: relationship to *in vitro* senescence of dermal fibroblasts., Exp Gerontol *26*, 3-16.

Bruce, S. A., Deamond, S. F., and Ts'O, P. O. (1986). *In vitro* senescence of Syrian hamster mesenchymal cells of fetal to aged adult origin. Inverse relationship between *in vivo* donor age and *in vitro* proliferative capacity., Mech Ageing Dev *34*, 151-173.

Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J. I., Beach, D., Jacks, T., and Hannon, G. J. (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by $p21^{Waf-1}$ deficiency., Nature *377*, 552-557.

Bryan, T. M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., and Reddel, R. R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity., EMBO J *14*, 4240-4248.

Busk, D. The Hutchinson-Gifford progeria syndrome, J Pediatrics *80*, 697-724.

Cahill, M. A., Janknecht, R., and Nordhein, A. (1996). Signalling pathways: lack of all cascades, Curr Biol *6*, 16-19.

Campisi, J. (1999). Replicative senescence and immortalization. In The molecular basis of cell cycle and growth control., G. S. Stein, A. Baserga, A. Giordano, and D. T. Denhardt, eds. (New York, Wiley-Liss), pp. 348-373.

Campisi, J., Dimri, G., and Hara, E. (1996a). Control of replicative senescence. In Handbook of the biology of aging., E. Schneider, and J. Rowe, eds. (New York, Academic Press), pp. 121-149.

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

Carrel, A. (1912). On the permanent life of tissues outside the organism, J Exp Med *15*, 516.

Carrier, F., Georgel, P. T., Pourquier, P., Blake, M., Kontny, H. U., Antimore, M. J., Gariboldi, M., Myers, T. G., Weinstein, J. N., Pommier, Y., and Fornace JR., A. J. (1999). GADD45, a p53-responsible stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin, Mol Cell Biol *19*, 1673-1685.

Chabes, A., and Thelander, L. (2000). Controlled protein degradation regulates ribonucleotide reductase activity in proliferating mammalian cells during the normal cell cycle and in response to DNA damage and replication blocks., J Biol Chem *275*, 2474-2479.

Chainiaux, F., Remacle J., Toussaint O. (in press). ,Ann. NY Acad Sci.

Chakravarthy, M. V., Abraha, T. W., Schwartz, R. J., Fiorotto, M. L., and Booth, F. W. (2000). Insulin-like growth factor-1 extends in vitro replicative lifespan of skeletal muscle satellite cells by enhancing G1/S cell cycle progrssion via the activation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signalling pathway, J Biol Chem *275*, 35942-35952.

Chakraverty, R. K., and Hickson, I. D. (1999). Defending genome integrity during DNA replication : a proposed role for RecQ family helicases., Bioessays *21*, 286-294.

Chan, F. K. M., Zhang, J., Cheng, L., Shapiro, D. N., and Winoto, A. (1995). Identification of a human and mouse $p19^{Ink-4d}$, a novel CdK4 and CdK6 inhibitor with homology to $p16^{Ink-4a}$., Mol Cell Biol *15*, 2682-2688.

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

Chang, Z. F., and Chen, K. Y. (1988). Regulation of ornithine decarboxylase and other cell cycle-dependent genes during senescence of IMR-90 human diploid fibroblasts., J Biol Chem *263*, 11431-11435.

Chen, J., Jackson, P. K., Kirschner, M. W., and Dutta, A. (1995b). Separate domains of $p21^{Waf-1}$ involved in the inhibition of CdK kinase and PCNA, Nature *374*, 386-388.

Chen, J., Paters, R., Saha, P., lee, P., Theodoras, A., Pagano, M., Wagner, G., and Dutta, A. (1996a). A 39 amino acid fragment of the cell cycle regulator $p21^{Waf-1}$ is sufficient to bind PCNA and partially inhibit DNA replication *in vivo*, Nucleic Acids Res *24*, 1727-1733.

Chen, Q., and Ames, B. N. (1994). Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells., Proc Natl Acad Sci USA *91*, 4130-4134.

Chen, Q., Fisher, A., Reagan, J. D., Yan, L. J., and Ames, B. N. (1995). Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells., Proc Natl Acad Sci USA *92*, 4337-4341.

Chen, Q. M., Bartholomew, J. C., Campisi, J., Acosta, M., Reagan, J. D., and Ames, B. N. (1998). Molecular analysis of $H_2O_2$-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts : p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication., Biochem J *332*, 43-50.

Chen, Q. M., Liu, J., Merret, J. B. (2000b). Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell cycle position, p53, p21and bax in H2O2 response of normal human fibroblasts, Biochem. J. *347*, 543-551.

Chen, Q. M., Prowse, K. R., Tu, V. C., Purdom, S., and Linskens, M. H. (2001a). Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts, Exp Cell Res *265*, 294-303.

Chen, Q. M., Tu, V. C., Catania, J., Burton, M., Toussaint, O., and Dilley, T. (2000). Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide., J Cell Sc *113*, 4087-4097.

Chen, W., Tang, Q., Gonzales, M. S., and Bowden, G. T. (2001b). Role of $p38^{MAPK}$ and ERK in mediating UV-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes, Oncogene *20*, 3921-3926.

Chen, X., Rubock, M. J., and Whitman, M. (1996b). A transcriptional partner for MAD proteins in TGF-ß signalling, Nature *383*, 691-696.

Cheng, A., Ross, K. E., Kaldis, P., and Solomon, M. J. (1999). Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases, Genes Dev *13*, 2946-2957.

Chio, K. S., and Tappel, A. L. (1969). Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malonaldehyde and amino acids., Biochemistry *8*, 2821-2826.

Chiu, D., Kuyper, F., and Lubin, B. (1989). Lipid peroxidation in human red cells, Seminars Hematology *26*, 257-276.

Cohen, D. R., and Curran, T. (1989). The structure and function of the c-Fos protooncongene., Critical Review in Oncogenesis *1*, 65-88.

Collard, M. W., and Griswold, M. D. (1987). Biosynthesis and molecular cloning of sulfated glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells., Biochemistry *26*, 3297-3303.

Conrad, M. N., Wright, J. H., Wolf, A. J., and Zakian, V. A. (1990). RAP1 protein interacts with yeast telomeres *in vivo* : overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability., Cell *63*, 739-750.

Conrad, P. W., Rust, R. T., Han, J., Millhorn, D. E., and Beitner-Johnson, D. (1999). Selective activation of p38α and p38γ by hypoxia, JBiol Chem *274*, 23570-23576.

Counter, C. M. (1994). Telomerase activity in human ovarian carcinoma, Proc Natl Acad Sci USA *91*, 2882-2885.

Counter, C. M., Avillion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B., and Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cell which express telomerase activity, EMBO J *11*, 1921-1929.

Cristofalo, V. J., Allen, R. G., Pignolo, R. P., Martin, B. M., and Beck, J. C. (1998b). Relationship between donor age and the replicative life spans of human cells in culture : a re-evaluation., Proc Natl Acad Sci USA *95*, 10614-10619.

Cristofalo, V. J., and Pignolo, R. J. (1993). Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture., Physiol Rev *73*, 617-638.

Cristofalo, V. J., and Sharf, B. B. (1973). Cellular senescence and DNA synthesis. Thymidine incorporation as a measure of population age in human diploid cells., Exp Cell Res *76*, 419-427.

Cristofalo, V. J., Volker, C., Francis, M. K., and Tresini, M. (1998a). Age-dependent modifications of gene expression in human fibroblasts., Critical Review Euka Gene Exp *8*, 43-80.

Cross, A. R., and Jones, O. T. (1991). Enzymatic mechanisms of superoxide production., Biochim Biophys Acta *1057*, 281-298.

Culp, S. J., Cho, B. P., Kadlubar, F. F., and Evvans, F. E. (1989). Structural and conformational analyses of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine., Chem Res Toxicol *2*, 416-422.

Cutler, R. G. (1982). Longevity is determined by specific genes: testing the hypothesis. In Testing the theories of ageing, R. Adelman, and G. Roth, eds. (FL, Boca Raton), pp. 25-114.

Daniel, C. W. (1972). Aging of cells during serial propagation *in vivo*, Adv Gerontological Res *4*, 167-199.

Daniel, C. W., De Orne, K. B., Young, J. T., Blair, P. B., and Faulkin, L. J. (1968). The *in vivo* life span of normal and preneoplastic mouse mammary glands: a serial transplantation study, Proc Natl Acad Sci USA *61*, 53-60.

Davies, K. J. A. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals, J Biol Chem *262*, 9885-9901.

De Caprio, J. A., Ludlow, J. W., Lynch, D., Furukawa, Y., Griffin, J., Piwnica-Worms, H., Huang, C. M., and Livingston, D. M. (1989). The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element, Cell *58*, 1085-1095.

De Gregori, J., Leone, G., Miron, A., Jakoi, L., and Nevins, J. R. (1997). Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis., Proc Natl Acad Sci USA *94*, 7245-7250.

de Lange, T. (2001). Telomere capping- One strand fits all, Science *292*, 1075-1076.

de Lange, T. (2002). Protections of mammalian telomeres, Oncogene *21*, 532-540.

de Silva, H. V., Harmony, J. A. K., Stuart, W. D., Gil, C. M., and Robbins, J. (1990b). Apolipoprotein J : structure and tissue distribution., Biochem *29*, 5380-5389.

de Silva, H. V., Stuart, W. D., Park, Y. B., Mao, S. J. T., Gil, C. M., Wetterau, S. J., Bush, S. J., and Harmony, J. A. K. (1990a). Purification and characterization of apolipoprotein J., J Biol Chem *265*, 14292-14297.

Demers, G. W., Espling, E., Harry, J. B., Etscheid, B. G., and Galloway, D. A. (1996). Abrogation of growth arrest signals by human papillomavirus type 16 E7 is mediated by sequences required for transformation., J Virol *70*, 6862-6869.

DePinho, R. A. (1998). Transcriptional repression. The cancer-chromatin connection., Nature *391*, 533, 535-536.

Desai, D., Gu, Y., and Morgan, D. O. (1992). Activation of human CdK *in vitro*, Mol Biol Cell *3*, 571-582.

Dickson, M. A., Hahn, W. C., Ino, Y., Ronfard, V., Wu, J. Y., Weinberg, R. A., Louis, D. N., Li, F. P., and Rheinwald, J. G. (2000). Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16Ink-4a-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics, Mol Cell Biol *20*, 1436-1447.

Dierick, J.-F., Dieu, M., Remacle, J., Raes, M., Roepstorff, P., and Toussaint, O. (2002). Proteomics in experimental gerontology, Exp Gerontol, in press.

Dierick, J. F., Eliaers, F., Remacle, J., Larsen, P. M. and Toussaint, O. Stress-induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes. Proteomic evidence., Biochem Pharmacol (in press b)

Dietrich, C., Wallenfang, K., Oesch, F., and Wieser, R. (1997). Translocation of CdK2 to the nucleus during G1-phase in PDGF-stimulated human fibroblasts., Exp Cell Res *232*, 72-78.

Dimri, G. P., and Campisi, J. (1994). Altered profile of transcription factor-binding activities in senescent human fibroblasts, Exp Cell Res *212*, 132-140.

Dimri, G. P., Hara, E., and Campisi, J. (1994b). Regulation of two E2F-related genes in presenescent and senescent human fibroblasts., J Biol Chem *269*, 16180-16186.

Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelly, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubeli, I., Pereira-Smith, O., *et al.* (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo.*, Proc Natl Acad Sci USA *92*, 9363-9367.

Diplock, A. T. (1994). Antioxidants and free radical scavengers. In Free radical damage and its control., C. A. Rice-Evans, and R. H. Burdon, eds. (Elsevier Science), pp. 113-129.

Dubois, R. N. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease, Faseb J *12*, 1063-1073.

Ducommun, B., Brambilla, P., Félix, M.-A., Franza, J., Kaesenti, E., and Draetta, G. (1991). Cdc2 phosphorylation is required for its interaction with cyclin, EMBO J *10*, 3311-3319.

Dulic, V., Drullinger, L. F., Lees, E., Reed, S. I., and Stein, G. H. (1993). Altered regulation of G1 cyclins in senescent human diploid fibroblasts: accumulation of inactive cyclin E-Cdk2 and cyclin D1- Cdk2 complexes, Proc Natl Acad Sci USA *90*, 11034-11038.

Dulic, V., Kaufman, W. K., Wilson, S., Tisty, T. D., Lees, E., Harper, J. W., Elledge, S. J., and Reed, S. I. (1994). p53-dependent inhibition of cyclin dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest., Cell *76*, 1013-1023.

Dulic, V., Lees, E., and Reed, S. I. (1992). Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase., Science *257*, 1958-1961.

Dumont, P., Balbeur, L., Remacle, J., and Toussaint, O. (2000a). Appearance of biomarkers of *in vitro* ageing after successive stimulation of WI-38 fibroblasts with Il-1α and TNF-α: senescence associated ß-galactosidase and morphotype transition, J Anat *197*, 529-537.

Dumont, P., Burton, M., Chen, Q. M., Frippiat, C., Pascal, T., Dierick, J.-F., Eliaers, F., Chainiaux, F., Remacle, J., and Toussaint, O. (2000b). Human diploid fibroblasts display a decreased level of *c-fos* mRNA at 72 hours after exposure to sublethal $H_2O_2$ stress, Ann NY Acad Sci *908*, 306-309.

Dumont, P., Burton, M., Chen, Q. M., Gonos, E. S., Frippiat, C., Mazarati, J.-B., Eliaers, F., Remacle, J., and Toussaint, O. (2000c). Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblasts, Free Rad Biol Med *28*, 361-373.

Dumont, P., Chainiaux, F., Eliaers, F., Petropoulou, C., Remacle, J., Koch-Brandt, C., Gonos, E. S., and Toussaint, O. (2002). Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and tert-butylhydroperoxide, Cell Stress Chap *7*, 23-35.

Dumont, P., Royer, V., Pascal, T., Dierick, J.-F., Chainiaux, F., Frippiat, C., Magalhaes, J. P., Eliaers, F., Remacle, J., and Toussaint, O. (2001). Growth kinetics rather than stress acelerate telomere shortening in cultures of human diploid fibroblasts in oxidative stress-induced premature senescence, FEBS Lett *502*, 109-112.

Durfee, T., Becheler, K., Chen, P.-L., Yeh, S.-H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W.-H., and Elledge, S. J. (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit, Gen &Dev *7*, 555-569.

El-Deiry, W. F., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). *WAF1*, a potential mediator of p53 tumor suppression., Cell *75*, 817-825.

El-Deiry, W. S. (1998). p21/p53, cellular growth control and genomic integrity. In Cyclin dependent Kinase (CdK) inhibitors, R. W. Compans, ed. (New-York, Vogt, P.K.

Reed, S.I.), pp. 121-138.

Enslen, H., Raingeaud, J., and Davis, R. J. (1998). Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase MKK3 and MKK6., J Biol Chem *273*, 1741-1748.

Erickson, S., Sangfelt, O., Heyman, M., Castro, J., Einhorn, S., and Grander, D. (1998). Involvement of the Ink4 proteins p16 and p15 in T-lymphocyte senescence., Oncogene *17*, 595-602.

Ezhevsky, S. A., Nagahara, H., Vocero-Akbani, A. M., Gius, D., Wei, M. C., and Downy, S. F. (1997). Hypophosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D. CdK4/6 complexes results in active Rb, Proc Natl Acad Sci USA *94*, 10699-10704.

Fahn, H. J., Wang, L. S., Hriek, R. H., Chang, S. C., Kao, S. H., Huang, M. H., and Wei, Y. H. (1996). Age-related 4,977 bp deletion in human lung mitochondrial DNA., AmJReCritCare Med *154*, 1141-1145.

Faragher, R. G., Kill, I. R., Hunter, J. A., Pope, F. M., Tannock, C., and Shall, S. (1993). The gene responsible for Werner syndrome may be a cell division "counting" gene., Proc Natl Acad Sci USA *90*, 12030-12034.

Farnham, P. J., and Schimke, R. T. (1985). Transcriptional regulation of mouse dihydrofolate reductase in the cell cycle., J Biol Chem *260*, 7675-7680.

Farnham, P. J., Slansky, J. E., and Kollmar, R. (1993). The role of E2F in the mammalian cell cycle., Biochem Biophys Acta *1155*, 125-131.

Farthing, A. J., and Vousden, K. H. (1994). Functions of human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins, Trends Microbiol *2*, 170-174.

Fesquet, D., Labbé, J.-C., Derancourt, J., Capony, J.-P., Galas, S., Girard, F., Lorca, T., Shuttleworth, J., Dorée, M., and Cavadore, J.-C. (1993). The *MO15* gene encodes the catalytic subunit of protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases through phosphorylation of Thr161 and its homologues, EMBO J *12*, 3111-3121.

Fisher, R. P., Jin, P., Chamberlin, H. M., and Morgan, D. O. (1995). Alternative mechanisms of CAK assembly require an assembly factor or an activating kinase, Cell *83*, 47-57.

Fisher, R. P., and Morgan, D. O. (1994). A novel cyclin associates with MO15/CdK7 to form the CdK-activating kinase, Cell *78*, 713-724.

Fraga, C. G., Shigenaga, M. K., Park, J. W., Degan, P., and Ames, B. N. (1990). Oxidative damage to DNA during aging : 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine., Proc Natl Acad Sci USA *87*, 4533-4537.

Franceschi, C., Bonafe, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., and De Benedictis, G. (2000). Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence, Ann NY Acad Sci *908*, 244-254.

Franceschi, C., Monti, D., Barbieri, D., Salvioli, S., Grassilli, E., Capri, M., Troiano, L., Tropea, F., Guido, M., Salomoni, P., *et al.* (1996). Immunosenescence. Paradoxes and new perspectives emerging from the study of healthy centenarians. In Molecular gerontology. Research status and strategies., S. I. Rattan, and O. Toussaint, eds. (New York, Plenum Press), pp. 131-149.

Francz, P. I., Bayreuther, K., and Rodemann, H. P. (1989). Cytoplasmic, nuclear, membrane-bound and secreted [$^{35}$S]methionine-labelled polypeptide pattern in differentiating fibroblast stem cells *in vitro*., J Cell Sci *92*, 231-239.

Freeman, B. A., and Crapo, J. D. (1982). Biology of disease. Free radicals and tissue injury, Lab Invest *45*, 412-426.

French, L. E., Chonn, A., Ducrest, D., Baumann, B., Belin, D., Wohlwend, A., Kiss, J. Z., Sappino, A. P., Tschopp, J., and Schifferli, J. A. (1993). Murine clusterin : molecular cloning and mRNA localization of a gene associated with epithelial differentiation processes during embryogenesis., J Cell Biol *122*, 1119-1130.

Fridovich, I. (1976). Oxygen radicals, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity. In Free radicals in biology, W. A. Pryor, ed. (London, Academic Press Inc.), pp. 1-49.

Fu, Y., Liu, H. W., Forsythe, S. M., Kogut, P., McConville, J. F., Halayko, A. J., Camoretti, B., and Solway, J. (2000). Mutagenesis analysis of human SM22: characterization of actin binding, J Apll Physiol *89*.

Fukagawa, N. K. (1999). Aging : Is oxidative stress a marker or is it causal ?, Proc Soc Exp Biol Med *222*, 293-298.

Fukami, J., Anno, K., Ueda, K., Takahashi, T., and Ide, T. (1995). Enhanced expression of cyclin D1 in senescent human fibroblasts, Mech Ageing Dev *81*, 139-157.

Fuxe, J., Akusjarvi, G., Goike, H. M., Roos, G., Collins, V. P., and Pettersson, R. F. (2000). Adenovirus-mediated overexpression of $p15^{Ink-4b}$ inhibits human glioma cell growth, induces replicative senescence, and inhibits telomerase activity similarly to $p16^{Ink-4a}$., Cell Growth Differ *11*, 373-384.

Gadaleta, M. N., Rainaldi, G., Lezza, A. M., Milella, F., Fracasso, F., and Cantatore, P. (1992). Mitochondrila DNA copy number and mitochondrial deletion in adult and senescent rats, Mutat Res *275*, 181-193.

Gaiser, A. G., Busam, K. J., Kim., S.-J., Lafyatis, R., O'Reilly, M. A., Webbink, R., Roberts, A. B., and Sporn, M. B. (1993). Regulation of the transcription factor-ß1 and -ß3 promoters by transcriptions factor Sp1., Gene *129*, 223-228.

Garbi, C., Colletta, G., Cirafici, A. M., Marchisio, P. C., and Nitsh, L. (1990). Transforming growth factor-beta induce cytoskeleton and extracellular matrix modifications in FRTL-5 cells thyroid epithelial cells, Eur J Cell Biol *53*, 281-289.

Garcia, A. J., Vega, M. D., and Boettiger, D. (1999). Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation, Mol Biol Cell *10*, 785-798.

Garci-Gila, M., Lopez-Martin, E. M., Garcia-pardo, A. (2002). Adhesion to fibronectin via alpha4 integrin (CD49d) protects B cells from apoptosis induced by serum deprivation but not via IgM or Fas:Apo-1 receptors, Clin Exp Immunol *127*, 455-462.

Garcia-Trevijano, E. R., Iraburu, M. J., Fontana, L., Dominguez-Rosales, J. A., Auster, A., Covarrubias-Pinedo, A., and Rojkind, M. (1999). Transforming growth factor ß1 induces the expression of α-1-procollagen mRNA by a hydrogen peroxide-C/EBP ß-dependent mechanism in rat hepatic stellate cells, Hepatology *29*, 960-970.

Garkavtsev, I., Hull, C., and Riabowol, K. (1998). Molecular aspects of the relationship between cancer and aging: tumor suppressor activity during cellular senescence, Exp Gerontol *33*, 81-94.

Garret, R. H., and Grisham, C. M. (1999). Biochemistry, Saunders College Publishing).

Gelvan, D., Moreno, V., Clopton, D. A., Chen, Q., and Saltman, P. (1995). Sites and mechanisms of low-level oxidative stress in cultured cells., Biochem Biophys Res Com *206*, 421-428.

Giacomoni, P. U., and D'Alessio, P. (1996). Skin ageing: The relevance of antioxydant. In Molecular gerontology, S. I. S. Rattan, and O. Toussaint, eds. (New York, Plenum Press), pp. 177-191.

Goldstein, S. (1979). Studies on age-related diseases in cultured skin fibroblasts, J Invest Dermatol *73*, 19-23.

Goldstein, S. (1990). Replicative senescence : the human fibroblast come of age., Science *243*, 1129-1133.

Goldstein, S., Moerman, E. J., Soeldner, J. S., Gleason, R. E., and Barnett, D. M. (1978). Chronologic and physiologic age affect replicative life-span of fibroblasts from diabetic, prediabetic, and normal donors., Science *199*, 781-782.

Gonos, E. S., Derventzy, A., Kveiborg, M., Agiostratidou, G., Kassem, M., Clark, B. F., Jat, P. S., and Rattan, S. I. (1998). Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence., Exp Cell Res *240*, 66-74.

Gonzales-Suarez, E., Samper, E., Flores, J. M., and Blasco, M. A. (2000). Telomerase-deficient mice with short telomeres and resistant to skin tumorigenesis, Nat Genet *26*, 114-117.

Good, L., Dimri, G. P., Campisi, J., and Chen, K. Y. (1996). Regulation of dihydrofolate reductase gene expression and E2F compoments in human diploid fibroblasts during growth and senescence, J Cell Physiol *168*, 580-588.

Goubin, F., and Ducommun, B. (1995). Identification of binding domains on the $p21^{Cip1}$ cyclin-dependent kinase inhibitor, Oncogene *10*, 2281-2287.

Graña, X., and Reddy, E. P. (1995). Cell cycle control in mammalian cells : role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor, genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs), Oncogene *11*, 211-219.

Gray, M. D., Shen, J. C., Kamath-Loeb, A. S., Blank, A., Sopher, B. L., Martin, G. M., Oshima, J., and Loeb, L. A. (1997). The Werner syndrome protein is a DNA helicase., Nat Genet *17*, 100-103.

Green, H., Rheinwald, J. G., and Sun, T. T. (1977). Properties of an epithelial cell type in culture: the epidermal keratinocyte and its dependence on products of the fibroblasts, Prog Clin Biol Res *17*, 493-500.

Greider, C., and Blackburn, E. (1998). Les horloges de la division cellulaire. In Les sociétés cellulaires., J. Rennie, ed. (Paris, Rosler, J.), pp. 68-71.

Guan, K.-L., Jenkins, C. W., Li, Y., Nichols, M. A., Wu, X., O'Keefe, C. L., Matera, A. G., and Xiong, Y. (1994). Growth suppression by p18, a $p16^{Ink-4a/MTS1}$ and $p14^{Ink-4b/MTS2}$-related CdK6 inhibitor correlates with wild-type pRb function., Genes Dev *8*, 2939-2952.

Guyton, K. Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q., and Holbrook, N. (1996). Activation of mitogen-activated protein kinase by $H_2O_2$, J Biol Chem *271*, 4138-4142.

Hai, T., and Curran, T. (1991). Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity, Proc Natl Acad Sci USA *88*, 3720-3724.

Haliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease, Am J Med *91*, 14S-22S.

Hanafusa, H., Ninomiya-Tsuji, J., Masuyama, N., M., N., Fusisawa, J.-I., Shibuya, H., Matsumoto, K., and Nishida, E. (1999). Involvement of the p38 mitogen-activated kinase pathway in transforming growth-factor-ß-induced gene expression, J Biol Chem *274*, 2761-67.

Hannon, G. J., and Beach, D. (1994). $p15^{Ink-4b}$ is a potential effector of TGF-ß-induced cell cycle arrest., Nature *371*, 257-261.

Hansen, R., and Oren, M. (1997). p53: from inductive signal to cellular effect., Curr Opin Genet Dev *7*, 46-51.

Hansens, K., Lukas, J., Holm, K., Kjerulff, A. A., and Bartek, J. (1999). Dissecting functions of the retinoblastoma tumor suppressor and the related pocket proteins by integrating genetics, cell biology, and electrophoretic techniques, Electrophoresis *20*, 372-381.

Hansford, R. G., Hogue, B. A., and Mildaziene, V. (1997). Dependence of $H_2O_2$ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age., J Bioenrg Biomembr *29*, 89-95.

Hara, E., Smith, R., Parry, D., Tahara, H., Stone, S., and Peters, G. (1996). Regulation of p16 CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence, Mol Cell Biol *16*, 859-867.

Hara, E., Yamaguchi, T., Nojima, H., Ide, T., Campisi, J., Okayama, H., and Oda, K. (1994). Id related genes encoding helix loop helix proteins are required for G1 progression and are repressed in senescent human fibroblasts., J Biol Chem *269*, 2139-2145.

Hardardottir, I., Kunitake, S. T., Moser, A. H., Doerrler, W. T., Rapp, J. H., Grünfeld, C., and Feingold, K. R. (1994). Endotoxin and cytokines increase hepatic messenger RNA levels and serum concentrations of apolipoprotein J (clusterin) in Syrian hamsters., J Clin Invest *94*, 1304-1309.

Harley, C. B. (1991). Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?, Mutat Res *256*, 271-282.

Harley, C. B., Futcher, A. B., and Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts, Nature *345*, 458-460.

Harley, C. B., and Goldstein, S. (1980). Retesting the commitment theory of cellular aging., Science *207*, 191-193.

Harman, D. (1956). Aging : a theory based on free radical and radiation chemistry., J Gerontol *11*, 298-300.

Harman, D. (1981). The aging process., Proc Natl Acad Sci USA *78*, 7124-7128.

Harman, D. (1998). Extending functional life span., Exp Gerontol *33*, 95-112.

Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S. J. (1993). Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases., Cell *75*, 805-816.

Harper, J. W., Elledge, S. J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L.-H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., Swindell, E., *et al.* (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by $p21^{Waf-1}$., Mol Biol on the Cell *6*, 387-400.

Hartsoug, M. T., Frey, R. S., Zipfel, P. A., Buard, A., Cook, S. J., McCormick, F., and Mulder, K. M. (1996). Altered transforming growth factor ß signalling in epithelial cells when Ras activation is blocked, J Biol Chem *271*, 22368-22375.

Hastie, D. N., Dempster, M., Dunlop, M. G., Thompson, A. M., Green, D. K., and Allshire, R. C. (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with aging, Nature *346*, 866-868.

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promoter the rapid degradation of p53., Nature *387*, 296-299.

Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Vousden, K., and Oren, M. (1995). Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53, Genes Dev *9*, 2170-2183.

Hayflick, L. (1965). The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains, Exp Cell Res *37*, 614-636.

Hayflick, L. (1970). Aging under glass., Exp Gerontol *5*, 291-303.

Hayflick, L. (1977). 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.

Hayflick, L. (1996). How and why we age (New-York, Ballantine Books).

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

Helin, K., Wu, C. L., Fattaey, A. R., Lees, J. A., Dynlacht, B. D., Ngwu, C., and Harlow, E. (1993). Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation., Genes Dev *7*, 1850-61.

Hermann, M. T., Strong, M. A., Hao, L.-Y., and Greider, C. W. (2001). The shortest telomere, not average telomere lenght, is critical for cell viability and chromosome stability, Cell *107*, 67-77.

Herrera, R. E., Mäkelä, T. P., and Weinberg, R. A. (1996). TGF-ß-induced growth inhibition in primary fibroblasts requires the retinoblastoma protein, Mol Cell Biol *7*, 1335-1342.

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

Hirai, H., Roussel, M. F., Kato, J.-Y., Ashmun, R. A., and Sheer, C. J. (1995). Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CdK4 and CdK6., Mol Cell Biol *15*, 2672-2681.

Hirano, T., Yamaguchi, R., Asami, S., Iwamoto, N., and Kasai, H. (1996). 8-hydroxyguanine levels in nuclear DNA and its repair activity in rat organs associated with age., J Gerontol *51A*, B303-B307.

Hocevar, B. A., Brown, T. L., and Howe, P. H. (1999). TGF-ß induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway, EMBO J *18*, 1345-1356.

Hollingsworth, R. E., Chen, P.-L., and Lee, W.-H. (1993). Integration of cell cycle control with transcriptional regulation by the retinoblastoma protein, Curr Op Cell Biol *5*, 194-200.

Honda, S., and Matsuo, M. (1983). Shortening of the *in vitro* lifespan of human diploid fibroblasts exposed by hyperbaric oxygen., Exp Gerontol *18*, 339-345.

Horikoshi, T., Balin, A. K., and Carter, D. M. (1986). Effect of oxygen on the growth of human epidermal keratinocytes., J Invest Dermatol *86*, 424-427.

Horikoshi, T., Balin, A. K., and Carter, D. M. (1991). Effects of oxygen tension on the growth and pigmentation of normal human melanocytes., J Invest Dermatol *96*, 841-844.

Hornsby, P. J., Aldern, K. A., and Harris, S. E. (1986). Clonal variation in response to adrenocorticotropin in cultured bovine cells: relationship to senescence, J Cell Physiol *129*, 395-402.

Howard, A., and Pelc, S. R. (1953). Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage, Heredity *6*, 261-273.

Humphreys, D. T., Carver, J. A., Easterbrook-Smith, S. B., and Wilson, M. R. (1999). Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins., J Biol Chem *274*, 6875-6881.

Islam, K. N., Drake, S. K., Wehr, N. B., Weisman, A. M., LaVaute, T., Minato, N., Klausner, R. D., Levine, R. L., and Rouault, T. A. (1997). TGF-ß1 triggers oxidative modifications and enhances apoptosis in HIT cells trough accumulation of reactive oxygen species by suppression of catalase and gluthatione peroxidase, Free Rad Biol Med *22*, 1007-1017.

Jacob, K., Webber, M., Benayahu, D., and Kleinman, H. K. (1999). Osteonectin promotes prostate cancer cell migration and invasion : a possible mechanism of metastasis to bone., Cancer Res *59*, 4453-4457.

Jenne, D. E., and Tschopp, J. (1989). Molecular structure and functional characterization of a human complement cytolysis inhibitor found in blood and retinal plasma : identity to sulfated glycoprotein 2, a constituant of rat testis fluid., Proc Natl Acad Sci USA *86*, 7123-7127.

Jensen, D. E., Black, A. R., Swick, A. G., and Azizkhan, J. C. (1997). Distinct roles for Sp1 and E2F sites in the growth/cell cycle regulation of the DHFR promoter, J Cell Biochem *67*, 24-31.

Johnson, L. N., Noble, M. E. M., and Owen, D. J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation, Cell *85*, 149-158.

Jordan-Sciutto, K. L., Logan, T. J., Norton, P. A., Derfoul, A., Dodge, G. R., and Hall, D. J. (1997). Reduction in fibronectin expression and alteration in cell morphology are coincident in NIH3T3 cells expressing a mutant E2F1 transcription factor, Exp Cell Res *236*, 527-536.

Kaldis, P. (1999). The CdK-activating kinase: from yeast to mammals, Cell Mol Life Sci *55*, 284-296.

Kamath-Loeb, A. S., Johansson, E., Burgers, P. M., and Loeb, L. A. (2000). Functional interaction between the Werner Syndrome protein and DNA polymerase delta., Proc Natl Acad Sci USA *97*, 4603-4608.

Kamb, A., Gruis, N. A., Weaver, F. J., Liu, Q., Harshman, K., Tavtigian, S. V., Stockert, E., Day, R. I., Johnson, B. E., and Skolnick, M. H. (1994). A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types., Science *264*, 436-440.

Kang, C.-M., Kristal, B., and Pal Yu, B. (1998). Age-related mitochondrial DNA deletions: effect of dietary restriction, Free Rad Biol Med *24*, 148-154.

Kapahi, P., Boulton, M. E., and Kirkwood, T. B. (1999). Positive correlation between mammalian life span and cellular resistance to stress., Free Radic Biol Med *26*, 495-500.

Karlseder, J., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2002). Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss, Science *295*, 2446-2449.

Kastan, M. B., Zahn, Q., El-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunckett, B. S., Vogelstein, B., and Fornace, A. J. J. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia., Cell *71*, 587-597.

Katakura, Y., Nakata, E., Miura, T., and Shirata, S. (1999). Transforming growth factor-ß triggers two independent-senescence programs in cancer cells., Biochem Biophys Res Commun, 110-115.

Kedar, P. S., Widen, S. G., Englander, E. W., Fornace, A. J., and Wilson, S. H. (1991). The ATF-CREB transcription factor-binding site in the polymerase ß promoter mediates the positive effect of *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-mitrosoguanidine on transcription, Proc Natl Acad Sci USA *88*.

Kill, I. R., Faragher, R. G., Lawrence, K., and Shall, S. (1994). The expression of proliferation-dependent antigens during the lifespan of normal and progeroid human fibroblasts in culture., J Cell Sci *107*, 571-579.

Kim, S.-J., Lee, H.-D., Robbins, P. D., Busam, K., Sporn, M. B., and Roberts, A. B. (1991). Regulation of transforming growth factor ß1 gene expression by the product of the retinoblastoma-susceptibilily gene, Proc Natl Acad Sci USA *88*, 3052-3056.

Kim, S.-J., Wagner, S., Liu, F., O'Reilly, M. A., Robbins, P. D., and Green, M. (1992). Retinoblastoma gene product activates expression of the human TGF-β2 gene through transcripton factor ATF-2, Nature *358*, 331-334.

Kingsley, D. M. (1994). The TGF-ß superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms., Genes & Dev *8*, 133-146.

Kiyono, T., Foster, S. A., Koop, J. L., McDougall, J. K., Galloway, D. A., and Klingelhutz, A. J. (1998). Both Rb/p16Ink-4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells, Nature *396*, 84-88.

Kletsas, D., Stathakos, D., Sorrentino, V., and Philipson, L. (1995). The growth-inhibitory block of TGF-β is located close to the G1/S border in the cell cycle., Exp Cell Res *217*, 477-483.

Ko, L. J., and Prives, C. (1996). p53: puzzle and paradigm., Genes Dev *10*, 1054-1072.

Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J. W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D. O., Franza, B. R., and Roberts, J. M. (1992). Formation and activation of a cyclin E-CdK2 complex during the G1 phase of the human cell cycle., Science *257*, 1689-1694.

Koff, A., Ohtsuki, M., Polyak, K., Roberts, J. M., and Massague, J. (1993). Negative regulation of G1 in mammalian cells : inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF-B., Science *260*, 536-539.

Kontermann, K., and Bayreuther, K. (1979). The cellular aging of rat fibroblasts *in vitro* is a differentiation process., Gerontology *25*, 261-274.

Kouzarides, T. (1995). Transcriptional control by the retinoblastoma protein., Semin Cancer Biol *6*, 91-98.

Krek, W., Ewen, M. E., Shirodkar, S., Arany, Z., Kaelin, W. G. J., and Livingston, D. M. (1994). Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase., Cell *78*, 161-172.

Kuchino, Y., Mori, F., Kasai, H., Inoue, H., Iwai, S., Miura, K., Ohtsuka, E., and Nishimura, S. (1987). Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues., Nature *327*, 77-79.

Kulju, K. S., and Lehmn, J. M. (1995). Increased p53 protein associated with aging in human diploid fibroblasts, Exp Cell Res *217*, 336-345.

Kumazaki, T., Kobayashi, M., and Mitsui, Y. (1993). Enhanced expression of fibronectin during *in vivo* cellular aging of human vascular endothelial cells and skin fibroblasts., Exp Cell Res *205*, 396-402.

Kumazaki, T., Robetorye, R. S., Robetorye, S. C., and Smith, J. R. (1991). Fibronectin expression increases during *in vitro* cellular senescence : correlation with increased cell area., Exp Cell Res *195*, 13-19.

Kupprion, C., Motamed, K., and Sage, E. H. (1998). SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells., J Biol Chem *273*, 29635-29640.

Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated ß-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells, J Cell Sci *113*, 3613-3622.

La Thangue, N. B. (1994). DRTF1/E2F : an expanding family of heterodimeric transcription factors implicated in cell-cycle control., Trends Biochem Sci *19*, 108-114.

Labbe, J. C., Picard, A., Peaucellier, G., Cavadore, J. C., Nurse, P., and Doree, M. (1989). Purification of MPF from starfish : identification as the H1 histone kinase p34cdc2 and a possible mechanism for its periodic activation., Cell *57*, 253-263.

Lawson, D., Harrison, M., and Shapland, C. (1997). Fibroblasts transgelin and smooth muscle SM22α are the same protein, the expression of which is down-regulated in many cell lines., Cell motil Cytoskel *38*, 250-257.

Le Guilly, Y., Simon, M., Lenoir, P., and Bourel, M. (1973). Long-term culture of human adult liver cells: morphological changes related to in vitro senescence and effect of donor's age on growth potential, Gerontologia *19*, 303-313.

Lebovitz, R. M., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright JR, J., Dionne, L., Lu, N., Huang, S., and Matzuk, M. M. (1996). Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice., Proc Natl Acad Sci USA *93*, 9782-9787.

Ledda, M. F., Adris, S., Bravo, A., Kairiyama, C., Bover, L., Chernajovsky, Y., Mordoh, J., and Podhajcer, O. L. (1997). Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells., Nature Medicine *3*, 171-176.

Lee, C. M., Chung, S. S., Kaczkowski, J. M., Weindruch, R., and Aiken, J. M. (1993). Multiple mitochondrial DNA deletions associated with age in skeletal muscle of rhesus monkeys, J Gerontol *48*, B201-B205.

Lee, C. M., Eimon, P., Weindruch, R., and Aiken, J. M. (1994a). Direct repeat sequences are not required at the breakpoints of age-associated mitochondrial DNA deletions in rhesus monkeys., Mech Ageing Dev *75*, 69-79.

Lee, H.-C., Pang, C.-Y., Hsu, H.-S., and Wei, Y.-H. (1994b). Differential accumulation of 4,977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing., Biochem Biophys Acta *1226*, 37-43.

Lee, M.-H., Reynisdottir, I., and Massague, J. (1995). Cloning of $p57^{KIP2}$, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution., Genes Dev *9*, 639-649.

Lees, E. (1995). Cyclin dependent kinase regulation, Curr Opin Cell Biol *7*, 773-780.

Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division., Cell *88*, 323-331.

Levy, M. Z., Allsopp, R. C., Fuchter, A. B., Greider, C. W., and Harley, C. B. (1992). Telomere end-replication problem and cell aging, J Mol Biol *225*, 951-960.

Lewin, B. (1994). Genes V (Oxford, Oxford University Press).

Lezza, A. M. S., Boffoli, D., Scacco, C., Cantatore, P., and Galaleta, M. N. (1994). Correlation between mitochondrial DNA 4977 bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles., Biochem Biophys Res Com *205*, 772-779.

Li, B., and Comai, L. (2000). Functional interaction between Ku and the Werner Syndrome protein in DNA end processing., J Biol Chem *275*, 28349-28352.

Li, Y., Huang, T. T., Carlson, E. J., Melov, S., Ursell, P. C., Olson, J. L., Noble, L. J., Yoshimura, M. P., Berger, C., and Chan, P. H. (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase., Nat Genet *11*, 376-381.

Lindsey, J., McGill, N. I., Lindsey, L. A., Green, D. K., and Cooke, H. J. (1991). *In vivo* loss of telomeric repeats with age in humans., Mutat Res *256*, 45-48.

Lithgow, G. J., White, T. M., Melov, S., and Johnson, T. E. (1995). Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress, Proc Natl Acad Sci *92*, 7540-7544.

Liu, H. T., Gibson, C. W., Hirschhorm, R. R., Rittling, S., Baserga, R., and Mercer, W. E. (1985). Expression of the thymidine kinase and dihydrofolate reductase genes in mammalian Ts mutants of the cell cycle., J Biol Chem *260*, 3269-3274.

Liu, V. W., Zhang, C., and Nagley, P. (1998). Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing., Nucl Acids Res *26*, 1268-1275.

Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., and Darnell, J. (1995). Molecular Cell Biology, 3d edn (New York, Scientifique American Book).

Loeb, G. A., Skelton, D. C., Coates, T. D., and Forman, H. J. (1988). Role of selenium-dependant glutathione peroxidase in antioxidant defense in rat alveolar macrophages, Exp Lung Res *14*, 921-936.

Lorentz, M., Saretski, G., Sitte, N., Metzkow, S., and von Zglinicki, T. (2001). BJ fibroblasts display high antioxidant capacity and slow telomere shortening independent of hTERT transfection, Free Rad Biol Med *31*, 824-831.

Lucibello, F. C., Sewing, A., Brüsselbach, S., Bürger, C., and Müller, R. (1993). Deregulation of cyclins D1 and E and suppression of CdK2 and CdK4 in senescent human fibroblasts, J Cell Sci *105*, 123-133.

Lunec, J. (1990). Free radicals: their involvement in disease processes, Ann Clin Biochem *27*, 173-182.

Luo, Y., Hurwitz, J., and Massague, J. (1995). Cell-cycle inhibition by independent CdK and PCNA binding domains in $p21^{Cip1}$, Nature *375*, 159-161.

Macias-Silva, M. (1996). MADR2 is a substrate of the TGF-ß receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signalling, Cell *87*, 1215-1224.

Macieira-Coelho, A. (2001). Neoplastic disease through the human life span, Biogerontol *2*, 179-192.

Macieira-Coelho, A., Pontén, J., and Philipson, L. (1966). The division cycle and RNA synthesis in diploid human cells at different passage levels *in vitro*., Exp Cell Res *42*, 673-684.

Macieira-Coelho, A., and Taboury, F. (1982). A re-evaluation of the changes in proliferation in human fibroblasts during ageing *in vitro*., Cell Tissue Kinet *15*, 213-224.

Macleod, K. F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B., and Jacks, T. (1995). p53-dependent and independent expression of $p21^{Waf-1}$ during cell growth, differentiation, and DNA damage., Genes Dev *9*, 935-944.

Mäkelä, T. P., Tassan, J.-P., Nigg, E. A., Frutiger, S., Hughes, G. J., and Weinberg, R. A. (1994). A cyclin associated with the CdK-activating kinase MO15, Nature *371*, 254-257.

Marklund, S. L. (1984). Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines, J Clin Invest *74*, 1398-1403.

Martin, G. M., Sprague, C. A., and Epstein, C. J. (1970). Replicative lifespan of cultured human cells: effects of donor age, tissue, and genotype, Lab Invest *23*, 86-92.

Massagué, J. (1990). The transforming growth factor-ß family, Ann Rev Cell Biol *6*, 597-641.

Massagué, J. (1998). TGF-ß signal transduction, Annu Rev Biochem *67*, 753-791.

Matsumura, T. (1980). Multinucleation and polyploidization of aging human cells in culture., Adv Exp Med Biol *129*, 31-38.

Matsuoka, S., Edwards, M. C., Bai, C., parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J. W., and Elledge, S. J. (1995). $p57^{Kip2}$, a structurally distinct member of the $p21^{Cip1}$ CdK inhibitor familly, is a candidate tumor suppressor gene, Genes Dev *9*.

Matsushime, H., Quelle, D. E., Shurtleff, S. A., Shibuya, M., Sherr, C. J., and Kato, J. Y. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells., Mol Cell Biol *14*, 2066-2076.

Mazars, G. R., and Jat, P. S. (1997). Expression of p24, a novel $p21^{Waf1/Cip1/Sdi1}$-related protein correlates with measurement of the finite proliferative potential of rodent embryo fibroblasts., Proc Natl Acad Sci USA *94*, 151-156.

McCaffrey, T.A., Falcone, D.J. (1993). Evidence for an age-related dysfunction in the anti-proliferative response to transforming growth-factor-ß in vascular smooth muscle cells, Mol. Biol. Cell *4*, 315-322.

Meier, B., Jesaitis, A. J., Emmendorffer, A., Roesler, J., and Quinn, M. T. (1993). The cytochrome b-558 molecules involved in the fibroblasts and polymorphonuclear leucocytes superoxide-generating NADPH oxidase system are structurally and genetically distinct, Biochem J *289*, 481-486.

Melov, S., Coskun, P., Patel, M., Tuinstra, R., Cottrell, B., Jun, A. S., Zastawny, T. H., Dizdaroglu, M., Goodman, S. I., Huang, T.-T., *et al.* (1999). Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice., Proc Natl Acad Sci USA *96*, 846-851.

Melov, S., Ravenscroft, J., Malik, S., Gill, M. S., Walker, D. W., Clayton, P. E., Wallace, D. C., Malfroy, B., Doctrow, S. R., and Lithgow, G. J. (2000). Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics., Science *289*, 1567-1569.

Mendez, M. V., Stanley, A., Park, H. Y., Shon, K., Phillips, T., and Menzoian, J. O. (1998). Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence., J Vasc Surg *28*, 876-883.

Merry, B. J. (1991). Effect of dietary restriction lifespan., Rev Clin Geront *1*, 203-213.

Meyerson, M., and Harlow, E. (1994). Identification of G1 kinase activity for CdK6, a novel cyclin D partner., Mol Cell Biol *14*, 2077-2086.

Meyne, J., Ratliff, R. L., and Moyzis, R. K. (1989). Conservation of human telomere sequence (TTAGGG)n among vertebrates., Proc Natl Acad Sci USA *86*, 7049-7053.

Michikawa, Y., Mazzucchelli, F., Bresolin, N., Scarlato, G., and Attardi, G. (1999). Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication, Science *286*, 774-779.

Millis, A. J. T., Sottile, J., Hoyle, M., Mann, D. M., and Diemer, V. (1989). Collagenase production by early and late passage cultures of human fibroblasts., Exp Gerontol *24*, 559-575.

Mittnacht, S., and Weinberg, R. A. (1991). G1/S phosphorylation of the retinoblastoma protein is associated with an altered affinity for the nuclear compartment., Cell *65*, 381-393.

Miyazaki, M., Ohashi, R., Tsuji, T., and Mihara, K. (1998). Transforming growth factor-ß1 stimulates or inhibits cell growth via down- or up-regulation of $p21^{Waf-1}$., Bioch Biophys Res Com *246*, 873-880.

Mocali, A., Caldini, R., Chevanne, M., and Paoletti, F. (1995). Induction, effects, and quantification of sublethal oxidative stress by hydrogen peroxide on cultured human fibroblasts., Exp Cell Res *216*, 388-395.

Mok, S. C., Chan, W. Y., Wong, K. K., Muto, M. G., and Berkovitz, R. S. (1996). SPARC, an extracellular matrix protein with tumor-suppressing activity in human ovarian epithelial cells., Oncogene *12*, 1895-1901.

Mollenhauer, J., and Bayreuther, K. (1986). Donor-age-related changes in the morphology, growth potential, and collagen biosynthesis in rat fibroblast subpopulations *in vitro*., Differentiation *32*, 165-172.

Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., and Levine, A. J. (1992). The *Mdm-2* oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation., Cell *69*, 1237-1245.

Montserrat, J., Estanyol, J.-M., Serratosa, J., Agell, N., and Bachs, O. (1999). Activation of CdK4 and CdK2 during rat liver regeneration is associated with intracellular rearrangements of cyclin-CdK complexes, Hepatology *29*, 385-395.

Moore, B. A., Aznavoorian, S., Engler, J. A., and Windsor, L. J. (2000). Induction of collagenase-3 (MMP-13) in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts., Biochem Biophys Acta *1502*, 307-318.

Morgan, D. O. (1996). The dynamics of cyclin dependent kinase structure, Curr Opin Cell Biol *8*, 767-772.

Moustakas, A., and Kardassis, D. (1998). Regulation of tne human $p21^{Waf-1/Cip1}$ promoter in hepatic cells by functional interactions between Sp1 and Smad familly members., Proc Nat Acad Sci USA *95*, 6733-6738.

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

Munro, J. S., K., Morrison, V., Ireland, H., and Parkinson, E. K. (2001). Human fibroblast replicative senescence can occur in the absence of extensive cell division and short telomeres, Oncogene *20*, 3541-3552.

Murakami, S., Tedesco, P. M., Cypser, J. R., and Jonhson, T. E. (2000). Molecular genetic mechanisms of life span manipulation in *Caenorabditis elegans*., Ann N Y Acad Sci *908*, 40-49.

Murphy, M., and Levine, A. (1997). The role of p53 in apoptosis. In Apoptosis Regulatory Genes, C. Potten, C. Booth, and J. Wilson, eds. (Thompson Science).

Nakanishi, M., Robetorye, R. S., Pereira, S. O., and Smith, J. R. (1995). The C-terminal region of $p21^{SDI1/Waf-1/Cip1}$ is involved in proliferating cell nuclear antigen binding but does not appear to be required for growth inhibition, J Biol Chem *270*, 17060-17063.

Naveilhan, P., Baudet, C., Jabbour, W., and Wion, D. (1994). A theory that may explain the Hayflick limit a means ta delete one copy of a repeating sequence during each cell cycle in human cells such as fibroblasts, Mech Age Dev *75*, 205-213.

Nelson, D. A., Krucher, N. A., and Ludlow, J. W. (1997). High molecular weight protein phosphatase type 1 dephosphorylates the retinoblastoma protein, J Biol Chem *272*, 4528-4535.

Nevins, J. R. (1992). E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins, Science *258*, 424-429.

Nevins, J. R., Leone, G., DeGregori, J., and Jakoi, L. (1997). Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control., J Cell Physiol *173*, 233-236.

Ning, Y., Weber, J. L., Killary, A. M., Ledbetter, D. H., and Pereira-Smith, O. M. (1991). Genetics analysis of indefinite division in human cells: evidence for a senescence related gene(s) on human chromosome 4., Proc Natl Acad Sci USA *88*, 5635-5639.

Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J.-I., Cao, Z., Matsumoto, K. (1999). The kinase TAK1 can activate the NIK-IkappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway, Nature *398*, 252-256.

Noda, A., Ning, Y., Venable, S. F., Pereira-Smith, O. M., and Smith, J. R. (1994). Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA using an expression screen., Exp Cell Res *211*, 90-98.

Nohl, H., and Hegner, D. (1978). Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo ?, Eur J Biochem *82*, 563-567.

Ochi, T. (1992). Inhibition of glutathione peroxidase by t-BHP in cultured Chinese hamster cells and the role of cellular glutathione in the recovery of the activity, Toxicology *71*, 119-127.

Ogryzko, V. V., Hirai, T. H., Russanova, V. R., Barbie, D. A., and Howard, B. H. (1996). Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent, Mol Cell Biol *16*, 5210-5218.

Oliner, J. D., Kinsler, K. W., Meltzer, P. S., George, D. L., and Vogelstein, B. (1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas., Nature *358*, 80-83.

Orr, W. C., and Sohal, R. S. (1994). Extension of life-span by overexpression of superoxyde dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*., Science *263*, 1128-1130.

Osiewacz, H. D. (1996). Nuclear-mitochondrial interactions involved in biological ageing. In Molecular gerontology. Research status and strategies., S. I. Rattan, and O. Toussaint, eds. (New York, Plenum Press), pp. 37-52.

Owens, G. K. (1998). Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation., Acta Physiol Scand *164*, 623-635.

Ozawa, T., Sugiyama, S., Tanaka, M., and Haltori, K. (1991). Mitochondrial DNA mutations and disturbances of energy metabolism in myocardium, Japan Circ J *55*, 1158-1164.

Packer, L., and Fuehr, K. (1977). Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells., Nature *267*, 423-425.

Pagano, M., Pepperkok, R., Lukas, J., Baldin, V., Ansorge, W., Bartek, J., and Draetta, G. (1993). Regulation of the cell cycle by the CdK2 protein kinase in cultured human fibroblasts., J Cell Biol *121*, 101-111.

Palsson McDermott, E., and O'neill, A. J. (2002). Ras participates in the activation of p38 Mapk by IL-1 by associating with IRAK, IRAK2, TRAF6 and TAK-1, J Biol Chem *277*, 7808-7815.

Pandey, P., Raingeaud, J., Kaneki, M., Weichselbaum, R., Davis, R. J., Kufe, D., and Kharbanda, S. (1996). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by c-abl-dependent and indepent mechanisms, J Biol Chem *271*, 23775-23779.

Pang, C. Y., Lee, H. C., Yang, J. H., and Wei, Y. H. (1994). Human skin mitochondrial DNA deletions associated with light exposure., Arch Biochem Biophys *312*, 534-538.

Pang, J. H., and Chen, K. Y. (1994a). Global change of gene expression at late G1/S boundary may occur in human IMR-90 diploid fibroblasts during senescence., J Cell Physiol *160*, 531-538.

Pang, J. P., and Chen, K. Y. (1993). A specific CCAAT-binding protein, CBP/tk, may be involved in the regulation of thymidine kinase gene expression in human IMR-90 diploid fibroblasts during senescence., J Biol Chem *268*, 2909-2916.

Parchment, R. E., Lewellyn, A., Swartzendruber, D., and Pierce, G. B. (1990). Serum amine oxidase activity contributes to crisis in mouse embryo cell lines, Proc Natl Acad Sci *87*, 4340-4344.

Pardee, A. (1989). G1 events and regulation of proliferation, Science *146*, 603-608.

Park, K., Choe, J., Osifchin, N. E., Templeton, D. J., Robbins, P. D., and Kim, S.-J. (1994). The human retinoblastoma susceptibility gene promoter is positively autoregulated by its own product, J Biol Chem *269*, 6083-6088.

Parry, D., Bates, S., Mann, D. J., and Peters, G. (1995). Lack of cyclin D-CdK complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of $p16^{INK4/MTS1}$ tumor suppressor gene product., EMBO J *14*, 503-511.

Petersen, S., Saretski, G., and von Zglinicki, T. (1998). Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts, Exp Cell Res *239*, 152-160.

Phillips, P. D., and Pignolo, R. J. (1992a). Altered expression of cell cycle dependent genes in senescent WI-38 cells., Exp Gerontol *27*, 403-407.

Phillips, P. D., Pignolo, R. J., Nishikura, K., and Cristofalo, V. J. (1992). Renewed DNA synthesis in senescent WI-38 cells by expression of an inducible c-Fos construct, J Cell Physiol *151*, 206-212.

Pichler, R. H., Bassuk, J. A., Hugo, C., Reed, M. J., Eng, E., Gordon, K. L., Pippin, J., Alpers, C. E., Couser, W. G., Sage, E. H., and Johnson, R. J. (1996). SPARC is expressed by mesanglial cells in experimental mesanglial proliferative nephritis and inhibits platelet-derived-growth-factor-mediated mesanglial cell proliferation *in vitro*., Am J Pathol *148*, 1153-1167.

Pigeolet, E., and Remacle, J. (1991). Susceptibility of glutathione peroxidase to proteolysis after oxidative alteration by peroxides and hydroxyl radicals, Free Rad Biol Med *11*, 191-195.

Pignolo, R. J., Cristofalo, V. J., and Phillips, P. D. (1990). Altered expression of AP-1 binding activity but not c-Jun or JunB mRNA expression in senescent WI-38 cells., J Cell Biol *111*, 498 (abstr).

Pines, J. (1994). Arresting developments in cell cycle control., Trends Biochem Sci *19*, 760-763.

Polyak, K., Kato, J. Y., Solomon, M. J., Sheer, C. J., Massague, J., Roberts, J. M., and Koff, A. (1994b). $p27^{Kip1}$, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest., Genes Dev *8*, 9-22.

Polyak, K., Lee, M. H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J. M., Tempst, P., and Massague, J. (1994a). Cloning of $p27^{Kip1}$, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals, Cell *78*, 59-66.

Poon, R. Y. C., Yamashita, K., Adamczewski, J. P., Hunt, T., and Shuttleworth, J. (1993). The cdc2-related protein $p40^{MO15}$ is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate $p33^{cdk2}$ and $p34^{cdc2}$, EMBO J *12*, 3123-3132.

Prelich, G., Tan, C. K., Kostura, M., Mathews, M. B., So, A. G., Downey, K. M., and Stillman, B. (1987). Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase ∂ auxiliary protein., Nature *236*, 517-520.

Price, G. B., Modak, S. P., and Makinodan, T. (1971). Age associated changes in the DNA of mouse tissue., Science *171*, 917-920.

Prives, C. (1993). Doing the right thing: feedback control and p53, Curr Opin Cell Biol *5*, 214-18.

Pryor, W. A. (1976). The role of free radical reactions in biological system. In Free radical in biology, W. A. Pryor, ed. (London, Academic Press Inc.), pp. 1-49.

Quelle, D. E., Ashmun, R. A., Shurtleff, S. A., Kato, J. Y., Bar-Sagi, D., Roussel, M. F., and Sheer, C. J. (1993). Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts., Genes Dev *7*, 1559-1571.

Raes, M., De Brabander, M., and Remacle, J. (1984). Polyploid cells in ageing hamster fibroblasts *in vitro* : possible implication of the centrosome., Eur J Biol *35*, 70-80.

Raines, E. W., Lane, T. F., Iruela-Arispe, M. L., Ross, R., and Sage, E. H. (1992). The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors., Proc Natl Acad Sci USA *89*, 1281-1285.

Ramirez, R. D., Morales, C. P., Herbert, B. S., Rohde, J. M., Passons, C., Shay, J. W., and Wright, W. E. (2001). Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions, Genes Dev *15*, 398-403.

Rank, K. B., Evans, D. B., and Sharma, S. K. (2000). The N-terminal domains of cyclin-dependent kinase inhibitory proteins block the phosphorylation of CdK2/cyclin E by the CdK-activating kinase, Biochem Biophys Res Comm *271*, 469-473.

Rattan, S. I. (2001). "I no longer believe that cell death is programmed...", an interview with Vincent cristofalo, Biogerontol *2*, 283-290.

Ravitz, M. J., and Wenner, C. E. (1997). Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF-ß. In Adv. Cancer Res. (Academic Press), pp. 165-207.

Rawn, J. D. (1990). Biochimie (Paris, De Boek-Wesmael, Edition Universitaire).

Reed, M. J., Vernon, R. B., and Sage, E. H. (1994). TGF-ß1 induces the expression of type I collagen and SPARC, and enhances contraction of collagen gels, by fibroblasts from young and aged donors., J Cell Physiol *158*, 169-179.

Reis, U., and Gershon, D. (1976). Rat liver superoxide dismutase. Purification and age-related modifications, Eur J Biochem *63*, 617-662.

Remacle, J., Houbion, A., and Houben, A. (1980). Subcellular fraction of WI-38 fibroblasts. Comparaison between young and old cells, Biochem Biophys Acta *630*, 57-70.

Reznikoff, C. A., Yaeger, T. R., Belair, C. D., Savelina, E., Phthenveettil, J. A., and Stadler, W. M. (1996). Elevetated p16 at senescence and loss of p16 at immortalization in human papillomavirus 16 E6, but not E7, transformed uroepithelial cells, Cancer Res *56*, 2886-2910.

Rittling, S. R., Brooks, K. M., Cristofalo, V. M., and Baserga, R. (1986). Expression of cell cycle-dependent genes in young and senescent WI-38 fibroblasts., Proc Natl Acad Sci USA *83*, 3316-3320.

Roberts, A. B., Anzano, M. A., Lamb, L. C., Smith, J. M., and Sporn, M. B. (1981). New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor, Proc Natl Acad Sci USA *78*, 5339-5343.

Robetorye, R. S., Nakanishi, M., Venable, S. F., Pereira-Smith, O. M., and Smith, J. R. (1996). Regulation of $p21^{SDI1/Cip1/Waf-1/mda-6}$ and expression of other cyclin-dependent kinase inhibitors in senescent human cells, Mol Cell Diff *4*, 113-126.

Robson, N., Gnanapragasam, V., Byrne, R. L., Collins, A. T., and Neal, D. E. (1999). Transforming growth factor-ß1 up-regulated p15, p21 and p27 and blocks cell cycling in G1 in human prostate epithelium, Endocrinology *160*, 257-266.

Rogan, E. M., Bryan, T. M., Hukku, B., Maclean, K., Chang, A. C., Moy, E. L., Englezou, A., Warneford, S. G., Dalla-Poza, L., and Reddel, R. R. (1995). Alterations in p53 and $p16^{Ink-4a}$ expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome fibroblasts., Mol Cell Biol *15*, 4745-4753.

Röhme, D. (1981). Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and lifespans of normal fibroblasts *in vitro* and erythrocytes *in vivo*, Proc Natl Acad Sci USA *78*, 5009-5013.

Rosenberg, R. F. (1991). Senescence and the accumulation of abnormal proteins, Mut Res *256*, 255-262.

Roth, G. S., Ingram, D. K., and Lane, M. A. (1995). Slowing ageing by caloric restriction., Nat Med *1*, 414-415.

Rubin, E., Tamrakar, S., and Ludlow, J. W. (1998). Protein phosphatase type 1, the product of the retinoblastoma susceptibility gene, and cell cycle control., Front Biosc *3*, 1209-1219.

Ruddock, L. W., Klappa, P. (1999). Oxidative stress: protein folding with a novel redox switch, Curr. Biol. *9*, R400-R402.

Rudolph, K. L., Millard, M., Bosenberg, M. W., and DePinho, R. A. (2001). Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans, Nat Genet *28*, 155-159.

Russo, A. A., Jeffrey, P. D., and Pavletich, N. P. (1996). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation, Nature Struct Biol *3*, 696-700.

Sage, E. H., Bassuk, J. A., Yost, J. C., Folkman, M. J., and Lane, T. F. (1995). Inhibition of endothelial cell proliferation by SPARC is mediated through a Ca(2+)-binding EF-hand sequence., J Cell Biochem *57*, 127-140.

Sai, K., Takagi, A., Umemura, T., Hasegawa, R., and Kurokawa, Y. (1992). Changes of 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organ DNA during the aging process., J Environ Pathol Toxicol Oncol *11*, 139-143.

Saito, H., Hammond, A. T., and Moses, R. E. (1995). The effect of low oxygen tension on the *in vitro*-replicative life span of human diploid fibroblast cells and their transformed derivatives., Exp Cell Res *217*, 272-279.

Salk, D. (1982). Werner syndrome: a review of recent research with an analysis of connective tissue metabolism, growth control of cultured cells, and chromosomal aberrations, Hum Genetics *62*.

Salk, D., Au, K., Hoehn, H., and Martin, G. M. (1981a). Evidence of clonal attenuation, clonal succession and clonal expansion in mass cultures of aging Werner's syndrome skin fibroblasts., Cytogenet Cell Genet *30*, 108-117.

Salk, D., Bryant, E., Au, K., Hoehn, H., and Martin, G. M. (1981b). Systematic growth studies, cocultivation and cell hybridation studies of Werner syndrome cultured skin fibroblasts, Hum Genetics *58*, 310-316.

Sano, Y., Harada, J., Tashiro, S., Gotoh-Mandeville, R., Maekawa, T., and Ishii, S. (1999). ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-ß signalling., J Biol Chem *274*, 8949-57.

Schneider, E., Montenarh, M., and Wagner, P. (1998). Regulation of CAK activity by p53, Oncogene *17*, 2733-2741.

Schneider, E. L., and Mitsui, Y. (1976). The relationship between *in vitro* cellular aging and *in vivo* human age, Proc Natl Acad Sci USA *73*, 3584-3588.

Schwochau, G. B., Nath, K. A., and Rosenberg, M. E. (1998). Clusterin protects against oxidative stress *in vitro* through aggregative and nonaggregative properties., Kidney Int *53*, 1647-1653.

Sellers, W. R., and Kaelin, W. G. (1996). xRb as a modulator of transcription, Bioch Biophys Acta *1288*, M1-M5.

Serrano, M., and Blasco, M. A. (2001). Putting the stress on senescence, Curr Opin Cell Biol *13*, 748-753.

Serrano, M., Hannon, G., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CdK4, Nature *366*, 704-707.

Serrano, M., Lee, H., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D., and DePinho, R. A. (1996). Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality., Cell *85*, 27-37.

Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., and Lowe, S. W. (1997). Oncogenic Ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and $p16^{Ink-4a}$., Cell *88*, 593-602.

Seshadri, T., and Campisi, J. (1990). C-fos repression and an altered genetic program in senescence humam fibroblastes, Science *247*, 205-209.

Shackelford, R. E., Kaufmann, W. K., and Paules, R. S. (2000). Oxidative stress and cell cycle checkpoint function, Free Rad Biol Med *28*, 1387-1404.

Sherwood, S. W., Rush, D., Ellsworth, J. L., and Schimke, R. T. (1988). Defining cellular senescence in IMR-90 cells : a flow cytometry analysis., Proc Natl Acad Sci USA *85*, 9086-9090.

Shiba, H., Fujita, T., Doi, N., Nakamura, S., Nakanishi, K., Takemoto, T., Hino, T., Noshiro, M., Kawamoto, T., Kurihara, H., and Kato, Y. (1998). Differential effects of various growth factors and cytokines on the synthesis of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture., J Cell Physiol *174*, 194-205.

Shigenaga, M. K., Hagen, T. M., and Ames, B. N. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging, Proc natl Acad Sci USA *91*, 10771-10778.

Shimasaki, H., Nozawa, T., Privett, O. S., and Anderson, W. R. (1977). Dectection of age-related fluorescent substances in rat tissues., Arch Biochem Biophys *183*, 443-451.

Shiraha, H., Gupta, K., Drabik, K., and Wells, A. (2000). Aging fibroblats present reduced epidermal growth factor (EGF) responsiveness due to preferential loss of EGF receptors, J Biol Chem *275*, 19343-19351.

Shishibori, T., Yamashita, K., Bandoh, J., Oyama, Y., and Kobayashi, R. (1996). Presence of Ca2+-sensitive and -insensitive SM22α isoproteins in bovine aorta., Biochem Biophys Res Commun *229*, 225-230.

Shoffner, J. M., Lott, M. T., Voljavec, A. S., Soueidan, S. A., Costigan, D. A., and Wallace, D. C. (1989). Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with mitochondrial DNA deletion: a slip replication model and metabolic therapy, Proc Natl Acad Sci USA *86*, 7952-7956.

Sigal, S. H., Rajvinshi, P., Gorla, G. R., Sokhi, R. P., Saxena, R., Gebhard, D. R., Reid, L. M., and Gupta, S. (1999). Partial hepatotectomy-induced polyploid attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events, Am J Physiol *276*, G1260-G1272.

Sitte, N., Huber, M., Grune, T., Ladhoff, A., Doecke, W. D., Von Zglinicki, T., and Davies, K. J. (2000). Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts., FASEB J *14*, 1490-1498.

Sitte, N., Saretzki, G., and von Zglinicki, T. (1998). Accelerated telomeres shorthening in fibroblasts after extended periods of confluency, Free Radic Biol Med *24*, 885-893.

Siwik, D. A., Chang, D. L., and Colucci, W. S. (2000). Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts *in vitro*., Circ Res *86*, 1259-1265.

Sladek, T. L. (1997). E2F transcription factor action, regulation and possible role in human cancer., Cell Prolif *30*, 97-105.

Slansky, J. E., and Farnham, P. J. (1996). Introduction to the E2F family : protein structure and gene regulation., Curr Top Microbiol Immunol *208*, 1-30.

Small, J. V., and Gimona, M. (1998). The cytoskeleton of the vertebrate smooth muscle cell, Acta Physiol Scand *164*, 341-348.

Smith, J. R. (1992). Inhibitors of DNA synthesis derived from senescent human diploid fibroblasts., Exp Gerontol *27*, 409-412.

Sohal, R. S., and Brunk, U. T. (1989). Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and ageing., Adv Exp Med Biol *266*, 17-29.

Sohal, R. S., and Dubey, A. (1994). Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging., Free Radic Biol Med *16*, 621-626.

Sohal, R. S., and Orr, W. C. (1992). Relationship between antioxidants, prooxidants, and the ageing process., Ann NY Acad Sci *663*, 74-84.

Sohal, R. S., and Sohal, B. H. (1991). Hydrogen peroxide release by mitochondria increases during ageing., Mech Ageing Dev *57*, 187-202.

Sohal, R. S., Sohal, B. H., and Brunk, U. T. (1990a). Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species., Mech Ageing Dev *53*, 217-227.

Sohal, R. S., Sohal, B. H., and Orr, W. C. (1995b). Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies., Free Rad Biol Med *19*, 499-504.

Sohal, R. S., Svensson, I., and Brunk, U. T. (1990b). Hydrogen peroxide production by liver mitochondria in different species., Mech Ageing Dev *53*, 209-215.

Sohal, R. S., Svensson, I., Sohal, B. H., and Brunk, U. T. (1989a). Superoxyde anion radical product different animal species., Mech Ageing Dev *53*, 129-135.

Sohal, R. S., and Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and ageing., Science *273*, 59-63.

Solomon, M. J., Harper, J. W., and Shuttleworth, J. (1993). CAK, the $p34^{cdc2}$ activating kinase, contains a protein identical or closely related to $p40^{MO15}$, EMBO J *12*, 3133-3142.

Solomon, M. J., and Kaldis, P. (1998). Regulation of CdKs by phosphorylation. In Cell cycle control, M. Pagano, ed. (Heilderberg, Springer), pp. 79-109.

Srebrow, A., Muro, A. F., Werbajh, S., Sharp, P. A., and Kornblihtt, A. R. (1993). the CRE-binding factor ATF-2 facilitates the occupation of the CCAAT box in the fibronectin gene promoter, FEBS Lett *327*, 28-8.

Stein, G. H., Drullinger, L. F., Robetorye, R. S., Pereira-Smith, O. M., and Smith, J. R. (1991). Senescent cells fail to express cdc2, cycline A, and cycline B in response to mitogen stimulation., Proc Natl Acad Sci USA *88*, 11012-11016.

Stein, G. H., and Dulic, V. (1998). Molecular mechanism for senescent cell cycle arrest, J Invest Dermatol Symp Proc *3*, 14-8.

Stein, G. H., and Duli¢, V. (1995). Origins of G1 arrest in senescent human fibroblasts., BioEssays *17*, 537-543.

Storch, T. G., and Talley, G. D. (1988). Oxygen concentration regulates the proliferative response of human fibroblasts to serum and growth factors., Exp Cell Res *175*, 317-325.

Stubbe, J., and Riggs-Gelasco, P. (1998). Harnessing free radicals: formation and function of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase., Trends Biochem Sci *23*, 438-443.

Sun, J., and Tower, J. (1999). FLP-recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the lifespan of adult *Drosophila melanogaster* flies., Mol Cell Biol *19*, 216-228.

Suzuki, T., Kim, C. H., and Yasumo, K. (1988). Deterioration of membrane morphology, phospholipids and cytoskeletal protein in rat erythrocytes exposed to tert-butylhydroperoxide: protection by exogenous glutathione falls in selenium deficiency, J Nutr Sci Vitaminol *34*, 491-506.

Tassan, J.-P., Jaquenoud, M., Fry, A. M., Frutiger, S., Hughes, G. J., and Nigg, E. A. (1995). *In vitro* assembly of a functional human CdK7-cyclin H complex requires MAT1, a novel 36 kDa ring finger protein, EMBO J *14*, 5608-5617.

Tassan, J.-P., Schutz, S. J., Bartek, J., and Nigg, E. A. (1994). Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of huma CAK, J Cell Biol *127*, 467-478.

Taylor, W. G., Camalier, R. F., and Sandford, K. K. (1978). Density-dependent effects of oxygen on the growth of mammalian fibroblasts in culture., J Cell Physiol *95*, 33-40.

Taylor, W. G., Richter, A., Evans, V. J., and Sanford, K. K. (1974). Influence of oxygen and pH on plating efficiency and colony development of WI-38 and Vero cells., Exp Cell Res *86*, 152-156.

Thannickal, V. J., Day, R. M., Klinz, S. G., Bastien, M. C., Larios, J. M., and Fanburg, B. L. (2000). Ras-dependent and independent regulation of reactive oxygen species by mitogenic growth factors and TGF-ß1., FASEB J *14*, 1741-1748.

Thannickal, V. J., and Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signalling., Am J Lung Cell Mol Physiol *279*, L1005-L1028.

Thannickal, V. J., and Fanburg, B. L. (1995). Activation of an $H_2O_2$-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor ß1., J Biol Chem *270*, 30334-30338.

Thannickal, V. J., Hassoum, P. M., White, A. C., and Fanburg, B. L. (1993). Enhanced rate of $H_2O_2$ release from pulmonary artery endothelial cells induced by TGF-ß1., Am J Physiol *265*, L622-L626.

Thelander, L., and Berg, P. (1986). Isolation and characterization of expressible cDNA clones encoding the M1 and M2 subunits of mouse ribonucleotides reductase., Mol Cell Biol *6*, 3433-3442.

Tommasino, M., and Crawford, L. (1995). Human Papillomavirus E6 and E7: proteins which deregulate the cell cycle, BioEssays *17*, 509-518.

Toussaint, O., Dumont, P., Dierick, J.-F., Pascal, T., Frippiat, C., Chainiaux, F., Magalhaes, J.-P., Eliaers, F., and Remacle, J. (2000a). Stress-induced premature senescence. Essence of live, evolution, stress & aging., Ann NY Acad Sci *908*, 86-98.

Toussaint, O., Houbion, A., and Remacle, J. (1994). Effects of modulations of the energetic metabolism on the mortality of cultured cells, Biochem Biophys Acta *1186*, 209-220.

Toussaint, O., Medrano, E. E., and von Zglinicki, T. (2000b). Stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes, Exp Gerontol *35*, 927-945.

Toussaint, O., Raes, M., and Remacle, J. (1991). Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stage., Mech Ageing Dev *64*, 45-64.

Toussaint, O., Remacle, J., Dierick, J.-F., Pascal, T., Frippiat, C., Magalhaes, J.-P., and Chainiaux, F. (2001). Hormesis: a quest to virtuality, Human Exp Tox *20*, 1-4.

Tsai, L. H., Lees, E., Faha, B., Harlow, E., and Riabowol, K. (1993). The cdk2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells., Oncogene *8*, 1593-1602.

Tsuji, Y., Ninomiya-Tsuji, J., Torti, S. V., and Torti, F. M. (1993). Selective loss of cdc2 and CdK2 induction by tumor necrosis factor-α in senescent human diploid fibroblasts., Exp Cell Res *209*, 175-182.

Turrens, J. F., and Boveris, A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria., Biochem J *191*, 421-427.

Vaziri, H., and Benchimol, S. (1996). 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 *31*, 295-301.

Viard, I., Wehrli, P., Jornot, L., Bullani, R., Vechietti, J.-L., Schifferli, J. A., Tschopp, J., and French, L. E. (1999). Clusterin gene expression mediates resistance to apoptotic cell death induced by heat shock and oxidative stress., J Invest Dermatol *112*, 290-296.

Vogt, P. K., and Reed, S. I. (1998). Cyclin dependent Kinase (CdK) Inhibitors, Vol 227, 1998 edn (Berlin, Springer-Verlag).

Volonte, D., Galbiati, F., Pestel, R. G., and Lisanti, M. P. (2001). Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-src kinase., J Biol Chem *276*, 8094-8103.

Von Zglinicki, T., Nilsson, E., Docke, W. D., and Brunk, U. T. (1995a). Lipofuscin accumulation and ageing of fibroblasts., Gerontology *41 suppl 2*, 95-108.

von Zglinicki, T., Pilger, R., and Sitte, N. (2000). Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts., Free Rad Biol Med *28*, 64-74.

Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Döcke, W., and Lotze, C. (1995b). Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts : a model for senescence ?, Exp Cell Res *220*, 186-193.

Waas, W. F., Lo, H.-H., and Dalby, K. N. (2001). The kinetic mechanism of the dual phosphorylation of the ATF-2 transcription factor by the p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase α., J Biol Chem *276*, 5676-5684.

Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., and Stillman, B. (1994). The $p21^{Waf-1}$ inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA, Nature *369*, 574-578.

Wang, S., Moerman, E. J., Jones, R. A., Thweatt, R., and Goldstein, S. (1996). Characterization of IGF-BP3, PAI-1 and SPARC mRNA expression in senescent fibroblasts., Mech Ageing Dev *92*, 121-132.

Wang, X., Martindale, J. L., Liu, Y., and Holbrook, N. (1998a). The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival, Biochem J *333*, 291-300.

Wang, X., Ohnishi, K., Takahashi, A., and Ohnishi, T. (1998b). Poly(ADP-ribosyl)ation is required for p53-dependent signal transduction induced by radiation., Oncogene *17*, 2819-2825.

Wang, X. W., and Harris, C. C. (1997). p53 tumor-suppressor gene : clues to molecular carcinogenesis., J Cell Physiol *173*, 247-255.

Warbrick, E., Lane, D. P., Glover, D. M., and Cox, L. S. (1995). A small peptide inhibitor of DNA replication defines the site of interaction between the cyclin-dependent kinase inhibitor $p21^{Waf-1}$ and proliferating cell nuclear antigen, Curr Biol *5*, 275-282.

Wazer, D. E., Liu, X.-L., Chu, K., Gao, Q., and Band, V. (1995). Immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papilloma virus 16 E6 or E7., Proc Natl Acad Sci USA *92*, 3687-3691.

Weber, J. D., Taylor, L. J., Roussel, M. F., Sherr, C. J., and Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53., Nature Cell Biol *1*, 20-26.

Webster, N. R., and Nunn, J. F. (1988). Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions., Br J Anaesth *60*, 98-108.

Wegrowski, Y., Perreau, C., Martiny, L., Haye, B., Maquart, F. X., and Bellon, G. (1999). Transforming growth factor beta-1 up-regulates clusterin synthesis in thyroid epithelial cells., Exp Cell Res *247*, 475-483.

Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control., Cell *81*, 323-330.

Weinberg, R. A. (1996). E2F and cell proliferation : a world turned upside down., Cell *85*, 457-459.

Weintraub, S. J., Prater, C. A., and Dean, D. C. (1992). Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element, Nature *358*, 259-261.

Weisiger, R. A., and Fridovich, I. (1973). Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization., J Biol Chem *248*, 4793-4796.

Weismann, A. (1889). The duration of life. In Essays upon heredity and kindred biological problems, E. B. Poulton, S. Schonland, and A. E. Shipley, eds. (Oxford, Clarendon Press), pp. 1-66.

Werness, B. A., Levinne, A. J., and Howley, P. M. (1990). Association of human papillomavirus type 16 & 18 E6 proteins with p53, Science *248*, 76-79.

West, M. D., Pereira-smith, O. M., and Smith, J. R. (1989). Replicative senescence of human skin fibroblasts correlates with a loss of regulation and overexpression of collagenase activity., Exp Cell Res *184*, 138-147.

Wick, M., Burger, C., Brusselbach, S., Lucibello, F. C., and Muller, R. (1994). A novel member of human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene family is regulated during G1 progression, mitogenic stimulation, differentiation and senescence., J Biol Chem *269*, 18953-18960.

Wilson, M. R., and Eastbrook-Smith, S. B. (2000). Clusterin is a secreted mammalian chaperone, Trends Bioch Sci *25*, 95-98.

Wolf, N. S., and Pendergrass, W. R. (1999). The relationships of animal age and caloric intake to cellular replication *in vivo* and *in vitro*: a review, J Gerontol A Biol Sci Med Sci *54*, B502-B507.

Wong, H., and Riabowol, K. (1996). Differential CdK-inhibitor gene expression in aging human diploid fibroblasts., Exp Gerontol *31*, 311-325.

Woo, R. A., McLure, K. G., Lees-Miller, S., Rancourt, D. E., and Lee, P. W. K. (1998). DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA dammage, Nature *394*, 700-704.

Wood, M. L., Dizdaroglu, M., Gajewski, E., and Essigmann, J. M. (1990). Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis : genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome., Biochemistry *29*, 7024-7032.

Wrana, J. L. (1992). TGF-ß signals trough a heterodimeric protein kinase raceptor complex, Cell *71*, 1003-1014.

Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massagué, J. (1994). Mechanism of activation of TGF-ß receptor, Nature *370*, 341-347.

Wright, W. E., and Shay, J. W. (2001). Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting, Curr Opin Gen Dev *11*, 98-103.

Wu, L., Chen, P., Shum, C. H., Chen, C., Barsky, L. W., Weinberg, K. I., Jong, A., and Triche, T. J. (2001). MAT-1 modulated CAK activity regulates cell cycle G1 exit, Mol Cell Biol *21*, 260-270.

Wyllie, F. S., Jones, C. J., Skinner, J. W., Haughton, M. F., Wallis, C., Wynford-Thomas, D., Faragher, R. G. A., and Kipling, D. (2000). Telomerase prevents the accelerated cell ageing of Werner syndrome fibroblasts, Nature Genetics *24*, 16-17.

Xie, Q. M., Kashiwabara, Y., Nathan, C. (1994). Role of transcription factor NF-KappaB/Rel in induction of nitric oxide synthase, J Biol Chem *269*, 4705-4708.

Xu, H.-J., Zhou, Y., Ji, W., Perng, G.-S., Kruzelock, R., Kong, C.-T., Bast, R. C., Mills, G. B., Li, J., and Hu, S. X. (1997). Reexpression of the retinoblastoma protein in tumor cells induces senescence and telomerase inhibition, Oncogene *15*, 2589-2596.

Yamamoto, K., Arakawa, T., Ueda, N., and Yamamoto, S. (1995). Transcriptional roles of nuclear factor kappa ß and nuclear factor interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells., J Biol Chem *270*, 31315-31320.

Yamamoto, T., Eckes, B., Mauch, C., Hartmann, K., and Krieg, T. (2000). Monocytes chemattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 alpha loop., J Immunol *164*, 6174-6179.

Yamashita, K., Yasuda, H., Pines, J., Yasumoto, K., Nishitani, H., Sugimura, T., and Nishimoto, T. (1990). Okadaïc acid, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases, activates cdc2/H1 kinase and transiently induces a premature mitosis-like state in BHK21 cells., EMBO Journal *9*, 4331-4338.

Yan, Z., Winawer, S., and Friedman, E. (1994). Two different signal transduction pathways can be activated by transforming growth factor-ß1 in epithelial cells, J Biol Chem *269*, 13231-13237.

Yang, J. H., Lee, H. C., Lin, K. J., and Wei, Y. H. (1994). A specific 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in human ageing skin., Arch Dermatol Res *286*, 386-390.

Yen, T. C., King, K. L., Lee, H. C., Yeh, S. H., and Wei, Y. H. (1994). Age dependent increase of mitochondrial DNA deletions together with lipid peroxides and superoxide dismutase in human liver mitochondria, Free Rad Biol Med *16*, 207-214.

Yen, T. C., Pang, C. Y., Hsieh, R. H., Su, C. H., King, K. L., and Wei, Y. H. (1992). Age-dependent 6 kb deletion in human liver mitochondrial DNA., Biochem Int *26*, 124-131.

Yen, T. C., Su, J. H., King, K. L., and Wei, Y. H. (1991). Ageing-associated 5 kb deletion in human liver mitochondrial DNA., Biochem Biophys Res Com *178*, 124-131.

Yoneda, K., Yokoyama, T., Hatabe, T., and Osaki, T. (1999). p53 gene mutations and p21 protein expression induced independently of p53, by TGF-β and γ–rays in squamous carcinoma cells., Eur J Cancer *35*, 278-83.

Young, P., McLaughin, M. M., kumar, S., Kassis, S., Doyle, M. L., McNulty, D., Gallagher, T. F., Fisher, S., McDonnell, P. C., Livi, G. P., *et al.* (1997). Pyridinyl Imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site., J Biol Chem *272*, 12116-12121.

Yu, C.-E., Oshima, J., Fu, Y.-H., Wijsman, E. M., Hisama, F., Alisch, R., Matthews, S., Nakura, J., Miki, T., Ouais, S., *et al.* (1996). Positional cloning of the Werner's syndrome gene, Science *272*, 258-262.

Yuan, C., Penttila, K. E., Alfthan, G., and Lindros, K. O. (1991). Role of selenium-dependant gluthatione peroxidase in protecting against t-BHP-induced damage in hepetocytes, Pharmacol Toxicol *68*, 196-200.

Yue, J., and Mulder, K. M. (2000). Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor for transforming growth factor ß-1 production in a Smad-dependent pathway., J Biol Chem *275*, 30765-30773.

Zakeri, Z., Curto, M., Hoover, D., Wightman, K., Engelhardt, J., Smith, F. F., Kierszenbaum, A. L., Gleeson, T., and Tenniswood, M. (1992). Developmental expression of the S35-S45/SGP-2/TRPM-2 gene in rat testis and epididymis., Mol Reprod Dev *33*, 373-384.

Zeng, G. Y., and Millis, A. J. (1996). Differential regulation of collagenase and stromelysin mRNA in late passage cultures of human fibroblasts., Exp Cell Res *222*, 150-156.

Zhang, H., Hannon, G. J., and Beach, D. (1994). $p21^{Waf-1}$-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states, Gene Dev *8*, 1750-1758.

Zhang, Y., and Chellappan, S. P. (1995). Cloning and characterization of human DP2, a novel dimerisation partner of E2F, Oncogene *10*, 2085-2093.

# Annexe

*Biogerontology* 1: 279–283, 2000.
© 2000 *Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.*


*Methods*

# Consideration of heteroduplexes and homoduplexes for the quantification by competitive PCR of human mitochondrial DNA deletions with ageing of tissues and cells

Christophe Frippiat, Jean-François Dierick, José Remacle & Olivier Toussaint*
*Department of Biology, Unit of Cellular Biochemistry and Biology, University of Namur (FUNDP), 61, rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium; *Author for correspondence (e-mail: olivier.toussaint@fundp.ac.be; fax: +32-81-724135)*

Received 5 January 2000; accepted in revised form 7 March 2000

*Key words:* aging, 4,977 bp deletion, competitive PCR, heteroduplexes, mitochondrial DNA

**Abstract**

The purpose of this work was first to construct two internal standards for human mitochondrial DNA mt DNA corresponding respectively to the fragment resulting from the 4,977 bp common deletion (H2del) and a fragment which was never reported to be deleted (H1). Secondly, we wished to consider the possible effect of annealing between the target and corresponding internal standard which forms heteroduplexes. These experiments show that the correction of the number of copies found by competitive PCR by considering the percentage of heteroduplexes allows a more accurate quantification of the number of target copies present in mt DNA samples. The design of internal standards specific to the fragment resulting from other deletions could also help a more accurate quantification of the frequency of other mt DNA deletions as well, and reconsideration of the role of mt DNA deletions in ageing.

*Abbreviations:* CPEO – chronic progressive external ophtalmoplegia; mt DNA – mitochondrial DNA; PCR – polymerase chain reaction; UV – ultraviolet

## Introduction

The 16,569 kb long human mitochondrial genome (mt DNA) can be affected by very numerous different deletions – more than 150 have been described – in ageing and in many pathological conditions. The common 4,977 bp long deletion has been associated with cellular ageing (Liu et al. 1998; Lezza et al. 1994; Lee et al. 1994; Cortopassi et al. 1992), exposure of skin to UV (Pang et al. 1994), cardiomyopathy, Parkinson disease and progressive external ophtalmoplegia (CPEO) (Holt et al. 1988; Lestienne 1992; Wallace 1999). Various PCR-based techniques have been proposed to quantify this deletion in aged tissues or cells. Serial dilution PCR, kinetic PCR as well as PCR using external standard are poorly quantitative (Laitinen et al. 1994; Hamblet et al. 1995). Competitive PCR is based on the use of internal standard which length and sequence is very similar to the target DNA fragment to be quantified. The primers used for amplifying the internal standard and the target DNA are also often the same.

The final number of deletions found by competitive PCR depends on the total number of mitochondrial genomes, deleted or not, present in the mt DNA sample. Therefore competitive PCR uses two internal standards corresponding respectively to the fragment resulting from the 4,977 bp deletion and another fragment never reported to be deleted. This allows to calculate the ratio between the number of deleted mt DNA and the total number of mt DNA, already done with liver mt DNA of ageing rats (Filser et al. 1997).

To distinguish between the amplicons of the target DNA and internal standard, a restriction site is intro-

duced in the internal standard. However the exponential property of PCR might lead to annealing between the target DNA and internal standard, possibly falsifying the result of the PCR-based quantification. This potential problem has not yet been considered in the literature on competitive PCR.

The purpose of this work was first to construct two internal standards for human mt DNA corresponding respectively to the fragment resulting from the 4,977 bp common deletion (H2 del) and a fragment which was never reported to be deleted (H1). Secondly, we wished to consider the possible effect of annealing between the target and corresponding internal standard which forms heteroduplexes.

## Materials and methods

### *mt DNA purification*

Mitochondrial skeletal muscle of a patient with CPEO was purified by differential centrifugation before DNA extraction as described by Yen et al. (1994).

### *Internals standards and competitive PCR*

Thirty PCR cycles were performed using the AmpliTaq Gold (Perkin/Elmer, USA) in the presence of 0.025 $\mu$Ci of $\alpha$-$^{32}$P [DcTP] (PCR conditions and primers given in Table 1).

The primers used to insert the Hind III site were complementary to the specific mitochondrial sequence. However two bases were incorporated to construct Hind III restriction site plus three G to obtain a more efficient digestion of the two fragments forming the standard.

### *Purification and restriction of the PCR products*

PCR products were purified by the High Pure PCR kit (Roche, Germany). Half of the product was restricted with 10 U Hind III for 2 h. The second half was restricted by 10 U of Alu I for 2 h. The PCR products were then separated by polyacrylamide gel electrophoresis and quantified in CPM by Instant Imager (Packard, USA) and exposed to ß-max film (Amersham, Belgium).

*Table 1.* PCR conditions.

| Sequence | Standard H1 | | Standard H2del | |
|---|---|---|---|---|
| Size (bp) after restriction by Hind III | 236 fragment (1) | 297 fragment (2) | 331 fragment (1) | 193 fragment (2) |
| Mix PCR | 10 $\mu$l buffer 10X<br>8 $\mu$l $mgCl_2$<br>DNTP 200 $\mu$M<br>primers 20 pmole<br>mt DNA: 0.1$\mu$g | | 10 $\mu$l buffer 10X<br>8 $\mu$l $mgCl_2$<br>DNTP 200 $\mu$M<br>primers 20 pmole<br>mt DNA: 0.1$\mu$g | |
| Tm[a] | 54 °C | | 54 °C | |
| Primers (1) | 5′-aacatacccatggccaacct (3304–3323) | | 5′-ccgggggtatactacggtca (8150–8170)[b] | |
| | 5′-ggggaagcttggtcggggcgg tgatg (3540–3520) | | 5′-gggaagcttgagggaggtag gtagta (8458–8481)[b] | |
| Primers (2) | 5′-ggggaagcttctcaccatcgct cttctactatg (3540–3565) | | 5′-gggaagcttggcagcctagcat tagca (13480–13459)[b] | |
| | 5′-gggaggagtaatcagagaggtg (3817–3836) | | 5′-ggggaagcgaggttgacctg (13651–13631)[b] | |

[a] Melting temperature.
[b] Positions before deletion.

### *Calculation of the percentage of heteroduplexes*

After competitive PCR, the PCR products were restricted with the nuclease Alu I, separated by electrophoresis and the bands were quantified. After restriction, only the heteroduplexes of the expected size can be found since Alu I restricts both types of homoduplexes. After quantification, the sum of the CPM obtained from the heteroduplexes plus homoduplexes represents 100%. It is therefore straightforward to deduct the percentage of heteroduplexes present in this 100% value.

## Results

Two internal standards have been generated. The first internal standard (H2del) was 524 bp-long and was complementary to a 522 bp-long sequence resulting from the 4,977 bp common deletion. The second internal standard (H1) was 533 bp-long and was complementary to a 531 bp fragment of mt DNA (position 3304 to 3836) which has never been reported to be deleted. Both internal standards contained the Alu I restriction site (AGCT). To distinguish between the internal standards and the target DNA, the Alu I restriction site (AGCT) flanking sequence was

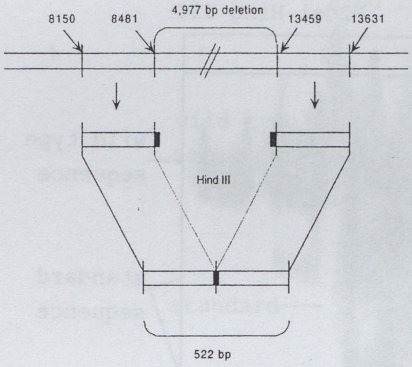



*Figure 1.* Schematic representation of the two-step process generating the H2del standard. The position of the primers are shown by the arrows. ▮: Hind III site

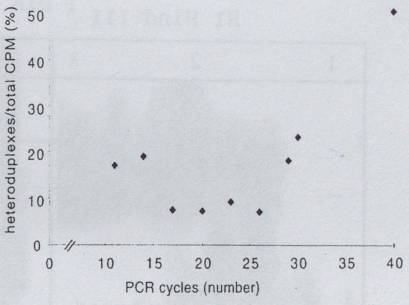



*Figure 2.* Analysis of the misannealing versus the number of cycles. After competitive PCR, the PCR products were restricted with the nuclease Alu I, separated by electrophoresis and the bands were quantified. After restriction, only the heteroduplexes of the expected size can be found since Alu I restricts both homoduplexes. After quantification, the sum of the CPM obtained from the heteroduplexes plus homoduplexes represents 100%. It is therefore straightforward to deduct the percentage of heteroduplexes present in this 100% value.

mutated into a Hind III restriction site (AAGCTT) in a two-step process. For each internal standard, two PCR products were synthesised: a first from the 5′ end to the Alu I site and a second from the Alu I site to the 3′ end (Figure 1). The sequence of the two primers complementary to the sequence flanking the Alu I site were designed so that the Alu I site becomes a Hind III site after ligation of the two PCR products.

We analysed the importance of the potential annealing between the amplicons of the internal standard and the target DNA. A same number of copies of the wild type sequence and the mutated sequence was amplified according the PCR conditions described in Table 1 and the product was digested by Alu I. Only the homoduplexes may be retricted by Alu I. As far as the heteroduplexes are concerned, the modifications of the Alu I site to a Hind III site generates a local misannealing which prevents the restriction by Hind III or Alu I (data not shown). We calculated the percentage of heteroduplexes as explained in the materials and methods. In the linear zone of the PCR (14 to 29 cycles) we observed a percentage of heteroduplexes between 7 to 18% of the total signal obtained and reached 50% at the PCR plateau (Figure 2). These experiments showed that the heteroduplexes might represent a problem for the competitive PCR technique.

In order to avoid the error resulting from the presence of heteroduplexes, we modified the Alu I site into a Hind III site, which still contains the Alu I site. The mutation of the Alu I sites into Hind III restriction sites in the H1 and H2del standards allowed to correct the final result.

Since Hind III restriction site contains the Alu I restriction site, homoduplexes of target DNA and homoduplexes of internal standards can be restricted by Alu I while the heteroduplexes of target DNA and respective internal standards can not. Homoduplexes of internal standards can be restricted by Hind III.

We used these new internal standards to quantify the ratio of deleted/total number of mitochondrial genome in samples of muscle mt DNA from human patients with CPEO. Radioactive competitive PCR's were performed with increasing number of copies of internal standards. The PCR products were restricted with Hind III before electrophoresis (Figure 3) and quantification. In competitive PCR, there must be an equity CPM value for which the sum of the two signals obtained after restriction of the internal standards equals the signal of the non-restricted target DNA. From the quantifications, we found that, in a sample of $1.70\ 10^7$ copies of total mt DNA from a CPEO patient, a very similar number of copies presented the 4,977 bp deletion. In order to evaluate the ratio of homoduplexes and heteroduplexes, we used Alu I to restrict the products of the competitive PCR at the equity value of CPM (Figure 4). The results were expressed as ratios of heteroduplexes/(heteroduplexes + homoduplexes). Respectively, 23.1 and 29.0% of heteroduplexes were found in the PCR products obtained from all the copies deleted + non-deleted of mt DNA present in the

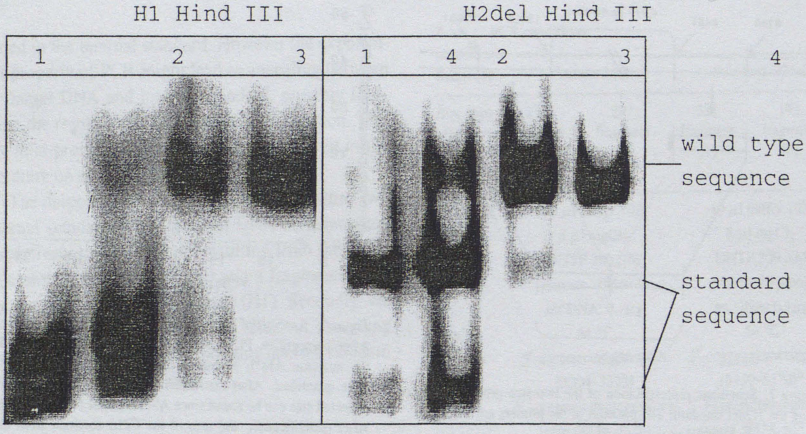



*Figure 3.* Digestion by Hind III of the PCR products obtained from an increasing number of copies of internal standards. The first track of H1 correspond to 1.7 $10^9$ copies of standards, the second to 1.7 $10^8$ copies, the third to 1.7 $10^7$ copies and the fourth to 1.7 $10^6$ copies; Idem for H2del tracks.

sample and obtained from mt DNA resulting from the 4.977 bp deletion (Table 2). These values allowed to reconsider the numbers of target DNA copies of non-deleted and deleted fragments. After correction, we found a real total number of 1.54 $10^7$ copies of non-deleted + deleted target DNA and 1.50 $10^7$ copies (90.5%) bearing the common 4.977 bp deletion. Control experiments have been performed where we introduced the same numbers of copies of internal standard and target DNA (Figure 5) to know whether we would find a ratio of 1 between standard and target DNA after consideration of the percentage of heteroduplexes. The percentage of CPM of the heteroduplexes represented 36% of the total number of the total hetero- plus homoduplexes. When we considered this value, we were able to calculate the real ratio of internal standard/target DNA, which was found to be equal to 1.00 (Table 2) proving thereby the efficiency of this method.

In conclusion, these experiments show that the correction of the number of copies found by competitive PCR by considering the percentage of heteroduplexes allows a more accurate quantification of the numbers of target copies present in a mt DNA sample. This is particularly true for conditions such as ageing tissues where the number of deleted copies is low, allowing a high proportion of heteroduplexes between internal standard and target mt DNA. This method could be used for a more accurate quantification of the percentage of mt DNA copies presenting the common 4,977 bp long deletion. The design of internal standards specific to the fragment resulting from other deletion would help the accurate quantification of mt DNA deletions in ageing. Moreover, when comparing the frequency of different mt DNA deletions, one should consider not only the efficiency of PCR when using different internal standards corresponding to different

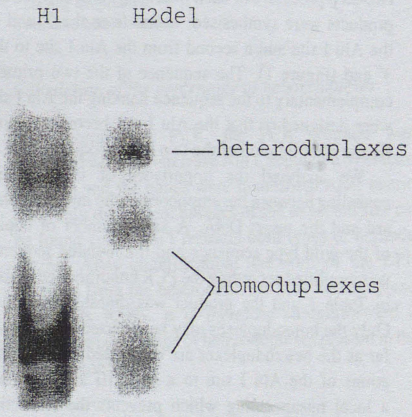



*Figure 4.* Digestion by Alu I of the amplification products obtained from 1.7 $10^7$ copies represented in Figure 2.

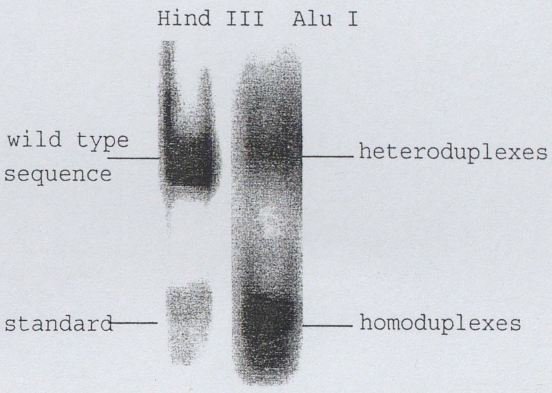



*Figure 5.* Control experiments. The same number of internal standard and target DNA was amplified and restricted by Hind III and Alu I. The signal of wild type sequence after correction for the heteroduplexes was equal to the standard signal.

*Table 2.* Quantification of the signal obtained after PCR and restriction.

| | Copies of internal standard | CPM of homo -duplexes | Total CPM | Hetero -duplexes /total CPM (×100) | Real number of copies |
|---|---|---|---|---|---|
| H1 | $1.7\ 10^7$ | 18,110 | 23,554 | 23.1 | $1.54\ 10^7$ |
| H2 del | $1.7\ 10^7$ | 1,330 | 1,890 | 29.0 | $1.50\ 10^7$ |
| Test | 1/1 | 7,240 | 11,339 | 36.0 | — |

The percentage of heteroduplexes was calculated after competitive PCR using either H1 or H2 del as internal standards starting from $1.7\ 10^7$ copies of mt DNA. In a third type of experiments (test), the same numbers of copies of internal standard and target DNA were introduced. The percentage of heteroduplexes was calculated as explained in 'Materials and methods'.

deletions, but also the fact that the percentage of heteroduplexes may change from an internal standard to another.

## Acknowledgements

C Frippiat and J -F Dierick are Fellows of the FRIA, Belgium. O Toussaint is a Scientific Collaborator of the FNRS, Belgium. mt DNA was a gift from Dr Wei (National Yang-Ming University of Taipei, China).

## References

Cortopassi GA, Shibata D, Soong N-W and Arnheim N (1992) A pattern of a somatic deletions of mitochondrial DNA in aging human tissues. Proc Natl Acad Sci USA 89: 7370

Filser N, Margue C and Richter C (1997) Quantification of wild-type mitochondrial DNA and its 4,8 kb deletion in rat organs. Biochem Biophys Res Com 233: 102–107

Hamblet NS and Castora FJ (1995) Mitochondrial DNA deletion analysis: A comparison of PCR quantitative methods. Biochem Biophys Res Com 207: 839–847

Holt IJ, Harding AE and Morgan-Hughes JA (1988) Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. Nature 331: 717–719

Laitinen J, Samarut J, Hölttä E (1994) Quantification of mitochondrial DNA in heteroplasmic fibroblasts with competitive PCR BioTech 17: 76–82

Lee H-C, Pang C-Y, Hsu H-S and Wei Y-H (1994) Differential accumulation of 4,977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing. Biochem Biophys Acta 1226: 37–43

Lestienne P (1992) Mitochondrial DNA mutations in human diseases: a review. Biochimie 74: 123–30

Lezza AMS, Boffoli D, Scacco C, Cantatore P and Galaleta MN (1994) Correlation between mitochondrial DNA 4977 bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles. Biochem Biophys Res Com 205: 772–779

Liu VWS, Zhang C and Nagley P (1998) Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three human tissues during ageing. Nucleic Acids Res 26: 1268–1275

Pang C-Y, Lee H-C, Yang J-H and Wei Y-H (1994) Human skin mitochondrial DNA deletions associated with light exposure. Arch Biochem Biophys 312: 534–538

Wallace DC (1999) Mitochondrial disease in man and mouse. Science 283: 1482–1488

Yen T-Z, King K-L, Lee H-C, Yeh S-H and Wei Y-H (1994) Age-dependent increase of mitochondrial DNA deletions together with lipid peroxides and superoxide dismutase in human liver mitochondria. Free Radic Biol Med 16: 207–214

Exposure of human dipoid fibroblasts to subcytotoxic oxidative stress induces the appearance of several biomarkers of replicative senescence like senescent-associated ß-galactosidase SA ß-gal), senescent morphology, cell cycle arrest and retinoblastoma protein (Rb) hypophosphorylation. This led to the concept of stress-induced premature senescence (SIPS).

In this work, we have studied the molecular mechanisms responsible for the appearance of several biomarkers of the replicative senescence after stress like SA ß-galactosidase, senescent morphology, cell cycle arrest and overexpression of fibronectin, osteonectin, apolipoprotein J and SM22.

We showed that treatment of IMR-90 HDFs with $H_2O_2$ at subcytotoxic level leads to the activation of the $p38^{Mapk}$ signalling cascade, activation of transcription factor ATF-2, which in turn induces the overexpression and the release of TGF-ß1 protein in the culture medium.

Then TGF-ß1 released in the medium keeps $p38^{Mapk}$ activated.

Concomitantly, the retinoblastoma protein (Rb) becomes hypophosphorylated and physically binds ATF-2. This second step is responsible for the appearance of the biomarkers of senescence.

Neutralization of the TGF-ß1 release, using antibodies added in the medium, or the degradation of Rb due to overexpression of the papillomavirus protein E7 allows to block the appearance of SA-ß-galactosidase activity, senescent-morphology and the overexpression of the four genes cited above but not the cell cycle arrest.

This work provides a strong basis for the explanation on how human diploid fibroblasts undergo stress-induced premature senescence after exposure to subcytotoxic $H_2O_2$ stress.