



THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES

Développement d'un modèle de sénescence prématurée induite par les UVB chez des fibroblastes humains diploïdes de derme: étude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'apparition de ce phénotype

Chainiaux-Debacq, Florence

Award date:
2004

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



Facultés
Universitaires
Notre-Dame
de la Paix

Développement d'un modèle
de sénescence prématurée
induite par les UVB chez des
fibroblastes humains
diploïdes de derme.
Etude des mécanismes
moléculaires impliqués dans
l'apparition de ce phénotype

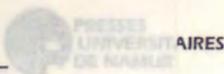
Faculté des Sciences

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Dissertation présentée par
Florence DEBACQ-CHAINIAUX
en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences

2004

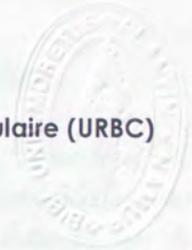
/2004/





FUNDP
Faculté des Sciences
Unité de Recherche en Biologie Cellulaire (URBC)

Rue de Bruxelles, 61
B-5000 Namur
Belgique



**Développement d'un modèle de sénescence
prématurée induite par les UVB chez des
fibroblastes humains diploïdes de derme.
Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans
l'apparition de ce phénotype.**

Florence Debaq-Chainiaux

Promoteur : Dr. O. Toussaint

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

UBS 10161605



© Presses universitaires de Namur & Florence Debacq-Chainiaux
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: 2-87037-454-2
Dépôt légal: D / 2004 / 1881 / 28

Et voici venu le temps des remerciements...

Exercice périlleux de résumer quelques années de thèse en quelques lignes...

Tout d'abord, je souhaite remercier les Professeurs J. Remacle et M. Raes de m'avoir donné goût à la biochimie et à la biologie cellulaire pendant mes études et puis de m'avoir donné la possibilité de réaliser ma thèse au sein du laboratoire.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent ensuite au Dr. O. Toussaint. Merci à toi Olivier de m'avoir accueilli au sein de ton équipe. Merci pour tes conseils judicieux, ta disponibilité et aussi pour ton soutien lors de ces derniers mois... qui furent quelque peu bousculés !

Je tiens à remercier l'équipe des "GRAS" pour tous les bons moments passés ensemble. Merci aux anciens, Patrick, Jean-Jean, Véro, Anne-France, Joao et Christophe pour votre esprit d'équipe et la bonne humeur que vous avez transmis à l'équipe. Un merci tout particulier à toi Thierry pour tes coups de pouce, tes conseils et ta disponibilité. Merci à vous Michel, Steph', Friedel, Jérémie, Aline et Coralie pour votre bonne humeur communicative. Merci à toi Céline (qui restera toujours ma p'te mémorante) pour ton aide lors des dernières manips et pour les petits bonbons partagés entre deux centris... Merci aussi aux petits nouveaux de l'équipe les deux Véronique, Nathalie et Geoffroy. Et bien sur un grand merci également à François et à Marie-Jeanne pour les coups de mains lors des grosses manips...

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire et plus particulièrement Anne pour sa disponibilité, Edouard pour ses précieux conseils, Andrée pour les commandes qui étaient parfois urgentes, Marc pour son aide informatique et tous les autres pour la bonne humeur qu'ils font régner au sein du laboratoire et qui nous permet de travailler dans un environnement très agréable...

Je remercie également les Prof. et Dr. A. Coquette, B. Coulomb, O. De Backer et Y. Poumay pour la lecture attentive et minutieuse de ce document et pour leurs conseils et remarques judicieux.

Je tiens également à remercier le FNRS pour le soutien de ce travail.

Un tout grand merci à mes parents et à mon frère qui m'ont toujours soutenu et encouragé durant mes années d'étude et durant ma thèse.

Et enfin, "last but not least", je tiens à te remercier Christophe pour ton infinie patience durant ces derniers mois et pour ton aide informatique le soir et les week-end malgré la rédaction de ta thèse. Merci aussi à notre petite Charlotte qui lira ces quelques lignes dans quelques années (et cette thèse dans beaucoup plus ...) pour son calme et pour les nuits reposantes...malgré ses quelques mois seulement...

Un tout tout grand merci à vous tous,

Florence

RESUME

La Sénescence Induite Prématurément par des Stress (SIPS) est induite par l'exposition de divers types cellulaires prolifératifs *in vitro* à des doses subcytotoxiques d'agents stressants qui engendrent l'apparition prématurée de biomarqueurs de la sénescence.

Lors de ce travail, nous avons mis au point un nouveau modèle de SIPS induite par une exposition répétée à des doses subcytotoxiques d'UVB chez des Fibroblastes Humains Diploïdes (FHD) de derme. Nous avons observé, suite à ces stress, l'apparition de différents biomarqueurs de la sénescence : l'activité β -galactosidase associée à la sénescence, l'arrêt des divisions cellulaires, l'augmentation du niveau d'ARN-m de gènes associés à la sénescence et la délétion dite « commune » de 4.977 pb de l'ADN mitochondrial.

Ce modèle nous a ensuite permis de réaliser des études fonctionnelles et mécanistiques. Ainsi, nous avons étudié les effets protecteurs de composés d'origine algale sur l'apparition des différents biomarqueurs de la sénescence. Ensuite, nous avons montré l'effet protecteur de la surexpression de l'apolipoprotéine J sur la cytotoxicité induite par des doses élevées d'UVB, d'éthanol ou de *t*-BHP ainsi que sur l'apparition de la SIPS induite par les UVB. L'implication du Transforming Growth Factor- β 1 dans l'apparition de ces biomarqueurs a également été démontrée.

SUMMARY

Stress-Induced Premature Senescence (SIPS) appears after exposures of various cell types to subcytotoxic doses of stressful agents, which induce a premature appearance of the biomarkers of senescence.

In this work, we developed new models of SIPS induced by repeated exposures of human skin fibroblasts to UVB. At 72 h after the last stress, various biomarkers of senescence were observed like senescence-associated β -galactosidase activity, growth arrest, increase in the steady-state level of mRNA of senescence-associated genes, common deletion in mitochondrial DNA.

This model thereafter allowed to carry out functional and mechanistic studies. We studied the protective effects of algal compounds on the UVB-induced appearance of the biomarkers of senescence. Then we showed the protective effect of the overexpression of apolipoprotein J against cytotoxic doses of UVB, ethanol or *t*-BHP and against UVB-induced SIPS. The involvement of Transforming Growth Factor- β 1 in the appearance of these biomarkers has also been shown.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : VIEILLISSEMENT ET STRESS OXYDATIFS.....	3
1.1. Métabolisme et théorie des radicaux libres.....	3
1.2. Les espèces réactionnelles dérivées de l'oxygène (ROS).....	4
1.2.1. Introduction.....	4
1.2.2. Production des ROS.....	5
1.2.3. Dommages causés par les ROS.....	8
1.2.4. Défenses anti-oxydantes.....	9
1.2.5. Systèmes de réparation des dommages.....	9
1.3. Etudes génétiques des organismes modèles.....	12
1.3.1. <i>Caenorhabditis elegans</i>	12
1.3.2. <i>Drosophila megalonaster</i>	14
1.3.3. <i>Mus musculus</i>	15
1.3.4. Restriction calorique.....	16
CHAPITRE II : SENESCENCE REPLICATIVE ET SIPS.....	17
2.1. La sénescence réplivative.....	17
2.2. La sénescence induite prématurément par des stress (SIPS)..	18
2.2.1. Les modèles de SIPS <i>in vitro</i>	19
2.2.2. Notions plus approfondies sur les biomarqueurs de la sénescence.....	22
2.2.3. Transduction du signal et SIPS.....	30
2.2.4. Incidence de la SIPS <i>in vivo</i>	34
CHAPITRE III : VIEILLISSEMENT DE LA PEAU.....	35
3.1. La peau.....	35
3.1.1. Introduction.....	35
3.1.2. Structure de la peau.....	36

3.2. Les ultraviolets.....	42
3.2.1. <i>Introduction</i>	42
3.2.2. <i>Dommmages causés par les UV</i>	43
3.3. Le vieillissement de la peau.....	44
3.3.1. <i>Aspect clinique</i>	46
3.3.2. <i>Aspect histologique</i>	46
3.3.3. <i>Aspect moléculaire</i>	47
BUT DU TRAVAIL ET CONTEXTE	51
RESULTATS	55
ARTICLE I : UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts.....	57
ARTICLE II : Role of TGF- β 1 and clusterin in premature senescence induced in human skin fibroblasts by repeated short subcytotoxic exposures to UVB.....	69
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	113
BIBLIOGRAPHIE	129

LISTE DES ABREVIATIONS

8-OH-dG	8-hydroxy-déoxyguanosine
ADN	acide déoxyribonucléique
ADNc	acide déoxyribonucléique complémentaire
apo J	apolipoprotéine J
ARN-m	acide ribonucléique messenger
ATF-2	activating transcription factor-2
BER	base excision repair
cdk	kinase dépendante de cycline
cdkl	inhibiteur de cdk
CPD	cumulative population doubling
DHFR	dihydrofolate réductase
DRS	direct repeat sequences
EGF	epidermal growth factor
ERK	extracellular signal regulated kinase
FHD	fibroblaste humain diploïde
GG-NER	global genome-nucleotide excision repair
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
IGF	insulin like growth factor
IL	interleukin
kb	kilo bases
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEC	matrice extracellulaire
MF	fibroblaste mitotique
mJ	millijoule
MMP	métalloprotéinase
NER	nucleotide excision repair
pb	paire de bases
PBS	phosphate buffer saline
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PDGF	platelet-derived growth factor
PMF	fibroblaste post-mitotique
PMN	polymorphonucléaire neutrophile
pRb	protéine de rétinoblastome
ROS	espèces réactionnelles dérivées de l'oxygène
RT-PCR	transcription inverse suivie d'une PCR
SA β -gal	β -galactosidase associée à la sénescence
SIPS	sénescence induite prématurément par les stress
SOD	superoxyde dismutase
SV40	simian virus 40
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -butylhydroperoxyde
TC-NER	transcription coupled-nucleotide excision repair

TIMP	inhibiteur de MMP
TGF- β	transforming growth factor- β
TK	thymidine synthase
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TS	thymidilate synthase
UV	ultraviolet
x-gal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranosine

Introduction

CHAPITRE I : VIEILLISSEMENT ET STRESS OXYDATIFS

1.1. Métabolisme et théorie des radicaux libres

L'étude du vieillissement, multidisciplinaire par nature, a donné lieu à l'élaboration de toute une série de théories explicatives. Au niveau cellulaire, on a ainsi répertorié plus de 300 théories différentes (Medvedev Z.A., 1990). Nous allons nous intéresser à deux théories principales, la théorie du « rate of living » et celle des radicaux libres.

La théorie du « rate of living » fut proposée il y a près d'un siècle par des biologistes qui avaient observé que certaines espèces ayant un métabolisme plus élevé avaient une durée de vie plus courte. Toutefois, le lien existant entre le métabolisme et le vieillissement était encore inconnu. En 1956, Denham Harman établit une nouvelle théorie du vieillissement dite « théorie des radicaux libres » stipulant que des radicaux libres dérivés de l'oxygène (Reactive Oxygen Species ou ROS) endogènes étaient générés au sein des cellules et que ceux-ci provoquaient une série de dommages cumulatifs entraînant le vieillissement et la mort de l'organisme (Harman, D., 1956). Toutefois, à cette époque, la présence de ROS endogènes était encore controversée. La théorie des radicaux libres gagna en crédibilité quand fut découverte en 1969 une enzyme avec une activité superoxyde dismutase (SOD) (Mc Cord J. and Fridovich J., 1969) qui fournit la preuve indirecte d'une production d'anions superoxydes *in vivo* et de l'existence d'une défense anti-oxydante. Étant donné que la principale source de production de ROS est la mitochondrie, un lien pouvait être fait entre ces deux théories car au plus le taux métabolique d'une espèce est élevé, au plus la production de ROS l'est également, provoquant une série de dommages irréversibles conduisant au vieillissement de l'espèce.

Toutefois, on ne retrouve pas toujours cette corrélation entre le métabolisme et la durée de vie de l'espèce. Ainsi, les oiseaux et les primates, par exemple, ont un taux métabolique élevé mais ont une espérance de vie plus longue que ce qui aurait pu être prédit. Il semble que les mitochondries de ces espèces produisent moins de ROS que ce qui est attendu (Ku H. *et al.*, 1993). Ceci indiquerait que la production de ROS primerait sur le taux métabolique en ce qui concerne l'espérance de vie. D'autre part, et nous allons le développer dans ce chapitre, des études génétiques récentes chez *C. elegans*, *D. megalonaster* et *M. musculus* montrent qu'une mutation ponctuelle dans un seul gène est capable d'augmenter la durée de vie de cette espèce, sans en atténuer le métabolisme. Ces mutants montrent par contre une résistance accrue aux stress oxydatifs, ce qui renforce de nouveau la théorie des radicaux libres.

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

1.2.1. Introduction

On définit le radical libre comme une espèce moléculaire possédant un ou plusieurs électrons non appariés. La présence d'un électron non apparié est la cause de leur très grande réactivité (Webster N. and Nunn J., 1988). Les « espèces réactionnelles dérivées de l'oxygène » ou ROS sont constituées des radicaux libres dérivés de l'oxygène et des espèces dérivées de l'oxygène non radicalaires (Fig. 1).

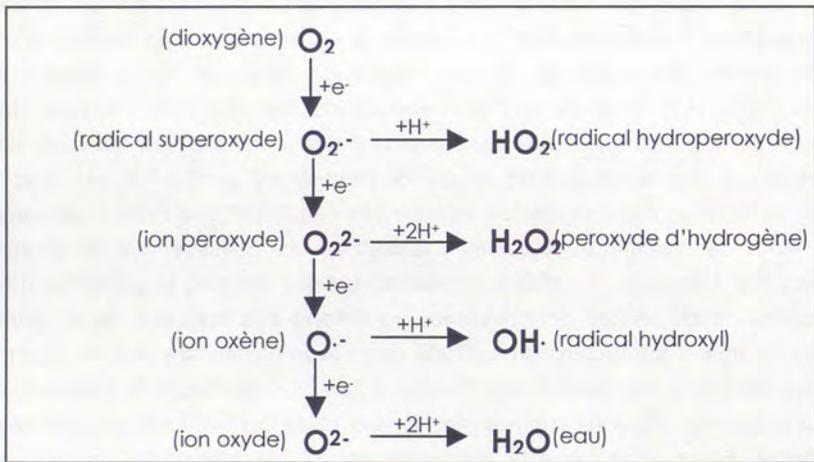


Fig. 1 : Description des dérivés de la réduction monovalente de la molécule d'oxygène en eau (d'après Webster N. and Nunn J., 1998).

Les ROS comprennent donc, entre autres, les radicaux superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et hydroxyl (OH) et également les espèces non radicalaires telles que l'oxygène singulet (O_2^1) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L'anion superoxyde et le radical hydroxyl sont très instables et réagissent directement avec d'autres molécules au site-même où ils ont été formés. Par contre, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a une durée de vie plus longue et est donc plus diffusible. Notons qu'il existe également les RNS ou espèces réactionnelles dérivées de l'azote et regroupant également des espèces radicalaires et non radicalaires (Fig. 2) (pour une revue, Halliwell B., 2001).

Espèces réactionnelles

Espèces réactionnelles dérivées de l'oxygène (ROS)

Radicalaires	Non radicalaires
Superoxyde, $O_2^{\cdot-}$	Peroxyde d'hydrogène, H_2O_2
Hydroxyl, OH^{\cdot}	Acide Hypochloreux, HOCl
Peroxyl, RO_2^{\cdot}	Acide Hypobromeux, HOBr
Alkoxy, RO^{\cdot}	Ozone, O_3
Hydroperoxyl, HO_2^{\cdot}	Oxygène singulet, O_2^1

Espèces réactionnelles dérivées de l'azote (RNS)

Radicalaires	Non radicalaires
Oxyde nitrique, NO^{\cdot}	Acide Nitreux, HNO_2
Dioxyde nitrogène, NO_2^{\cdot}	Cation nitrosyl, NO^+
	Anion nitroxyl, NO^-
	Tetroxyde de dinitrogène, N_2O_4
	Trioxyle de dinitrogène, N_2O_3
	Peroxynitrite, $ONOO^-$
	Acide peroxy nitreux, $ONOOH$
	Cation nitronium (nitryl), NO_2^+
	Alkyl peroxy nitrite, $ROONO$

Fig. 2 : Les espèces réactionnelles dérivées de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) radicalaires ou non (d'après Halliwell B., 2001).

1.2.2. Production des ROS

L'équilibre entre la production de ROS et les défenses anti-oxydantes est essentiel pour maintenir l'homéostasie. Une production équilibrée de ROS joue en effet un rôle important dans le métabolisme. Par exemple, les ROS sont impliqués dans la régulation de la réponse proliférative après une stimulation par des facteurs de croissance (pour une revue, voir Finkel T. and Holbrook J., 2000). Une quantité réduite de ROS peut ainsi engendrer une diminution de cette réponse proliférative.

Par contre, si la quantité de ROS est accrue, cela pourra provoquer, suivant l'importance, la mort cellulaire, le vieillissement ou les maladies liées à l'âge (Fig. 3).

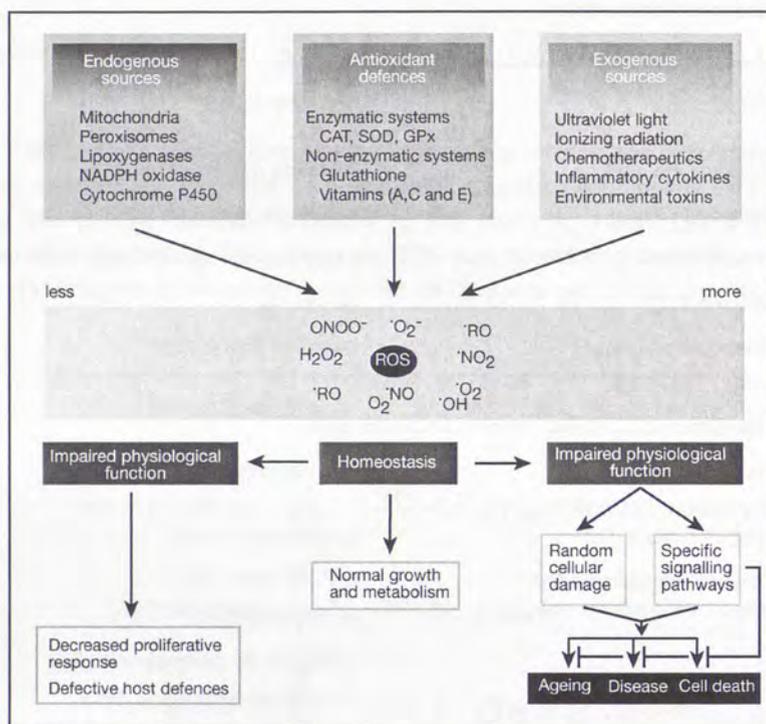


Fig. 3 : Les sources et les réponses cellulaires aux espèces réactionnelles dérivées de l'oxygène (ROS). Les ROS sont produits à partir de sources endogènes et exogènes. Des systèmes de défense enzymatiques et non enzymatiques permettent de maintenir la production de ROS à un certain seuil d'équilibre appelé homéostasie. Un déséquilibre de cette homéostasie induit une altération des fonctions physiologiques (Finkel T. and Holbrook N., 2000).

Les 3 principaux sites de production de ROS sont la respiration mitochondriale, le cytochrome p450 et les cellules phagocytaires (pour une revue, voir Beckman K. and Ames B., 1998).

a. La respiration mitochondriale

La chaîne de transport d'électrons mitochondriale est responsable du transfert d'électrons du NADH, du succinate et de la FADH₂ à l'oxygène, ce qui engendre une production importante d'énergie. Toutefois, cette chaîne de transport est considérée comme étant la source principale de production de ROS intracellulaires. Pour rappel, les électrons issus du NADH, du succinate et de la FADH₂ vont être transférés au niveau du complexe I (NADH déshydrogénase) et du complexe II (succinate déshydrogénase). Le coenzyme Q (Q), également appelé ubiquinone accepte les électrons des complexes I et II et va être réduit (cycle Q)

avant que ne se poursuive le transfert d'électrons par le complexe III (coenzyme Q-cytochrome c reductase), le complexe IV (cytochrome c oxydase) et finalement l'oxygène. Des ROS vont être produits et ce principalement en deux points distincts : au niveau du complexe I et au niveau du complexe III où le radical anion semiquinone va être formé ($Q^{\cdot -}$) et va réagir avec l'oxygène pour générer l'anion superoxyde (Fig. 4).

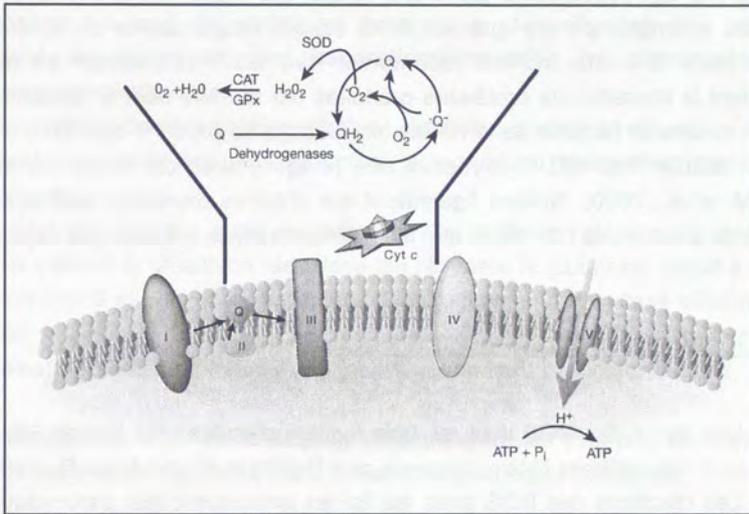


Fig. 4 : Production de ROS au niveau de la chaîne de transport d'électrons au sein de la membrane mitochondriale. La production de ROS se fait principalement au sein du complexe III. Les électrons provenant des complexes I et II sont transférés au coenzyme Q (Q). La forme réduite QH_2 va alors subir deux réductions séquentielles d'un électron lors du cycle Q en utilisant les formes réduites et oxydées du cytochrome c (Cyt c) et du cytochrome b. Le radical $Q^{\cdot -}$, instable, est capable de réagir directement avec l'oxygène et de former des anions superoxydes ($O_2^{\cdot -}$) (Finkel T. and Holbrook N., 2000).

b. Le cytochrome p450

Le cytochrome p450 métabolise les composés xénobiotiques en catalysant leur oxydation ou leur réduction avec l'utilisation du NADPH et d'un substrat organique. Certains isozymes du cytochrome p450 réduisent directement l' O_2 en $O_2^{\cdot -}$ et peuvent générer un stress oxydatif (Goeptar A. *et al.*, 1995). De plus, l'oxydation de substrats par le cytochrome p450 peut engendrer un cycle redox dans lequel le substrat accepte des électrons singulets du cytochrome p450 et les transfère à l'oxygène, ce qui produit de nouveau de l' $O_2^{\cdot -}$ (Halliwell B. and Gutteridge J., 1989). Cette production de ROS par le système du cytochrome p450 serait considérée comme le prix à payer par la cellule pour l'élimination des toxines.

c. NADH oxydase et myéloperoxydase

La NADH oxydase et la myéloperoxydase sont des enzymes qui ont été décrites chez les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) en réponse à une infection. Ces enzymes, lorsqu'elles sont activées, produisent des ROS dont l' O_2^- , l' H_2O_2 , le $NO^•$ et l'hypochlorite (pour une revue, voir Robinson J. and Badwey J., 1994). On a longtemps cru que les ROS étaient responsables du système de défense mais il a été montré récemment que les mécanismes de défense impliquaient la libération de protéases produites par le PMN dont le mécanisme de sécrétion nécessite l'activité de la NADH oxydase qui va produire des ROS (Reeves E. *et al.*, 2002). Des NADH oxydases non phagocytaires ont aussi été décrites (Geiszt M. *et al.*, 2000). Notons également que d'autres oxydases sont également capables de produire de l' O_2^- telles que la xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase.

1.2.3. Dommages causés par les ROS

Les cibles des ROS sont les trois macromolécules : les lipides, les acides nucléiques et les protéines (pour une revue, voir Beckman K. and Ames B., 1998).

Les réactions des ROS avec les lipides provoquent leur peroxydation. En effet, les chaînes carbonées des acides gras polyinsaturés de la membrane lipidique constituent une des principales cibles des ROS. Un seul ROS tel que l' $OH^•$ est capable de réagir avec un acide gras et de générer une cascade amplificatrice de réactions responsables de la peroxydation de plusieurs acides gras. Ceci a pour effet de diminuer la fluidité de la membrane, d'en altérer les propriétés et de modifier l'organisation avec les protéines membranaires.

Les dommages des acides nucléiques sont principalement des oxydations des bases (ex : 8-oxoguanine) et des sucres. Ceci cause des cassures simple et double brins de l'ADN ainsi que des réactions croisées avec d'autres molécules d'où la nécessité d'un système efficace de réparation afin d'éviter des mutations. L'ADN mitochondrial semble beaucoup plus sensible à ces oxydations probablement parce qu'il est situé au site de la production la plus importante de ROS intracellulaires et parce qu'il n'est pas protégé par des histones.

Enfin, les dommages oxydatifs causés aux protéines incluent entre autres la formation de réactions de carbonylation et d'oxydation de groupements sulfhydryls ainsi que la fragmentation lipidique.

1.2.4. Défenses anti-oxydantes

Depuis la découverte de la superoxyde dismutase en 1969, plusieurs enzymes et molécules anti-oxydantes ont été répertoriées (pour une revue, voir Beckman K. and Ames B., 1998). Parmi celles-ci, on retrouve :

- les enzymes anti-oxydantes : les superoxydes dismutases (conversion de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène), la catalase (conversion du peroxyde d'hydrogène en eau), la glutathion peroxydase (détoxification des peroxydes lipidiques), les peroxiredoxines (réparation/élimination des phospholipides de membranes peroxydées).
- les molécules hydrophiles anti-oxydantes : glutathion, ascorbate et urate.
- les molécules lipophiles anti-oxydantes : tocophérols, flavonoïdes, caroténoïdes, ubiquinol, etc..
- les enzymes induites dans la réduction de la forme oxydée de petits anti-oxydants comme la glutathion réductase qui régénère le glutathion réduit à partir du glutathion oxydé et permet ainsi l'activité de la glutathion peroxydase dépendante du sélénium.
- les voies métaboliques maintenant un environnement réducteur (NADH, NADPH, etc.).

Ces différents mécanismes de défense diffèrent entre les espèces, les organismes, les tissus mais également entre les différents compartiments cellulaires.

1.2.5. Systèmes de réparation des dommages

a. Réparation des dommages oxydatifs

Outre la défense directe contre les ROS via les mécanismes anti-oxydants, la cellule possède des systèmes de réparation des dommages causés par les ROS tels que la phospholipase A2 (PLA2) (clivage des lipides oxydés) et la glutathion peroxydase (GPX) (détoxification des acides gras peroxydés), la glycosylase (clivage et remplacement des bases oxydées de l'ADN), la méthionine sulfoxyde réductase (réduction des groupements soufrés d'acides aminés), etc..

b. Réparation des dommages à l'ADN

L'ADN est continuellement endommagé par des sources endogènes (ROS, etc.) et par des sources exogènes (rayons ultraviolets, etc.). On estime ainsi le nombre de dommages à l'ADN à plus de 10.000 par cellule et par jour (Setlow R., 2001). Face à ce niveau de dommages, les cellules ont dû mettre au point des systèmes efficaces de réparation.

Si certaines enzymes sont capables de réparer directement des dommages spécifiques, par exemple l'O⁶-méthylguanine ADN-méthyltransférase (Pegg A. and Byers T., 1992), la plupart des dommages nécessitent un mécanisme impliquant une excision de la lésion et son remplacement. On distingue ainsi deux grands mécanismes d'excision : BER (Base Excision Repair) et NER (Nucleotide Excision Repair). Ceux-ci se distinguent par le type de dommage réparé, la taille du fragment d'ADN excisé et les protéines de réparation impliquées.

b.1. BER (Base Excision Repair)

Le BER est un processus composé de cinq étapes principales. Dans un premier temps, une ADN glycosylase reconnaît et clive une base endommagée de l'ADN, ce qui engendre un site abasique (site AP). Ce site va ensuite être clivé à son extrémité 5' par une AP endonucléase, ce qui provoque une coupure simple brin de l'ADN. Une deoxyribosephosphodiesterase (dRpase) clive le ribose restant et laisse ainsi un trou dans l'ADN bordé par un groupe OH en 5' et un groupe phosphate en 3'. La dernière étape de ce processus consiste en la néosynthèse du nucléotide correct par l'ADN polymérase puis en sa liaison avec les nucléotides adjacents par une ligase.

b.2. NER (Nucleotide Excision Repair)

La plupart des dommages perturbant de façon plus importante la double hélice d'ADN sont réparés par ce mécanisme. Si les étapes principales de la réparation sont les mêmes que pour le BER, elles font intervenir des interactions protéiques plus complexes.

Ici, la lésion de l'ADN est reconnue et le nucléotide, mais plus fréquemment un fragment oligonucléotidique, est excisé. On distingue actuellement deux sous-types de NER : le GG-NER (Global Genome-NER) et le TC-NER (Transcription Coupled-NER) (Fig. 5). On les distingue par le mode de reconnaissance de la lésion (pour une revue, Mitchell J. *et al.*, 2003).

Dans le GG-NER, le dimère protéique XPC/hHR23B parcourt le génome et reconnaît les distorsions de l'ADN. Pour certains types de dommages (tels que les photo-produits induits par le rayonnement UV), il peut être assisté par l'hétérodimère XPE (constitué des protéines DDB1 et p48). Ce complexe va ensuite recruter le facteur de transcription TFIIH, associé aux hélicases XPB et XPD, et l'endonucléase XPG. La protéine RPA se lie alors au simple brin et stabilise le complexe. Enfin, l'hétérodimère XPC/hHR23B est remplacé par la protéine XPA et l'endonucléase dimérique ERCC1/XPF est recrutée. Deux incisions sont alors réalisées de part et d'autre de la lésion, l'oligonucléotide est relargué et l'ADN est resynthétisé par la machinerie de réplication.

En ce qui concerne le TC-NER, la lésion de l'ADN est reconnue lors de la transcription d'un gène par l'ARN-polymérase II qui va alors recruter les protéines

CSA et CSB. Les étapes suivantes sont ensuite identiques à celles du mécanisme GG-NER.

Notons que les liaisons inter-brins (cross-links) sont réparés par un mécanisme faisant intervenir également l'endonucléase dimérique ERCC1/XPF.

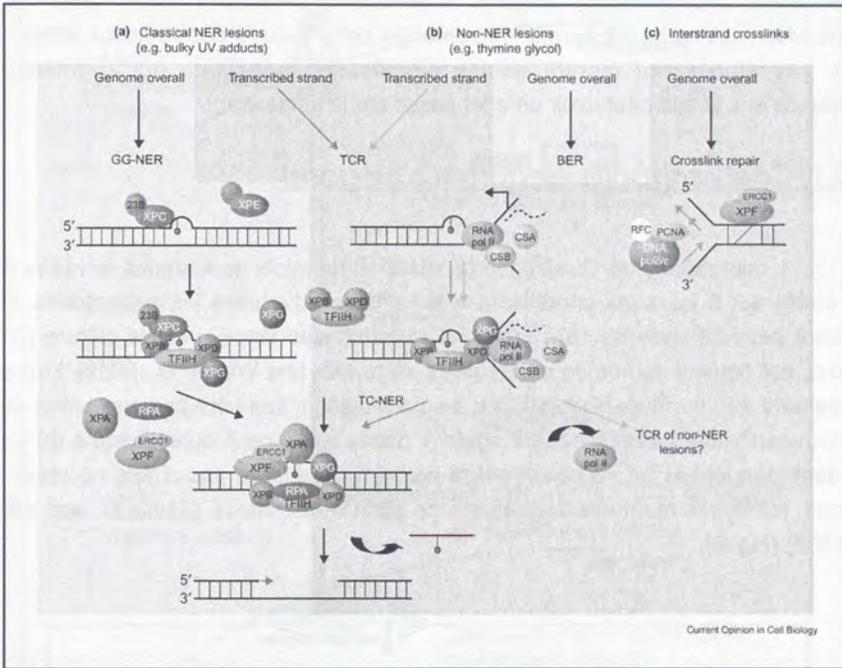


Fig. 5 : Mécanismes de réparation des dommages à l'ADN faisant intervenir le Nucleotide Excision Repair (NER). Les dommages à l'ADN sont en grande partie réparés par le système de réparation NER. Celui-ci est scindé en deux grands sous-types : le GG-NER (Globale Genome-NER) et le TC-NER (Transcription Coupled-NER). En ce qui concerne la voie GG-NER, le dimère protéique XPC/hHR23B parcourt le génome et reconnaît les distorsions de l'ADN. Pour certains types de dommages il peut être assisté par l'hétérodimère XPE (DDB1/p48). Ce complexe recrute le facteur de transcription TFIIH, associé aux hélicases XPB et XPD, et à l'endonucléase XPG. La protéine RPA se lie ensuite au simple brin et stabilise le complexe. L'hétérodimère XPC/hHR23B est alors remplacé par la protéine XPA et l'endonucléase dimérique ERCC1/XPF est alors recrutée. Deux incisions sont alors réalisées de part et d'autre de la lésion, l'oligonucléotide est relargué et l'ADN est resynthétisé par la machinerie de réplication. Par contre, lors du TC-NER, la lésion de l'ADN est reconnue lors de la transcription d'un gène par l'ARN-polymérase II qui recrute les protéines CSA et CSB. Les étapes suivantes sont ensuite identiques à celles du mécanisme GG-NER. Les liaisons inter-brins (cross-links) sont réparés par un mécanisme faisant intervenir également l'endonucléase dimérique ERCC1/XPF (Mitchell J. et al., 2003).

On perçoit donc que la production et l'élimination des ROS et de leurs dommages représentent un système dynamique. L'homéostasie sera présente quand la production de ROS sera équilibrée par des systèmes de défense (anti-oxydants et de réparation) suffisants. Cet équilibre peut être déplacé soit lorsque la production de ROS est plus élevée soit lorsque les systèmes de défense ne sont plus suffisants. On entre alors dans un système pathobiologique pouvant mener à la sénescence ou même à la mort cellulaire (pour une revue, voir Finkel T. and Holbrook J., 2000).

1.3. Etudes génétiques des organismes modèles

Plusieurs études génétiques récentes sur des organismes modèles tels que le nématode *Caenorhabditis elegans*, la drosophile *Drosophila melanogaster* et la souris *Mus musculus* ont permis de renforcer cette théorie des radicaux libres. En effet, ces études ont montré qu'une modification génétique qui augmente la résistance aux stress peut avoir un effet positif sur la longévité.

1.3.1. *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)

L'ontogenèse de *C. elegans* consiste en un cycle de 4 stades larvaires (L1-L4) étalés sur 3 jours qui conduisent à la formation d'adultes hermaphrodites. Ces derniers peuvent vivre de 18 à 20 jours en conditions classiques de culture (20°C avec *E. coli* comme source de nourriture) (Lithgow G. and Walker G., 2002). Lorsqu'il y a pénurie de nourriture ou lorsqu'il y a surpopulation, ces vers peuvent entrer dans un nouveau stade larvaire appelé stade « dauer » qui peut durer jusqu'à 60 jours pendant lesquels ils ne se nourrissent ni ne se reproduisent pas. Dans ce stade de latence, les larves montrent une résistance accrue aux stress (Riddle D. and Albert P., 1997) (Fig. 6).

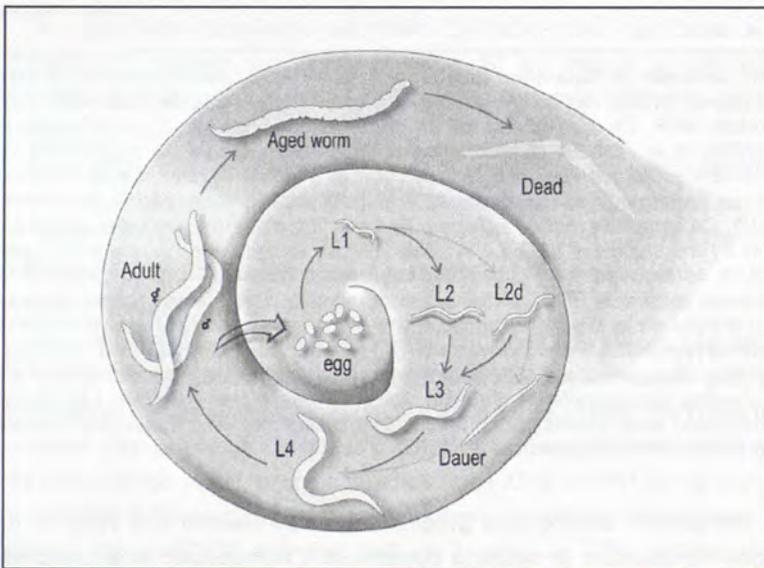


Fig. 6 : Représentation schématique du développement de *c. elegans*. L'œuf éclot en une larve qui va passer par 4 stades larvaires distincts (L1-L4) pour ensuite mener à la forme adulte hermaphrodite. En cas de pénurie de nourriture ou de surpeuplement, *c. elegans* peut entrer dans un stade de latence appelé « dauer » (Braeckman B. et al., 2003).

Une voie contrôlant l'entrée en stade « dauer » est la voie de transduction de l'insuline/IGF (Fig. 7).

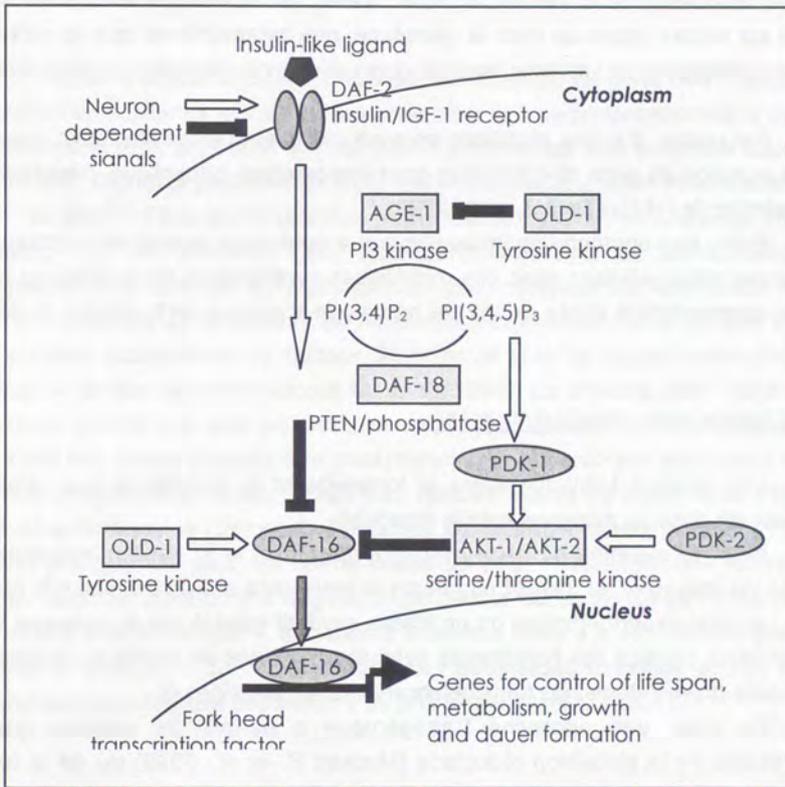


Fig. 7 : Représentation schématique de la voie de transduction de l'insuline/IGF chez *Caenorhabditis elegans*. La voie de transduction du signal insuline/IGF contrôle le développement en larve dauer. Lorsque le récepteur DAF-2 est activé suite à la liaison à un substrat, celui-ci active à son tour AGE-1 et la production de phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate (PI(3,4,5)P₃). Ceci entraîne l'activation de PDK-1 et de AKT-1/AKT-2, inhibant l'entrée nucléaire du facteur de transcription DAF-16 responsable de la transcription de gènes contrôlant la longévité, le métabolisme, la croissance et le développement en larve dauer. (d'après Lithgow G. and Walker G., 2002).

Des mutations d'un seul acteur protéique intervenant dans cette voie, par exemple *daf-2*, peuvent causer l'entrée des vers en stade larvaire « dauer » même en présence de nourriture. Toutefois, d'autres mutations, moins sévères peuvent induire une résistance à divers stress corrélée avec une augmentation de la longévité sans induire la différenciation en larve «dauer». Ainsi, des mutations des gènes *age-1* et *daf-2* suppriment l'inhibition du facteur de transcription *daf-16*, ce qui a pour conséquence d'augmenter la résistance à divers stress ainsi que d'augmenter la longévité des vers jusqu'à 65 % (Johnson T. *et al.*, 1993).

Un autre gène dont la mutation confère une longévité accrue ainsi qu'une augmentation de la résistance aux stress est le gène *clk-1*. *Clk-1* code pour une protéine homologue d'une protéine mitochondriale de la levure impliquée dans la synthèse du coenzyme Q (Wong A. *et al.*, 1995). Si la fonction exacte de cette protéine est encore inconnue chez le nématode, une hypothèse est que sa mutation induit une diminution du métabolisme et donc une diminution de la production de ROS.

Par contre, d'autres mutations peuvent diminuer la longévité de *C. elegans*. Ainsi, la mutation du gène *ctl-1* qui code pour une catalase cytosolique, nécessaire à la dégradation de l' H_2O_2 (Taub J. *et al.*, 1999).

Enfin, une approche pharmacologique a également permis de montrer que le traitement de *C. elegans* avec des mimétiques synthétiques de la SOD ou de la catalase augmentait la durée de vie du nématode d'environ 44% (Melov S. *et al.*, 2000).

1.3.2. *Drosophila megalonaster*

Une relation identique entre la longévité et la résistance aux stress a également été mise en évidence chez la drosophile.

Ainsi, la mutation du gène *methuselah* (Lin Y. *et al.*, 1998) augmente la durée de vie moyenne de 35% et augmente la résistance à divers stress tels que la famine, un choc hyperthermique ou un stress oxydatif généré par le paraquat (Fig. 8). La protéine partage des homologies avec des protéines de liaison au guanosine triphosphate (avec 7 domaines transmembranaires) ou protéines G.

De plus, une approche transgénique a permis de montrer que la surexpression de la glutathion réductase (Mockett R. *et al.*, 1999) ou de la forme cytoplasmique de la SOD (SOD1) et de la catalase (Orr W. and Sohal R., 1994) provoquaient une résistance accrue au stress et une augmentation de la durée de vie.

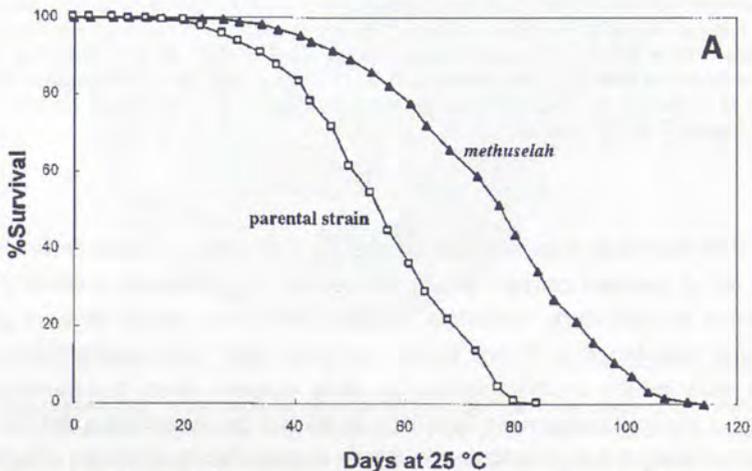


Fig. 8 : Effet de la mutation du gène *methuselah* sur l'espérance de vie de *D. megalonaster*. Les drosophiles mutées au gène *methuselah* montrent une augmentation de l'ordre de 35% de leur espérance de vie (Lin Y.-J. *et al.*, 1998).

1.3.3. *Mus musculus*

Chez la souris, il a été montré qu'une mutation du gène $p66^{shc}$ augmentait également la résistance aux stress oxydatifs ainsi qu'une prolongation de la durée de vie (Migliaccio E. *et al.*, 1999) (Fig. 9). $p66^{shc}$ est une des trois protéines codées par le gène *shc*. Ces trois protéines diffèrent entre elles par leur poids moléculaire $p52^{shc}$, $p46^{shc}$ et $p66^{shc}$. Elles possèdent des domaines communs : un domaine SH2 (src-homology 2), un domaine CH1 (collagen homology) et un domaine PTB (phosphotyrosine binding). Lorsqu'elles sont phosphorylées sur leur résidu tyrosine suite à l'activation de récepteurs de facteurs de croissance, elles se lient à Grb-2, une protéine adaptatrice du facteur SOS de la voie de signalisation menant à l'activation de Ras (Rozakis-Adcock M. *et al.*, 1992). La protéine $p66^{shc}$ se distingue des deux autres car elle possède en outre un domaine CH2 amino-terminal contenant une sérine pouvant être phosphorylée en réponse aux stress aux UVC ou à l' H_2O_2 (Migliaccio E. *et al.*, 1999). Les cellules issues de souris dont $p66^{shc}$ est muté dans le domaine CH2 sont résistantes à l'apoptose induite par des stress aux UVC et à l' H_2O_2 . De plus, les souris knock-out $p66^{shc-/-}$ montrent une résistance *in vivo* au paraquat ainsi qu'une augmentation de leur durée de vie de l'ordre de 30%. La fonction exacte de $p66^{shc}$ est encore inconnue mais il a été montré que $p66^{shc}$ induisait la production de ROS et donc des dommages oxydatifs accrus à l'ADN engendrant une apoptose dépendante de p53 (Trinei M. *et al.*, 2002).

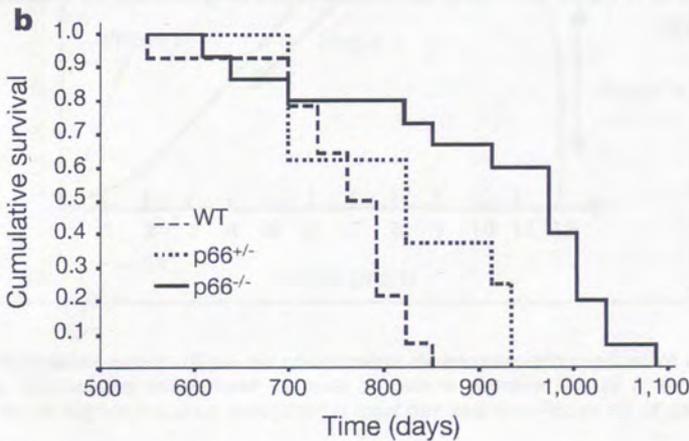


Fig. 9 : Augmentation de l'espérance de vie chez les souris $p66^{shc-/-}$. Les souris $p66^{shc-/-}$ ont une espérance de vie accrue de l'ordre de 30% (Migliaccio E. *et al.*, 1999).

1.3.4. Restriction calorique

Etant donné la difficulté des manipulations génétiques dans les organismes supérieurs, une autre approche a été utilisée pour réduire le métabolisme chez le rat mais surtout chez le singe. Il s'agit du principe de la restriction calorique.

La restriction calorique consiste en une diminution du nombre de calories de l'ordre de 30 à 40 % par rapport aux animaux nourris à volonté (*ad libitum*). La restriction calorique augmente la durée de vie chez les poissons, les rongeurs, les vers, les levures et probablement les primates. Le mécanisme entrant en jeu reste encore à découvrir mais une hypothèse suggère que la restriction calorique prolonge la durée de vie en diminuant le métabolisme et donc la production de ROS (pour une revue, voir Sohal R. and Weindruch R., 1996). Il a d'ailleurs été démontré que le taux de production de ROS de mitochondries provenant de souris en restriction calorique était significativement moins élevée que chez des souris nourries *ad libitum* et que la restriction calorique diminuait l'accumulation de dommages oxydatifs aux protéines, lipides et acides nucléiques (pour une revue, voir Masoro E., 2000). Chez le singe macaque, étant donné que l'espérance de vie est proche de 40 ans, différents biomarqueurs du vieillissement ont été recherchés et montrent par exemple que les singes nourris de façon restreinte ont une température corporelle plus basse, un taux d'insuline plasmatique plus faible et un taux de DHEAS (déhydroépiandrosteronesulfate) sérique également plus faible. Ces biomarqueurs ont également été mis en évidence chez des hommes dépassant l'espérance de vie moyenne dans le cadre de l'étude du vieillissement longitudinale de Baltimore (Roth G. *et al.*, 2002).

CHAPITRE II : SENESCENCE REPLICATIVE ET SIPS

2.1. La sénescence rélicative

En 1961, Hayflick et Moorhead démontrèrent que des fibroblastes de poumon d'embryon humain mis en culture se divisaient un nombre limité de fois. Ils observèrent que l'évolution de la croissance de la culture pouvait être divisée en trois phases principales : la phase I correspondant à la mise en culture des cellules à partir du tissu d'origine, la phase II correspondant à une croissance rapide et exponentielle des cellules et la phase III se caractérisant par un ralentissement marqué des divisions cellulaires menant ensuite à un arrêt irréversible des mitoses et à la mort cellulaire (Fig. 10) (Hayflick L. et Moorhead P., 1961). Ce phénomène a été appelé par la suite Sénescence Rélicative (S.R.).

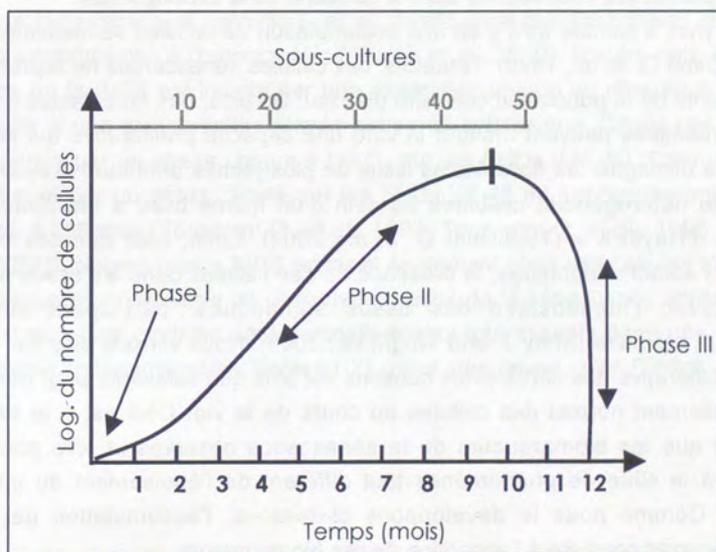


Fig. 10 : Illustration schématique du phénomène de sénescence rélicative des cellules en culture. Succession des phases de mise en culture primaire (Phase I), de prolifération (Phase II) et de dégénérescence précédant la mort des cellules (Phase III) (d'après Hayflick, 1977).

Outre cet arrêt irréversible de la prolifération, d'autres caractéristiques de ces cellules sénescentes (appelées biomarqueurs de la sénescence) ont été mises en évidence. Parmi celles-ci, on retrouve des changements morphologiques (Bayreuther K. *et al.*, 1988), une activité β -galactosidase associée à la sénescence

(SA β -gal) (Dimri G. *et al.*, 1995), des délétions dans l'ADN mitochondrial (Dumont P. *et al.*, 2000), une diminution de l'induction des heat shock proteins (Blake M. *et al.*, 1991 ; Bonelli M. *et al.*, 1999) et une augmentation de l'activité des métalloprotéinases (Campisi J., 1999). Des études ont également été menées afin de déterminer un profil assez complet des changements au niveau de l'expression génétique (Shelton D. *et al.*, 1999) et au niveau protéique (Toda T. *et al.*, 1998) apparaissant lors de la sénescence répllicative.

Il a été montré que la sénescence répllicative existait aussi dans d'autres types cellulaires tels que les kératinocytes (Rheinwald J. and Green H., 1975), les cellules endothéliales (Mueller S. *et al.*, 1980), les cellules adrénocorticales (Hornsby P. and Gill G., 1978), les lymphocytes (Tice R. *et al.*, 1979), les chondrocytes (Evans C. and Georgescu H., 1983), etc. Par contre, les cellules germinales et la majorité des cellules tumorales, semblant avoir une durée de vie proliférative illimitée, ne connaissent pas ce processus de sénescence répllicative (Brunmark A. *et al.*, 1986, Chen J. and Yu B., 1994 ; Shablott M.J. *et al.*, 2001). Les études de la sénescence répllicative réalisées principalement *in vitro* ont permis d'avancer dans la compréhension de différents processus cellulaires *in vivo*. Ainsi, l'étude des gènes qui sont responsables de l'entrée ou non des cellules en sénescence répllicative ont apporté de précieuses informations dans le domaine de la tumorigénèse.

In vivo, il semble qu'il y ait une accumulation de cellules sénescents dans les tissus (Dimri G. *et al.*, 1995). Toutefois, ces cellules sénescents ne représentent qu'une minorité de la population cellulaire du tissu. De plus, des fibroblastes issus de certains centenaires peuvent montrer *in vitro* une capacité proliférative qui les rend impossible à distinguer de fibroblastes issus de plus jeunes donneurs (Tesco *et al.*, 1998). Cette hétérogénéité cellulaire au sein d'un même tissu a été nommée la « mosaïque d'Hayflick » (Toussaint O. *et al.*, 2002). Enfin, bien que ces cellules sénescents soient minoritaires, la présence de ces cellules dans les tissus pourrait interférer avec l'homéostasie des tissus somatiques, participant ainsi au vieillissement tissulaire (Shay J. and Wright W., 2000). Nous verrons plus loin que la capacité proliférative des fibroblastes humains est plus que suffisante pour permettre un renouvellement normal des cellules au cours de la vie. Ceci est à la base de l'hypothèse que les biomarqueurs de la sénescence observés *in vivo* pourraient apparaître à la suite de phénomènes tout différent de l'épuisement du potentiel prolifératif. Comme nous le développons ci-dessous, l'accumulation de stress cellulaires pourrait conduire à l'apparition de ces biomarqueurs.

2.2. La Sénescence Induite Prématurément par des stress (SIPS)

On peut observer l'apparition précoce de biomarqueurs de la sénescence lorsque des types cellulaires prolifératifs sont exposés à des stress d'intensité subcytotoxiques *in vitro*. On a appelé ce phénomène la Sénescence Induite Prématurément par des Stress ou SIPS (Brack *et al.*, 2000, Toussaint O. *et al.*,

2000a). Celle-ci peut être définie comme la résultante des effets à long terme de stress subcytotoxiques amenant à une sénescence prématurée des cellules. Ainsi, différents types cellulaires prolifératifs transformés ou non (fibroblastes de peau, de poumon ou cardiaques, mélanocytes, cellules endothéliales, etc.) soumis à des stress (hyperoxie, peroxydes organiques, *tert*-butylhydroperoxyde, H₂O₂, hydroxyurée, éthanol, radiations γ , rayons ultraviolets...) à doses ou à concentration subcytotoxiques entrent en SIPS.

2.2.1. Les modèles de SIPS in vitro

Différents modèles de SIPS ont été mis au point. Ils peuvent être distingués notamment par la nature de l'agent stressant, le type cellulaire utilisé ou le type de protocole expérimental suivi (Toussaint O. *et al.*, 2000b). On peut distinguer deux grandes classes de modèles de SIPS (tableau 1). Il existe d'une part les modèles faisant intervenir une exposition chronique ou continue à l'agent stressant. Parmi ceux-ci, citons l'exposition chronique de fibroblastes humains diploïdes (FHDs) WI-38 à une hyperoxie (von Zglinicki T. *et al.*, 1995) ainsi que l'exposition chronique de cellules endothéliales à l'homocystéine (Xu D. *et al.*, 2000). D'autre part, il existe des modèles où la SIPS est induite par une exposition unique ou répétée à des agents stressants à une concentration élevée mais non cytotoxique. Citons par exemple la SIPS induite par un stress unique à l'H₂O₂ sur les FHDs IMR-90 (Chen Q. et Ames B., 1994) et par un stress répété sur les FHDs WI-38 au *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP) ou à l'éthanol (Toussaint O. *et al.*, 1992, Toussaint O. *et al.*, 1995, Dumont P. *et al.*, 2000). Notons que la SIPS apparaît également chez des cellules transformées chez lesquelles on observe un phénotype proche de la sénescence après exposition à des stress. Ces modèles sont particulièrement intéressants dans une perspective de thérapie anti-cancéreuse (tableau 2) (pour une revue, voir Dierick J.-F. *et al.*, 2003).

Conditions	Type cellulaire	Espèce	Morphologie sénescence	SA β -gal	Arrêt prolifératif	stop G1	Reference
ferf -butylhydroperoxyde	Fibroblastes foetaux WI-38	Homme	+	+	+		(Dumont P. et al. .. 2000; Dumont P. et al. .. 2001)
H ₂ O ₂	Fibroblastes foetaux IMR-90	Homme	+	+	+		(Dumont P. et al. .. 2000)
H ₂ O ₂	Fibroblastes foetaux IMR-90	Homme	+	+	+	+	(Chen Q. et al. .. 1998)
H ₂ O ₂	Fibroblastes foetaux IMR-90	Homme	+	+	+		(Frippiat C. et al. .. 2001)
H ₂ O ₂	Fibroblastes foetaux IMR-90	Homme	+	+	+	+	(Wolf F. et al. .. 2002)
H ₂ O ₂	Fibroblastes cardiaques	Rat	+	+	+		(Siwik D. et al. .. 2001)
H ₂ O ₂ ou UVB	Fibroblastes BJ et BJ-hTERT	Homme	+	+	+		(de Magalhaes J. et al. .. 2002)
H ₂ O ₂ UVB ou irradiation γ	Fibroblastes foetaux WI-38 et WI-38 hTERT	Homme	+	+	+		(Gorbunova V. et al. .. 2002)
H ₂ O ₂ UVB ou irradiation γ	Fibroblastes foetaux IMR-90 et IMR-90 hTERT	Homme	+	+	+		(Gorbunova V. et al. .. 2002)
H ₂ O ₂ UVB ou irradiation γ	Fibroblastes HCA2 et HCA2 hTERT	Homme	+	+	+		(Gorbunova V. et al. .. 2002)
H ₂ O ₂ UVB ou irradiation γ	Fibroblastes LF1 et LF1 hTERT	Homme	+	+	+		(Gorbunova V. et al. .. 2002)
H ₂ O ₂ UVB ou irradiation γ	Fibroblastes LF1p21-/- et LF1p21-/- hTERT	Homme	+	+	+		(Gorbunova V. et al. .. 2002)
UV	Fibroblastes HH-8	Homme	+	+	+		(Rodemann H. et al. 1989)
UVB	Mélanocytes	Homme	+	+	+	+	(Medrano E. et al. .. 1995)
UVB	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Chainiaux F. et al. .. 2002)
Radiation ionisante	Cellules endothéliales	Bovin	+	+	+		(Oh C. et al. .. 2001)
Irradiation γ	Fibroblastes	Homme	+	+	+	+	(Di Leonardo A. et al. .. 1994)
Champs électromagnétiques importants	Fibroblastes WI-38 et HH-8	Homme	+	+	+		(Rodemann H. et al. .. 1989)
Ethanol	Fibroblastes foetaux WI-38	Homme	+	+	+		(Dumont P. et al. .. 2002; Toussaint O. et al. .. 1995)
Xanthine + xanthine oxydase	Fibroblastes cardiaques	Rat	+	+	+		(Siwik D. et al. .. 2001)
Mitomycin C	Fibroblastes HH-8	Homme	+	+	+		(Rodemann H. et al. .. 1989)
Bleomycin, actinomycin D	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Robles S. et al. .. 1998)
5-Bromodeoxyuridine	Fibroblastes TIG-7	Homme	+	+	+		(Michishita E. et al. .. 1999)
5-Bromodeoxyuridine	Fibroblastes TIG-7	Homme	+	+	+		(Suzuki T. et al. .. 2001)
Hydroxyurée	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Yeo E. et al. .. 2000)
Taxol	Fibroblastes WI-38 et REF-52	Homme	+	+	+	+	(Trielli M. et al. .. 1996)
Photoactivation + psoralen	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Ma W. et al. .. 2002)
Hyperoxie	Fibroblastes foetaux WI-38	Homme	+	+	+	+	(von Zglinicki T. et al. .. 1995)
Hyperoxie	Fibroblastes BJ et MRC-5	Homme	+	+	+		(Saretzki G. et al. .. 1998)
Hyperoxie	Fibroblastes WI-38 et TIG-1	Homme	+	+	+		(Honda S. et al. .. 1983)
Homocystéine	Cellules endothéliales	Homme	+	+	+		(Xu D. et al. .. 2000)
Il-1 α ou TNF α	Fibroblastes foetaux WI-38	Homme	+	+	+		(Dumont P. et al. .. 2000)
TGF- β 1	Fibroblastes foetaux IMR-90	Homme	+	+	+		(Frippiat C. et al. .. 2001)
NaCl (hypertonique)	Fibroblastes foetaux WI-38	Homme	+	+	+		(Reichert J. et al. .. 2001)
Collagène glycosylé	Cellules endothéliales	Homme	+	+	+	-	(Chen J. et al. .. 2002)
Inhibiteur Cu, Zn SOD (DDC)	Fibroblastes cardiaques	Rat	+	+	+		(Siwik D. et al. .. 2001)
Inhibiteur G6PDH (DHEA)	Fibroblastes cardiaques	Rat	+	+	+		(Siwik D. et al. .. 2001)
Inhibiteur PI-3 kinase	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Tresini M. et al. .. 1998)
Inhibiteur PI-3 kinase	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Collado M. et al. .. 2000)
Inhibiteurs histone deacetylase	Fibroblastes foetaux WI-38	Homme	+	+	+	+	(Ogryzko V. et al. .. 1996)
Inhibiteurs DNA topoisomérase	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Michishita E. et al. .. 1998)
Pyruvate extracellulaire	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Xu D. et al. .. 2002)
Nombre mitochondries	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Xu D. et al. .. 2002)
Surexpression caveoline-1	Fibroblastes	Souris	+	+	+	+	(Volonte D. et al. .. 2002)
Expression mutant beta-catenine	Fibroblastes	Souris	+	+	+		(Damalas A. et al. .. 2001)
Expression oncogène ras	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Serrano M. et al. .. 1997)
Surexpression Bf1	Fibroblastes	Homme	+	+	+		(Dimri G. et al. .. 2000)

Tableau 1 : Modèles de SIPS dans des types cellulaires non transformés (d'après Dierick J.-F. et al., 2003)

Conditions	Type cellulaire	Espèce	Morphologie sénescence	SA β -gal	Arrêt prolifératif	slop G1	Reference
Champs électromagnétiques importants TGF β	VA13 (Fibroblastes foetaux WI-38 SV-40)	Homme	+		+		(Rodemann H.et al .. 1989)
Chelation du fer (deferroxamine mesylate)	A549 (adénocarcinome de poumon)	Homme	+	+	+		(Katakura Y.et al .. 1999)
Chelation du fer (deferroxamine mesylate)	Chang (hépatocytes)	Homme	+	+	+	+	(Yoon G. et al .. 2002)
5-Bromodeoxyuridine	Hep38 et Huh 7 (hépatocytes p53-/-)	Homme	+	+	+	+	(Yoon G. et al .. 2002)
5-Bromodeoxyuridine	HT1080 (fibrosarcome), SUSM-1 (foie), HeLa (tumeur cervicale)	Homme	+	+		+	(Michishita E.et al .. 1999)
5-Bromodeoxyuridine	KMST-6 (embryon), VA13, TE85 (ostéoblastes), MeT5A (mésothéliales)	Homme	+	+			(Michishita E.et al .. 1999)
5-Bromodeoxyuridine	HCT116 et HCT116/80514 (p21-/-) (colon)	Homme	+	+			(Michishita E.et al .. 1999)
5-Bromodeoxyuridine	NIH3T3 et L929	Souris	+	+			(Michishita E.et al .. 1999)
5-Bromodeoxyuridine	3Y1	Rat	+	+			(Michishita E.et al .. 1999)
5-Bromodeoxyuridine	CHO (ovaire) et V79 (poumon)	Hamster	+	+			(Michishita E.et al .. 1999)
5-Bromodeoxyuridine	HeLa (tumeur cervicale)	Homme	+		+		(Suzuki T. et al .. 2001)
Aphidicoline, cisplatine ou irradiation	HT1080 (fibrosarcome)	Homme	+	+			(Chang B.D. et al .. 1999)
Doxorubicine	HT1080 (fibrosarcome)	Homme	+	+	+	+	(Chang B.D. et al .. 1999)
Doxorubicine	HCT116 (colon), HepG2 (foie), A27880 (ovaire)	Homme	+	+	+	+	(Chang B.D. et al .. 1999)
Doxorubicine	LNCaP (prostate), HeLa (tumeur cervicale), Saos2g (ostéoblaste)	Homme	+	+	+	+	(Chang B.D. et al .. 1999)
Doxorubicine	U251 (glande), SW480 (colon), MCF-7 (sein)	Homme	+	+	-	-	(Chang B.D. et al .. 1999)
Doxorubicine	Hep-2 (larynx)	Homme	+	+	-	-	(Chang B.D. et al .. 1999)
Doxorubicine	DID1 (colon) et PC3 (prostate)	Homme	-	-	+	+	(Chang B.D. et al .. 1999)
Doxorubicine	MCF-7 (sein)	Homme	+	+	+	+	(Fornari F.A. et al .. 1994)
Hydroxyurée	K562 (leucémie érythrocytaire)	Homme	+	+	+	+	(Fornari F.A. et al .. 1994)
Alpha-difluorométhylornithine + MDL-73811	MALME-3M (poumon)	Homme	+	+	+	+	(Kramer D.L. et al .. 2001)
WMC26	HCT116 (colon)	Homme	+	-	+	+	(Cholody W.M. et al .. 2001)
Sodium butyrate	Cellules endométriales et ovariennes	Homme	+			+	(Terao Y. et al .. 2001)
Surexpression Hic-5	KMST-6 (embryon), et SUSM-1 (foie)	Homme	+		+		(Shibanuma M. et al .. 1997)
Surexpression IGFBP+P1	MCF-7 (sein)	Homme	+	+	+	+	(Wilson H.M. et al .. 2002)
Surexpression p16 (1 jour)	Carcinome ostéogène	Homme	+			reversible	(Dai C. Y. and Enders G.H., 2000)
Surexpression p16 (6 jours)	Carcinome ostéogène	Homme	+			+	(Dai C. Y. and Enders G.H., 2000)
Surexpression p21	H1299 (poumon)	Homme	+	+	+		(Wang Y. et al .. 1999)
Surexpression p53	H358	Homme	+	+		+	(Ling Y.H. et al .. 2000)

Tableau 2 : Modèles de SIPS dans des types cellulaires transformés (d'après Dierick J.-F. et al., 2003)

2.2.2. Notions plus approfondies sur les biomarqueurs de la sénescence

a. Morphologie cellulaire

Les fibroblastes passent par différents stades morphologiques, appelés morphotypes (Bayreuther K. *et al.*, 1988), au cours de leur vie répliquative *in vitro* et *in vivo*. Sept morphotypes ont été décrits dont trois sont observés chez les fibroblastes mitotiques (MF I, MF II et MF III), trois sont observés chez les fibroblastes post-mitotiques (PMF IV, PMF V et PMF VI). Le dernier morphotype (PMF VII) correspond au stade dégénérescent du morphotype précédent (PMF VI) (Fig. 11).

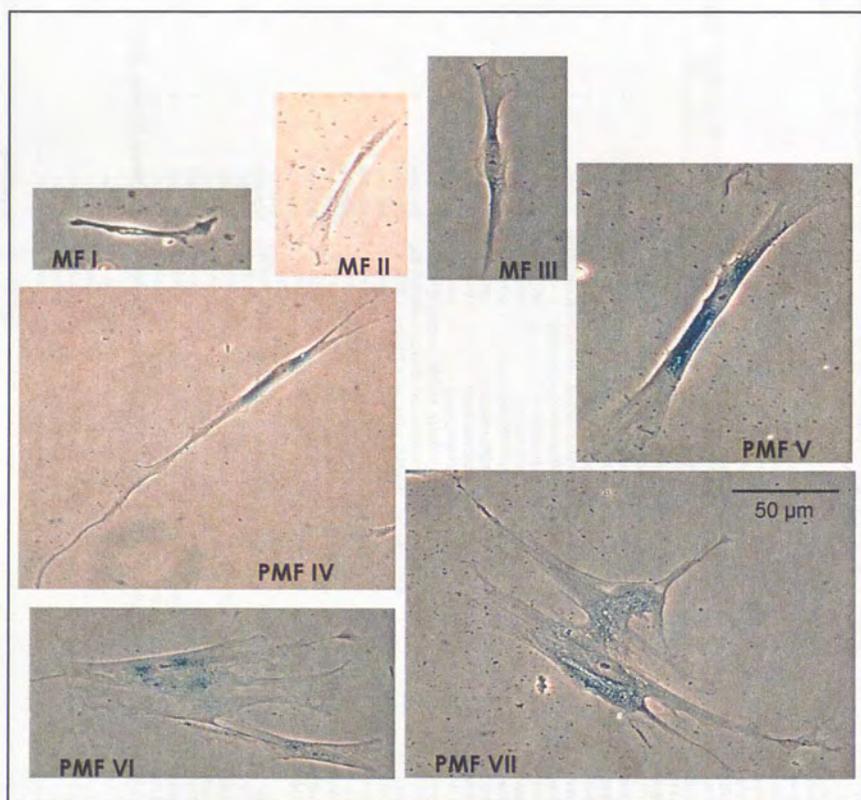


Fig. 11: Morphotypes et SA β -gal des FHDs de derme AG04431. On peut classer les fibroblastes en morphotypes mitotiques (MF I-MF III) et post-mitotiques (PMF IV-PMF VII). On observe une coloration bleue chez les FHDs post-mitotiques, résultant de la coloration histochimique permettant de mettre en évidence l'activité de la SA β -gal.

Une analyse de l'expression protéique de fibroblastes présentant un même morphotype a montré que chacun des morphotypes se caractérisait par un profil protéique distinct (Bayreuther K. *et al.*, 1992). Une population de fibroblastes à faible passage en culture est principalement composée de MF I et MF II. Les MF III s'accumulent avec les passages en culture. Lorsque la population devient post-mitotique, la proportion en PMF augmente. La proportion de chacun des morphotypes évolue donc au cours du vieillissement *in vitro* de fibroblastes humains et constitue un excellent outil pour étudier la sénescence cellulaire et la SIPS *in vitro*. Ainsi on observe un enrichissement en morphotypes PMF après que des fibroblastes (FHDs) aient été soumis à des stress tels que les UVC, la mitomycine C ou un champ magnétique important (Rodemann H. *et al.*, 1989), ou suite à des stress avec du *t*-BHP ou de l'éthanol (Toussaint O. *et al.*, 1992).

b. L'activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA β -gal)

L'équipe de J. Campisi (Dimri G. *et al.*, 1995) a mis en évidence que les cellules en sénescence répliquative possédaient une activité enzymatique β -galactosidase détectable à pH 6 qui leur est propre. Pour cette raison, on l'a nommée «Senescence-Associated β -galactosidase» (SA β -gal). Cette activité enzymatique correspond à l'activité lysosomale de la β -galactosidase classique optimale à pH 4, détectable à un pH suboptimal de 6 chez les cellules sénescents (Fig. 11). Ceci est dû à une augmentation de la quantité de cette enzyme lysosomale chez les cellules sénescents, ces dernières connaissant une augmentation du nombre et de la taille de leurs lysosomes (Kurz D. *et al.*, 2000, Brunk U. *et al.*, 1973, Robbins E. *et al.*, 1970).

Il a été montré récemment que cette enzyme était plus précisément localisée dans des vacuoles autophagiques chez les fibroblastes sénescents, appelées autolysosomes, dont le nombre augmente lors de la sénescence répliquative et qui seraient impliquées dans la mort des fibroblastes sénescents (Gerland L.-M. *et al.*, 2003). La proportion de FHDs positifs pour l'activité SA β -gal augmente avec les passages en culture.

Ce biomarqueur est présent dans d'autres types cellulaires sénescents *in vitro* comme les kératinocytes humains (Dimri G. *et al.*, 1995), les cellules endothéliales humaines (Kurz D. *et al.*, 2000), les mélanocytes (Medrano E. *et al.*, 1995), les hépatocytes (Sigal S. *et al.*, 1999). De plus, des cellules présentant cette activité ont été mises en évidence *in vivo* dans des biopsies de peau humaine (Dimri G. *et al.*, 1995), dans les hépatocytes humains (Sigal S. *et al.*, 1999) et dans les cellules épithéliales rétinienne de primate (Mishima K. *et al.*, 1999). Des proportions accrues de cellules positives pour cette activité ont été observées suite à différents modèles de SIPS induits par différents agents stressants tels que lors de la SIPS induite par le *t*-BHP ou l' H_2O_2 (Dumont P. *et al.*, 2000).

c. Les délétions de l'ADN mitochondrial

Les mitochondries possèdent leur propre matériel génétique codé par un ADN bicaténaire circulaire (ADNmt) de 16.569 pb (paire de bases). On a recensé plus de 150 délétions pouvant affecter l'ADNmt. La délétion la plus commune est une délétion de 4.977 pb associée à la sénescence cellulaire. De nombreuses études ont montré que la fréquence de cette délétion augmentait durant le vieillissement *in vivo*, notamment à partir de biopsies de peau (Pang C. *et al.*, 1994), de muscle squelettique (Lee H. *et al.*, 1994), de cœur, de rein (Liu V. *et al.*, 1998), de poumon (Fahn H. *et al.*, 1996) et de foie (Yen T. *et al.*, 1991). La fréquence de cette délétion augmente également *in vitro* avec le nombre de passages en culture effectués par les FHDs ainsi que chez des FHDs soumis à des stress subcytotoxiques au *t*-BHP (Dumont P. *et al.*, 2000).

Le mécanisme d'apparition de ces délétions est encore flou. En effet, il a été observé qu'une grande partie de ces délétions étaient flanquées de séquences directement répétées (DRS, Directly Repeated Sequences) (pour une revue, Osiewicz H., 1996). Il a donc été proposé que les délétions se formaient lors de la réplication de l'ADNmt par un mécanisme de recombinaison intramoléculaire provenant de l'appariement de ces DRS lorsque l'ADNmt est sous forme simple brin (Shoffner J. *et al.*, 1989). Toutefois, toutes les délétions ne sont pas toujours flanquées de DRS. De plus, il semble exister une corrélation entre l'apparition de ces délétions et l'exposition de l'ADNmt à des stress oxydatifs. De même, la fréquence de la délétion de 4.977 pb dans différents tissus de rats a été positivement corrélée avec leur taux métabolique respectif (Filser N. *et al.*, 1997). Puisque ces délétions sont aussi observées chez les cellules en SIPS induite par le *t*-BHP, tous ces arguments suggèrent que les ROS sont responsables de cette délétion.

d. Le raccourcissement des télomères

Les télomères sont des parties non codantes du génome situées aux extrémités des chromosomes et constituées de la répétition d'une courte séquence consensus (TTAGGG chez l'homme). Ces répétitions forment une structure tridimensionnelle avec laquelle interagissent de nombreuses protéines, on parle alors de télosome (Bryan T. *et al.*, 1995). Chez l'homme, à la naissance, ils ont une longueur d'environ 10 à 15 kb. Cette longueur diminue au cours du temps chez les cellules somatiques humaines. Cette perte se chiffre à environ 50 à 150 pb par passage en culture *in vitro* et de 15 à 50 pb par an *in vivo* (Harley C. *et al.*, 1990).

La raison de ce raccourcissement trouve son origine dans le mode d'action de l'ADN-polymérase lors de la réplication. En effet, l'ADN-polymérase ne peut que progresser dans le sens 5'-3', donnant lieu ainsi à la synthèse d'un brin continu et d'un brin discontinu. Le brin discontinu est formé de fragments dits d'Okazaki reliés ensuite entre eux par une ligase. L'ADN-polymérase a toujours besoin d'une amorce d'ARN pour lui permettre de synthétiser le brin complémentaire au niveau du brin discontinu. A chaque duplication du génome, la dernière amorce (amorce qui sera

jours après une série de stress sous *t*-BHP et 18 jours après un stress sous H₂O₂. Enfin, diverses études ont été réalisées sur des souches de FHDs exprimant la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT). En effet, diverses souches de FHDs soumises à des stress avec de l'H₂O₂, des UV ou des radiations γ à des doses subcytotoxiques entrent toujours en SIPS malgré l'activité de la télomérase. Ces cellules possèdent les différentes caractéristiques de la SIPS tels qu'un arrêt de la prolifération, une augmentation de l'activité SA- β gal, la surexpression de p21^{WAF-1} et une hypophosphorylation de pRb (de Magalhaes J.P. *et al.*, 2002 ; Gorbunova V. *et al.*, 2002 ; Matuoka K. and Chen K., 2002). On a vérifié que la télomérase est bien active lorsque les cellules exprimant la télomérase entrent en SIPS (de Magalhaes J. *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent donc que la SIPS puisse être induite par des stress d'intensité subcytotoxique indépendamment d'un raccourcissement télomérique atteignant une longueur minimale observée lorsque ces cellules entrent en sénescence répllicative et de la possibilité de rallonger les télomères.

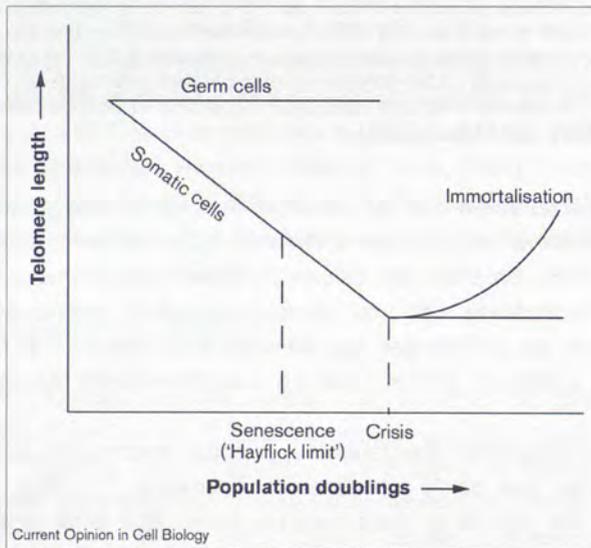


Fig.13 : Représentation schématique de l'implication de la longueur des télomères dans la sénescence répllicative et l'immortalisation des cellules humaines. La longueur des télomères diminue au fil des passages en culture chez les cellules somatiques humaines, contrairement aux cellules germinales. Elle atteint une longueur critique qui engendre l'entrée des cellules en sénescence répllicative, puis en « crise » où on observe la mort cellulaire. Les cellules immortalisées, suite à l'activation de la télomérase, ont leur longueur de télomères stabilisée ou allongée, menant à une durée de vie illimitée (Bryan T.M. and Cech T.R., 1999).

e. L'arrêt du cycle cellulaire

L'arrêt du cycle cellulaire dans la sénescence répliquative est principalement lié aux protéines p53 et pRb. Ces protéines sont d'ailleurs mutées dans la plupart, si pas tous les cancers humains. Les cellules sénescents sont arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire et ne répondent plus aux stimulations de mitogènes. Le mécanisme impliqué est le suivant. Le facteur de transcription p53, activé lors de dommages à l'ADN, serait activé lorsque les télomères arrivent à une longueur critique qui serait dès lors reconnue comme un dommage à l'ADN. p53 engendre la surexpression de l'inhibiteur de kinase dépendante de cycline (CDKI) $p21^{WAF-1}$. $p21^{WAF-1}$ est responsable de l'inactivation du complexe cdk2/cycline E, intervenant dans la phosphorylation de la protéine de rétinoblastome pRb (Sherr C. and Roberts J., 1999). pRb ainsi hypophosphorylé se lie et inactive le facteur de transcription E2F qui est nécessaire à la transcription de gènes impliqués dans la transition G1/S du cycle cellulaire et dans la synthèse de l'ADN tels que PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), DHFR (Dihydrofolate Reductase), TK (Thymidilate Kinase) et TS (Thymidilate Synthétase) (Weintraub S. *et al.*, 1992).

Une deuxième voie d'arrêt du cycle cellulaire, semblant indépendante du raccourcissement des télomères, est également impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en sénescence répliquative, il s'agit de la voie dépendante d'une autre CDKI, $p16^{INK-4A}$ (Rheinwald J. *et al.*, 2002). $p16^{INK-4A}$ est responsable de l'inactivation des complexes cdk4/cycline D et cdk6/cycline D, également responsable de la phosphorylation de pRb (Alcorta D. *et al.*, 1996). Il a récemment été montré que la voie dépendante de p53 était réversible, contrairement à la voie dépendante de $p16^{INK-4A}$ (Beauséjour C. *et al.*, 2003).

f. Modulation de l'expression génique

Plusieurs gènes voient leur expression varier en sénescence répliquative. On peut les classer en deux catégories : les gènes intervenant dans le cycle cellulaire et les gènes liés à des fonctions spécifiques assurées par le type cellulaire étudié. Nous allons nous attacher ici plus particulièrement aux gènes dont l'expression varie chez les fibroblastes humains (pour une revue, voir Campisi J., 1996, Cristofalo V.J. *et al.*, 1998).

Variations dans l'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire

Une des caractéristiques majeures de la cellule sénescence est qu'elle est incapable de se diviser. C'est au niveau de la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire qu'un blocage apparaît, rendant impossible aux cellules la transition en phase S. On peut classer les gènes impliqués dans le cycle cellulaire et qui voient leur expression varier en 4 catégories :

- **les gènes de réponse précoce** : ce sont les gènes qui sont induits immédiatement après une stimulation par des facteurs de croissance. La plupart de ces gènes sont exprimés à un niveau normal lors de la sénescence, toutefois, trois gènes, le proto-oncogène *c-fos* et les gènes *Id-1* et *Id-2* voient leur expression inhibée.

- **les gènes impliqués dans la transition G1/S** : plusieurs gènes nécessaires à la transition entre les phases G1 et S ne sont plus exprimés dans les cellules sénescents. Citons par exemple les gènes de réplication histones-dépendants qui ne sont plus exprimés, ou encore le facteur de transcription E₂F, nécessaire à la transcription de gènes impliqués en G1/S. En effet, E₂F contrôle l'expression de certains gènes dont les protéines sont responsables de la réplication du matériel génétique comme par exemple la thymidine kinase, la thymidylate synthétase et la dihydrofolate réductase.

- **les cyclines et kinases dépendantes de cyclines** : plusieurs cyclines et kinases dépendantes de cyclines (cdk) responsables de la régulation des phases G1 et G2 voient leur niveau d'expression diminuer au cours du temps. Ainsi, on assiste par exemple chez les fibroblastes humains à une sous-expression de *cdk2*, des cyclines A et B ainsi que des cdk dépendantes des cyclines E et D. Une diminution de la quantité de cycline D peut être responsable d'une diminution d'activité des complexes *cdk4/cycline D1* et *cdk6/cycline D1*, diminuant ainsi le niveau de phosphorylation de pRb.

- **les inhibiteurs de croissance** : les inhibiteurs de croissance tels que p53 et p21^{WAF-1} sont surexprimés chez les cellules sénescents.

Variation du niveau d'expression de gènes impliqués dans des fonctions spécifiques

Divers gènes responsables de fonctions spécifiques du type cellulaire étudié voient leur expression altérée au cours du vieillissement.

Ainsi, parmi les gènes dont le niveau d'expression est modifié chez les fibroblastes humains sénescents, on retrouve une surexpression des gènes impliqués d'une part dans le remodelage de la matrice extracellulaire lors du vieillissement tels que *MMP-1*, *MMP-3* (Millis A. *et al.*, 1992), la *fibronectine* (Murano S. *et al.*, 1991), l'*ostéonectine* et *SM22* et d'autre part dans la réponse inflammatoire tels que des gènes codant pour des chémokines ou des cytokines inflammatoires telles que *MCP-1*, *Gro- α* , *IL-1 β* , *IL-15*, qui sont des effecteurs du recrutement et de l'activation de macrophages et des PMN (Shelton D. *et al.*, 1999).

On observe également des changements de l'expression génique chez les cellules en SIPS. Ainsi, on retrouve une série de gènes associés à la sénescence qui sont surexprimés chez les FHDs en SIPS induite par le *t-BHP* ou l'*H₂O₂* tels que la *fibronectine*, l'*ostéonectine*, *SM22* et l'*apolipoprotéine J (apo J)* (Dumont P. *et al.*, 2000). Parmi ces différents gènes, l'*apo J* a particulièrement attiré notre attention lors de notre travail.

L'apolipoprotéine J (apo J)

L'apo J, également appelée clusterine, est une glycoprotéine hétérodimérique sécrétée de 75-80 kDa. Le gène codant pour l'apo J est situé sur le chromosome 8 en position 8p21-p12, s'étend sur 16 kb et est constitué de 9 exons. La protéine quant à elle est constituée de 449 acides aminés. Suite à la protéolyse du signal de sécrétion de 22 acides aminés, la protéine est clivée en deux chaînes : α et β . Celles-ci sont ensuite reliées entre elles par 5 ponts disulfures (Fig. 14).

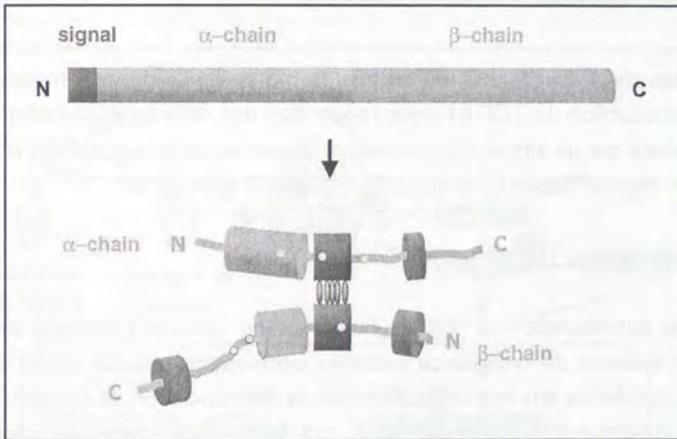


Fig. 14 : Représentation schématique de la structure de l'apo J. La chaîne polypeptidique est clivée en 2 chaînes α et β et le signal de sécrétion est excisé. Les 2 chaînes sont maintenues entre elles par 5 ponts disulfures. La structure possède 6 sites de N-glycosylation (Jones S. and Jomary C., 2002).

L'apo J contient 6 sites de N-glycosylation. La séquence de l'apo J est hautement conservée entre les espèces, ainsi on note une identité de 70-80 % chez les mammifères. Un segment situé entre les résidus 87 à 150 est particulièrement conservé, ce qui suggère qu'il a un rôle fonctionnel important (Jenne D. and Tschopp J., 1989).

La fonction exacte de l'apo J est encore floue, beaucoup de fonctions hypothétiques lui ont été attribuées ainsi que plusieurs dénominations (pour une revue, Jenne D. and Tschopp J., 1992). En effet, l'apo J est capable d'interagir avec beaucoup de molécules telles que les lipides, les protéines amyloïdes, les immunoglobulines, etc. (pour une revue, Wilson M. and Easterbrook-Smith S., 2000). De plus, le gène de l'apo J est surexprimé dans de nombreuses situations tels que lors du développement, en réponse à des stress ou à une blessure. Toutefois, il semble que l'apo J soit une protéine-chaperon ayant des similitudes avec les protéines de choc thermique (heat shock proteins ou hsp). Tout d'abord il existe dans le promoteur de l'apo J une séquence consensus de 14 pb spécifiquement reconnue par le facteur de transcription HSF1 (Heat Shock Factor 1) (Michel D. *et al.*, 1997). De plus, il a été montré que l'apo J était capable de s'associer à des

protéines modifiées suite à des stress et de former des complexes, empêchant ainsi leurs précipitations (Humphreys D. *et al.*, 1999).

Il a été montré que l'apo J était surexprimée chez les FHDs sénescents ainsi que chez les FHDs soumis à la SIPS induite par le *t*-BHP ou l' H_2O_2 (Dumont P. *et al.*, 2000). De plus, la transfection de l'apo J de chien (gp80) protège les FHDs de la cytotoxicité et de la SIPS induite par le *t*-BHP et l'éthanol (Dumont P. *et al.*, 2002).

2.2.3. Transduction du signal et SIPS

Des résultats récents ont permis de mettre en évidence l'importance de la voie de transduction du TGF- β 1 dans l'apparition des différentes caractéristiques de la SIPS induite par un stress subcytotoxique unique sous H_2O_2 sur des FHDs IMR-90 de poumon foetal (Fripiat C. *et al.*, 2001, Fripiat C. *et al.*, 2002).

a. La superfamille du TGF- β

La superfamille du TGF- β (Transforming Growth Factor- β) constitue un groupe de facteurs de croissance sécrétés intervenant dans un grand nombre de processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la mobilité, l'adhésion et la mort (Massagué J., 1998). De plus, ces facteurs de croissance peuvent avoir des réponses différentes, voir opposées, suivant le type cellulaire étudié et les conditions expérimentales. Ainsi, les membres de la sous-famille du TGF- β peuvent stimuler la prolifération de certaines souches de fibroblastes, bloquer la division de cellules endothéliales ou épithéliales et promouvoir ou inhiber la différenciation de certaines cellules d'origine neuronale ou mésenchymateuse. Cette superfamille peut être divisée en trois sous-groupes principaux : les TGF, les activines et les BMPs (Bone Morphogenic Proteins) (Attisano L. and Wrana J., 2000). Ces différents facteurs partagent un même processus de transduction du signal (pour une revue, voir Massagué J., 1998). Tout d'abord, la forme active de ces protéines est un dimère lié par des interactions hydrophobes et, dans la plupart des cas, par des ponts disulfures (Sun P. and Davies D., 1995). Ces ligands vont ensuite être reconnus et activés par des paires de récepteurs à Ser/Thr kinase de type I et II. Le mode de liaison aux récepteurs diffère suivant le type de ligand. Ainsi, les facteurs de croissance de type TGF- β et les activines se lient de façon séquentielle aux récepteurs. Ils se lient tout d'abord aux récepteurs de type II puis ce complexe va interagir et recruter les récepteurs de type I et les activer par phosphorylation dans un domaine riche en glycine-sérine (domaine GS). Par contre, les facteurs de croissance de la famille des BMPs se lient de façon coopérative aux récepteurs de type I et II (Massagué J., 1998).

b. Le TGF- β 1

La sous-famille du TGF- β compte actuellement 5 membres nommés TGF- β 1 à TGF- β 5. Les mammifères expriment les isoformes 1 à 3 tandis que les isoformes 4 et 5 sont exprimées chez le poulet et le xénope. Les voies de transduction induites par le TGF- β 1 commencent par une liaison du ligand aux récepteurs de type II ($T\beta$ RII) qui vont recruter et activer par phosphorylation les récepteurs de type I ($T\beta$ RI). Ce complexe va ensuite activer deux voies différentes de transduction du signal : la voie des smads et la voie des TAKs (Fig. 15).

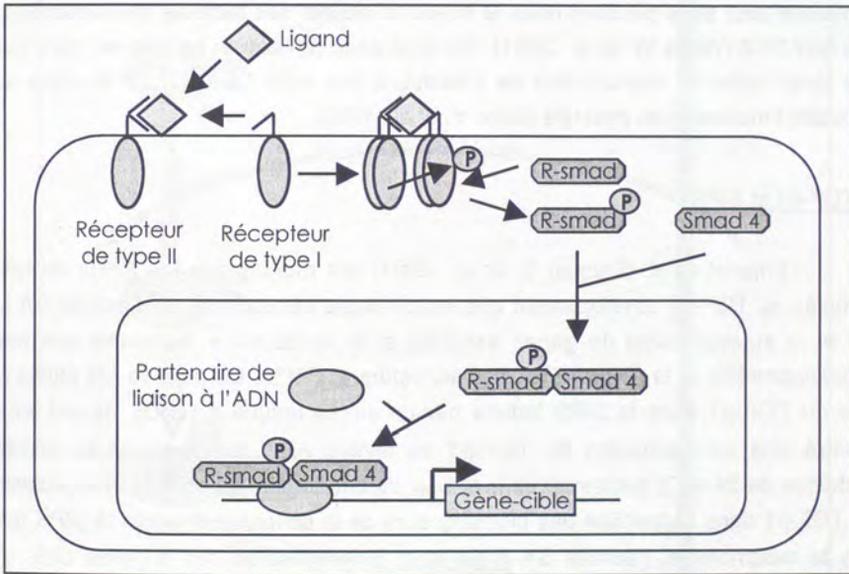


Fig. 15 : La voie de transduction du signal dépendante des smads du TGF- β . Le ligand se lie au récepteur de type II qui recrute et active le récepteur de type I. Les R-smads sont phosphorylés par le récepteur et s'associent au co-smad smad 4. Ce complexe pénètre dans l'ADN et peut s'associer à une protéine de liaison et activer la transcription de gènes-cibles (d'après Massagué J., 1998).

Les smads sont des protéines intervenant dans la transduction du signal en aval de récepteurs à Ser/Thr kinase. Elles partagent une structure moléculaire commune constituée d'un domaine MH1 (N-terminal) et d'un domaine MH2 (C-terminal) hautement conservés et d'une région « linker ». On distingue trois types de smads : les smads régulées par le récepteur (r-smads), la co-smad et les smads inhibiteurs (i-smads). En ce qui concerne la voie du TGF- β , il a été montré que les r-smads 2 et 3 étaient reconnues et phosphorylées par le T β RI dans un domaine SSXS carboxy-terminal conservé. Cette interaction entre les r-smads et le T β RI dépend d'une protéine adaptatrice appelée SARA (Smad Anchor for Receptor Activation) (Tsukazaki T. *et al.*, 1998). Les r-smads vont alors se séparer du T β RI et

s'associer avec la co-smad 4 via leurs extrémités C-terminales. Le complexe ainsi formé peut pénétrer à l'intérieur du noyau où il active la transcription de gènes-cibles spécifiques soit directement, soit indirectement en coopérant avec d'autres facteurs de transcription comme ATF-2, un facteur de transcription de la famille d'AP-1 (Sano Y. *et al.*, 1999). Cette voie peut être inhibée par la i-smad smad 7 qui, en se liant au T β RI va empêcher l'accès et la phosphorylation des r-smads.

Quant à la voie des TAKs, on sait que la protéine TAK-1 (TGF- β -activated kinase-1), membre de la famille des MAPKKK (kinase de kinase de MAPK) est activée suite à une stimulation des cellules par du TGF- β 1. Celle-ci activerait ensuite une protéine activatrice de p38^{MAPK}, soit MKK6 ou MKK3 (Enslin H. *et al.*, 1998). Le complexe peut alors pénétrer dans le noyau et activer des facteurs de transcription tels qu'ATF-2 (Waas W. *et al.*, 2001). On peut donc remarquer par cet exemple que ces deux voies de transduction ne s'excluent pas l'une l'autre mais peuvent au contraire fonctionner en synergie (Sano Y. *et al.*, 1999).

c. TGF- β 1 et SIPS

Frippiat *et al.* (Frippiat C. *et al.*, 2001) ont montré que les FHDs IMR-90 stimulés au TGF- β 1 développaient une morphologie sénescence, une activité SA β -gal et la surexpression de gènes associés à la sénescence répliquative tels que l'*apolipoprotéine J*, la *fibronectine*, l'*ostéonectine* et *SM22*. De plus, ils ont étudié le rôle du TGF- β 1 dans la SIPS induite par un stress unique à l'H₂O₂. Ils ont ainsi montré une surexpression du TGF- β 1 au niveau ARN messager et au niveau protéique de 24 à 72 heures après le stress. Ils ont également confirmé l'implication du TGF- β 1 dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence après la SIPS tels que la morphologie, l'activité SA β -gal et la surexpression des 4 gènes cités ci-dessus en bloquant la transduction du signal dépendante du TGF- β 1 en utilisant des anticorps neutralisants du T β RII et du TGF- β 1 lui-même.

Des travaux plus récents ont alors permis de décortiquer la voie de transduction du signal générant l'apparition de ces différents biomarqueurs de la sénescence. Il apparaît que p38^{MAPK} est également activé et que celui-ci connaît deux phases d'activation suite au stress à l'H₂O₂ induisant la SIPS. p38^{MAPK} est tout d'abord directement activé suite au stress et ce, indépendamment du TGF- β 1 (Frippiat C. *et al.*, 2002). p38^{MAPK} active alors par phosphorylation le facteur de transcription ATF-2 (Waas W. *et al.*, 2001) qui engendre un arrêt immédiat du cycle cellulaire et une surexpression du TGF- β 1. Ensuite, une 2^{ème} phase d'activation, dépendante cette fois du TGF- β 1, se met en place et est indispensable dans l'induction des différents biomarqueurs de la sénescence en SIPS par un mécanisme impliquant une interaction entre le facteur de transcription ATF-2 et pRb hypophosphorylé (Fig. 16).

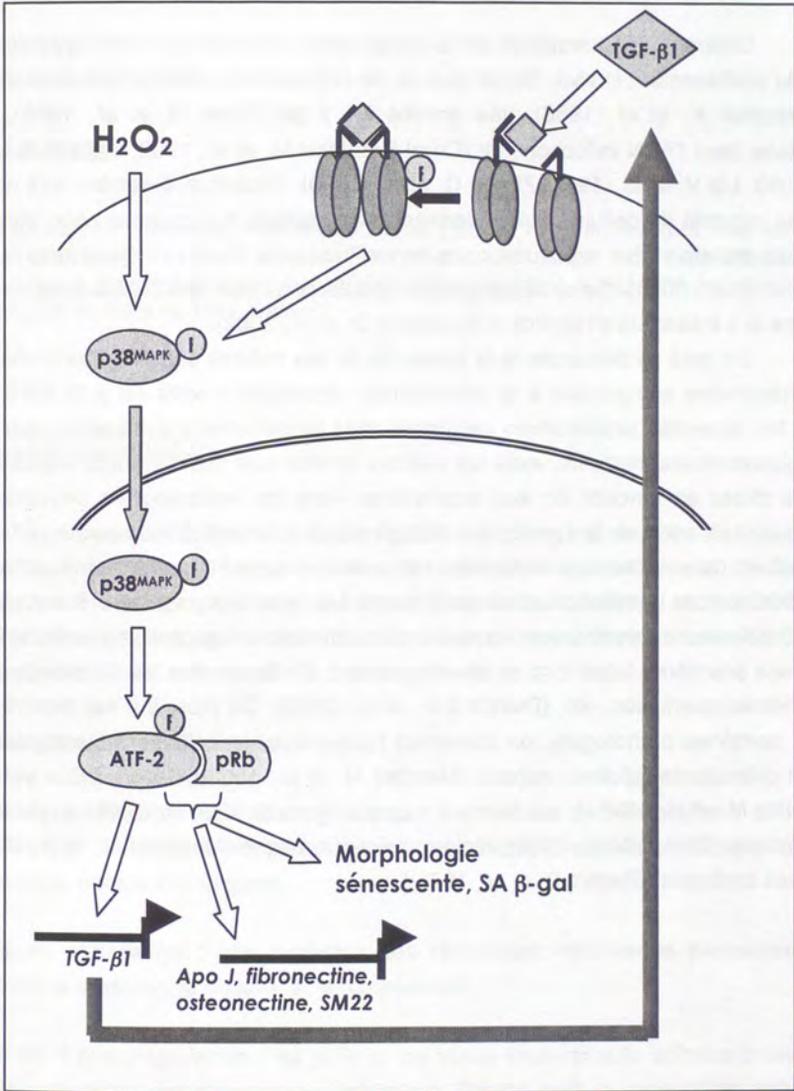


Fig.16 : Transduction du signal impliquée dans l'apparition des caractéristiques de la sénescence répliquative dans la SIPS induite par un stress subcytotoxique à l'H₂O₂ chez les HDFs IMR-90. p38^{MAPK} est activé directement suite au stress. p38^{MAPK} active alors par phosphorylation le facteur de transcription ATF-2 qui engendre un arrêt immédiat du cycle cellulaire et une surexpression au niveau messager et protéique du TGF-β1. Ceci va engendrer une 2^{ème} phase d'activation de p38^{MAPK}, dépendante cette fois du TGF-β1, qui semble indispensable dans la mise en place des différents biomarqueurs du vieillissement en SIPS par un mécanisme impliquant le facteur de transcription ATF-2 interagissant avec pRb hypophosphorylé (d'après Toussaint O. et al., 2003).

2.2.4. Incidence de la SIPS *in vivo*

Différents biomarqueurs de la sénescence réplivative *in vitro* apparaissent lors du vieillissement *in vivo*. Parmi ceux-ci, on retrouve une morphologie sénescence (Bayreuther K. *et al.*, 1988), une activité SA β -gal (Dimri G. *et al.*, 1995), des délétions dans l'ADN mitochondrial (Coral-Debrinski M. *et al.*, 1992, Hayakawa M. *et al.*, 1993, Liu V. *et al.*, 1998, Zhang C. *et al.*, 1999). Toutefois, il semble qu'il n'y ait qu'une minorité de cellules qui deviennent sénescences *in vivo*, mais cette minorité pourrait toutefois être impliquée dans le vieillissement tissulaire (pour une revue, Shay J. *et al.*, 2000). Cette hétérogénéité cellulaire au sein des tissus a été décrite comme la « mosaïque d'Hayflick » (Toussaint O. *et al.*, 2002).

On peut se demander si la présence de ces cellules sénescences *in vivo* est un phénomène comparable à la sénescence réplivative *in vitro* ou à la SIPS. En effet, les capacités prolifératives cellulaires sont probablement suffisantes pour une vie dépassant les cent ans, mais les cellules *in vivo* sont constamment exposées à divers stress en fonction de leur localisation. Ainsi les pneumocytes peuvent être exposés à l'ozone, à la fumée, au tabagisme et à la pollution. Les hépatocytes détoxifient de nombreuses molécules naturelles et synthétiques et génèrent aussi des ROS lors de la métabolisation de l'éthanol. Les kératinocytes, les mélanocytes et les fibroblastes du derme sont exposés aux ultraviolets. Les cellules endothéliales sont aux premières loges lors du développement d'inflammation ou de phénomènes d'ischémie/reperfusion, etc. (Dierick J.-F. *et al.*, 2003). De plus, il a été montré que dans certaines pathologies, on observait l'apparition de cellules sénescences de façon prématurée (ulcères veineux (Mendez M. *et al.*, 1998b, 1999), reflux veineux (Mendez M. *et al.*, 1998a), carcinome hépatique (Paradis V. *et al.*, 2001), hyperplasie prostatique (Choi J. *et al.*, 2000), lésion athérosclérotique (Minamino T. *et al.*, 2002), fibroses cystiques (Shapiro B. *et al.*, 1979)).

CHAPITRE III : VIEILLISSEMENT DE LA PEAU

3.1. La peau

(pour un livre de référence, Kanitakis J., 1997 ; Burkitt H. *et al.*, 1993 et Freinkel R.K. and Woodley D.T., 2001, ; pour un site de référence : www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP2/peau.html (CHU pitié-salpêtrière de Jussieu, laboratoire du Prof. Poirier))

3.1.1. Introduction

La peau est l'organe le plus volumineux de l'organisme. Elle constitue une barrière entre le corps humain et son environnement et se trouve de ce fait confrontée à des agents d'origine interne (hormones, cytokines, etc.) et externe (rayons ultraviolets, oxygène, radiations ionisantes, ozone, températures extrêmes, etc.) potentiellement stressants.

La peau joue 4 rôles principaux :

- **rôle de protection** : elle protège l'organisme contre de nombreuses atteintes causées par l'environnement (contraintes mécaniques, agents chimiques, chocs thermiques, agents biologiques).
- **rôle de sensibilité** : elle renferme des récepteurs très variés permettant de percevoir la pression, la douleur et la température.
- **rôle de thermorégulation** : les poils et les tissus sous-cutanés adipeux protègent l'organisme contre les déperditions caloriques. D'autre part, la déperdition calorique peut être facilitée par l'évaporation de la sueur au niveau des glandes sudoripares.
- **rôle métabolique** : l'épiderme synthétise de la vitamine D qui complète celle obtenue par l'alimentation. Le tissu sous-cutané adipeux renferme un stock d'énergie principalement sous forme de triglycérides.

3.1.2. Structure de la peau

La peau est caractérisée par une structure de base constituée de trois zones distinctes d'origine embryologique différente : l'épiderme (origine ectodermique), le derme et l'hypoderme (origine mésodermique) (Fig. 17).

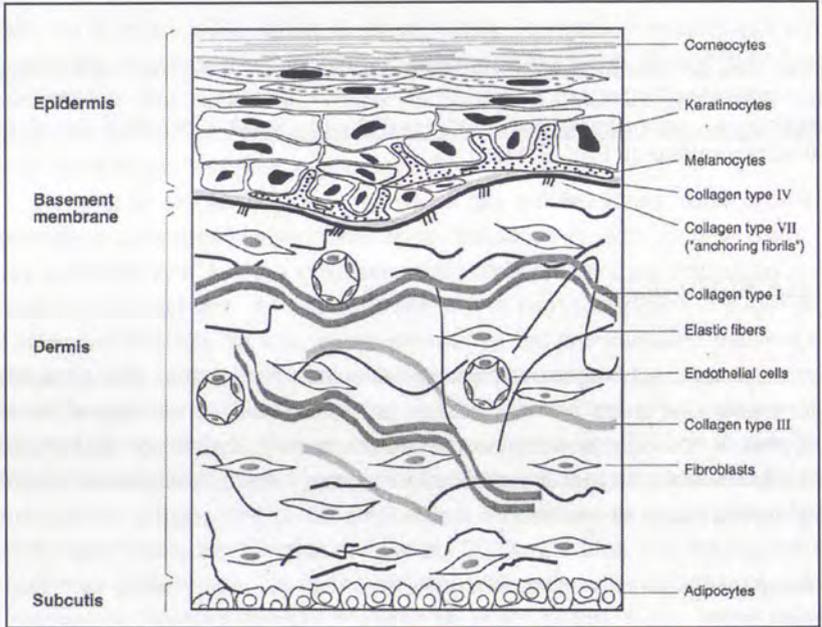


Fig. 17 : Représentation schématique de la structure de la peau (Scharffetter-Kochanek K. et al., 2000).

a. L'épiderme

L'épiderme est un épithélium stratifié kératinisé qui se renouvelle constamment. L'épiderme ne contient ni vaisseau sanguin ni vaisseau lymphatique mais il est parcouru par de nombreuses terminaisons nerveuses libres. La majorité des cellules (environ 90%) composant l'épiderme sont des kératinocytes. Ceux-ci vont suivre un programme de différenciation au cours de leur migration de la profondeur vers la surface de l'épiderme. Ce processus est appelé kératinisation. Les changements morphologiques innérent à la différenciation des kératinocytes permettent de délimiter quatre couches épidermiques distinctes :

- **la couche basale (stratum germinatum)** est constituée d'une couche unique de cellules de forme cubique. Il s'agit de la couche germinative de l'épiderme. On peut y distinguer trois types principaux de kératinocytes en fonction de leur capacité proliférative : les cellules souches (division lente et illimitée), les cellules amplificatrices (division rapide et limitée) et les cellules post-mitotiques qui entament

leur processus de migration vers les couches superficielles. Les kératinocytes y expriment principalement les kératines de type 5 et de type 14. Les kératinocytes de la couche basale sont associés aux composants de la jonction épidermo-dermique via des hémidesmosomes. Cette association est indispensable pour l'intégrité structurelle de l'épiderme et permet un contrôle de la prolifération, de la migration et de la différenciation des kératinocytes.

- **la couche épineuse (*stratum spinosum*)** est constituée de cinq à dix couches cellulaires. Les cellules y sont de forme polyédrique et forment entre elles des jonctions inter-cellulaires appelées desmosomes. Les kératines de type 1 et de type 10 y sont nouvellement synthétisées et on observe l'apparition de granulations lamellaires.

- **la couche granuleuse (*stratum granulosum*)** est formée de une à trois couches cellulaires. A ce stade, les kératinocytes synthétisent la majorité des protéines impliquées dans le processus de kératinisation. Ainsi, on observe dans le cytoplasme des kératinocytes de la couche granuleuse des granulations de kératohyaline et des granulations lamellaires. Les granulations de kératohyaline sont composées de profillagrine (précurseur de la fillagrine), de kératine et de loricine. Les granulations lamellaires, déjà détectées au sein de la couche épineuse, sont composés de glycoprotéines, de glycolipides, de phospholipides, de stérols libres et de différentes hydrolases acides telles que des lipases, des protéases, des phosphatases acides et des glycosidases. D'autres protéines composant l'enveloppe cornée sont également synthétisées dans cette couche granuleuse : l'involucrine, la kératoline, la cornifine, la loricine, l'élafine et l'envoplakine. Lors de la transition entre une cellule granuleuse et une cellule cornée, plusieurs étapes-clefs de la kératinisation vont se réaliser. Tout d'abord, on va observer une conversion de la profillagrine en monomère de fillagrine qui est responsable de l'aggrégation et de la liaison par ponts disulfure des filaments de kératine. D'autre part, les granules lamellaires vont sécréter les précurseurs lipidiques dans l'espace intercellulaire de la couche cornée ainsi que les différentes hydrolases et permettre ainsi l'élaboration d'une barrière lipidique imperméable. Enfin, la membrane cellulaire va être renforcée par une enveloppe cornée épaisse et rigide. Les différentes protéines composant l'enveloppe cornée sont rendues insolubles via l'activité de la transglutaminase. Enfin, la cellule va déclencher sa mort programmée via la destruction de ses organites cellulaires dont son noyau, devenant ainsi un cornéocyte.

- **la couche cornée (*stratum corneum*)** est composée de plusieurs couches de cornéocytes entourés d'une matrice extracellulaire lipidique. L'épaisseur de la couche cornée est variable suivant sa localisation et peut être constituée de 15 à plus de 100 couches cellulaires qui desquament en surface.

On considère qu'un kératinocyte produit dans la couche basale migre vers la surface en 30 jours environ.

Outre les kératinocytes, d'autres types cellulaires minoritaires sont également présents au sein de l'épiderme :

- **les mélanocytes** : cellules responsables de la synthèse de la mélanine. Les mélanocytes se trouvent au niveau de la couche basale et s'associent avec plusieurs kératinocytes via la formation de dendrites. Ces dendrites leur permettent de transférer des mélanosomes, organites contenant la mélanine et siège de la mélanisation, aux kératinocytes. La mélanine forme une calotte supranucléaire qui protège le matériel génétique des rayons ultraviolets nocifs.

- **Les cellules de Langerhans** : cellules dendritiques présentatrices d'antigènes. Suite à une stimulation inflammatoire, les cellules de Langerhans traversent la jonction épidermo-dermique et rejoignent les vaisseaux lymphatiques du derme où elles sont capables d'activer les lymphocytes T au niveau des ganglions lymphatiques.

- **Les cellules de Merkel** : cellules neuroendocrines appartenant au système neuroendocrine diffus (APUD) ayant une fonction de mécanorécepteur.

b. Le derme

Architecture générale

Le derme est un tissu conjonctif dont le rôle est de soutenir l'épiderme et de protéger le réseau vasculaire et les fibres nerveuses qui le traversent. Il est principalement constitué d'une matrice extracellulaire fibreuse et amorphe - composée de fibres de collagène, de fibres élastiques, de fibres de réticuline et d'une substance fondamentale - entourant les annexes épidermiques, le réseau neuro-vasculaire, les récepteurs sensoriels et les cellules dermiques.

Il est divisé en deux parties, le derme papillaire (superficiel) et le derme réticulaire (profond).

Le **derme papillaire** est formé de projections coniques (papilles dermiques) contenant des organites tactiles (dits « de Meissner »). C'est un tissu conjonctif lâche où les fibres de collagène sont associées de façon perpendiculaire à la membrane basale épidermique. Cette partie du derme est très innervée, très vascularisée et est riche en fibroblastes et en substance fondamentale.

Le **derme réticulaire** est un tissu conjonctif dense où les fibres de collagène sont organisées, sans orientation précise en trousseaux denses, épais et entremêlés de fibres élastiques.

Les cellules du derme

Les fibroblastes sont les cellules majoritaires du derme. Ils sont responsables de la synthèse de la majorité des constituants de la matrice extracellulaire tels que les collagènes, l'élastine, les glycoprotéines de structure et les protéoglycanes. Ils jouent un rôle essentiel dans l'équilibre entre la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire car ils sécrètent également des métalloprotéinases (MMPs) intervenant dans la dégradation de cette matrice ainsi que leurs inhibiteurs (TIMPs). Les fibroblastes sont aussi impliqués dans la croissance et la différenciation épidermique. En effet, les fibroblastes sécrètent le KGF (Keratinocyte Growth Factor) qui intervient sur la croissance des kératinocytes (Rubin J. *et al.*, 1989) ainsi que dans le processus de cicatrisation (Werner S. *et al.*, 1992 & 1994). De plus, il a été montré que les TIMPs, également sécrétés par les fibroblastes, étaient aussi capables de stimuler la croissance des kératinocytes et d'augmenter la stratification des épidermes en culture (Bertaux B. *et al.*, 1991).

Les dendrocytes dermiques représentent une population hétérogène de cellules mésenchymateuses dendritiques. Elles sont surtout présentes autour des annexes épidermiques et ont une fonction de phagocytes.

Les mastocytes sont des cellules mononuclées retrouvées essentiellement autour des capillaires dermiques. Elles sont responsables de la synthèse de médiateurs de l'inflammation.

Fibres et substance fondamentale

Le derme est composé d'une importante matrice extracellulaire composée de fibres de collagène, de fibres élastiques et d'une substance fondamentale.

Fibres de collagène

Les fibres de collagène constituent 80% du poids sec de la matrice extracellulaire et sont responsables des propriétés tensiles de la peau. Les collagènes constituent une famille de glycoprotéines homo- ou hétéro- trimériques. On recense actuellement 20 types de collagènes différents dont 11 sont exprimés dans le derme. Ces molécules sont composées de trois chaînes identiques ou non. Les chaînes de collagène sont synthétisées sous forme de précurseurs : les procollagènes. Les procollagènes s'associent en triple hélice et sont sécrétés dans le milieu extracellulaire. Ils y subissent un clivage protéolytique et la protéine résultante est nommée tropocollagène. Les molécules de tropocollagènes s'associent entre elles et forment les fibrilles de collagène.

Dans le derme, on retrouve les collagènes suivants :

- les collagènes de type I, III et V constituent 80-90% des collagènes dermiques. Ils sont responsables du réseau fibreux et confèrent une résistance mécanique au derme.

- les collagènes de type IV et VII participent à la structure de la jonction épidermo-dermique et permettent un ancrage de l'épiderme sur le derme.

- d'autres types de collagènes minoritaires interviennent dans l'association des fibres avec leur environnement (collagènes de type VIII, XII, XIV, XV et XVI) ou dans la fixation des éléments de structure du derme et de l'hypoderme (collagène de type VI).

Fibres élastiques

Les fibres élastiques constituent de 2 à 4% du poids sec de la matrice extracellulaire et sont responsables de l'élasticité et de la souplesse de la peau. L'élastine, regroupant une famille d'isoformes aux propriétés chimiques, physiques et fonctionnelles distinctes et résultant de l'épissage alternatif d'un gène unique est synthétisée par les fibroblastes sous forme d'un précurseur, la tropoélastine. Celle-ci se polymérise au sein de la substance fondamentale en incorporant des microfibrilles de fibrilline, une glycoprotéine de structure.

La substance fondamentale

La substance fondamentale correspond à 0,1 à 0,3 % du poids sec de la matrice extracellulaire et intervient dans l'hydratation de la peau. Elle est composée de glycoprotéines, de glycosaminoglycanes et de protéoglycanes.

Les glycoprotéines de structure forment un groupe de molécules composées essentiellement de chaînes protéiques liées à des polysaccharides ramifiés. Les glycoprotéines de structure comprennent deux molécules fibrillaires, la fibrilline et la fibronectine et de nombreuses molécules non filamenteuses dont la laminine, l'entactine et la tenascine. Elles sont responsables de la formation de liaisons entre les cellules et la matrice extracellulaire ainsi que de l'organisation de la matrice.

Les glycosaminoglycanes (GAGs) sont des polymères linéaires constitués d'une répétition de disaccharides. L'acide hyaluronique ou hyaluronane est le principal GAG du derme. C'est le seul GAG non fixé à une protéine porteuse et non sulfaté. Les autres GAGs peuvent s'associer à une protéine centrale et former ainsi un **protéoglycane**. On distingue ainsi le dermatane sulfate, également très abondant dans la peau, le chondroïtine sulfate, le kératane sulfate et l'héparane sulfate. Le dermatane sulfate fait partie de deux protéoglycanes non agrégants : le biglycane et la décorine. Avec trois autres protéoglycanes portant une chaîne de kératane sulfate : le luminane, la fibromoduline et le kératocane, ils forment une famille de protéines extracellulaires de petites tailles appelée les petits protéoglycanes riches

en Leucine (SLRP : small leucine-rich proteoglycans). Ils peuvent jouer divers rôles au sein du derme tels que l'hydratation du tissu, les interactions cellules-matrice mais aussi la prolifération, la différenciation ou la migration en se fixant à des facteurs de croissance.

Les métalloprotéinases matricielles et leurs inhibiteurs

Le métabolisme du tissu conjonctif nécessite un équilibre entre la dégradation et la synthèse de la matrice extracellulaire. Les métalloprotéinases matricielles (MMP) sont des endopeptidases à zinc et constituent une famille importante d'enzymes responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire qui partagent des propriétés structurelles et fonctionnelles communes, mais qui se distinguent entre elles par leur spécificité de substrat.

On peut ainsi distinguer 5 sous-classes principales :

- les collagénases interstitielles (MMP-1, MMP-8 et MMP-13): sont responsables de la dégradation des collagènes de type I et de type III, ainsi que de la gélatine.
- les gélatinases (MMP-2 et MMP-9): dégradent la gélatine mais aussi les collagènes de type I, IV et V, la fibronectine et l'élastine.
- les stromélysines (MMP-3, MMP-7, MMP-10 et MMP-11): ont de nombreux substrats dont la laminine, la fibronectine, le collagène non hélicoïdal.
- les MT-MMPs (Membrane-Type MMP : MMP-14, MMP-15, MMP-16 et MMP-17) : ont été découvertes plus récemment et se caractérisent des autres MMPs par leur association avec la membrane plasmique via leur domaine transmembranaire.
- l'élastase (MMP-12): dégrade l'élastine.

L'activité des MMPs est hautement régulée et ce, à différents niveaux. Tout d'abord, au niveau de l'expression génique, ensuite au niveau de l'activation de la forme latente de la protéine et enfin via l'activité d'autres enzymes dénommées TIMPs (Tissue Inhibitors Metalloproteinases). On a actuellement répertorié quatre TIMPs (TIMP-1, -2, -3 et -4). Il s'agit de petites glycoprotéines qui ont une affinité particulière pour certaines MMPs. Ainsi, TIMP-1 inhibe principalement MMP-1 et TIMP-2, MMP-2 et MMP-9.

c. La jonction épidermo-dermique

Il s'agit d'une membrane basale complexe jouant le rôle d'interface entre le derme et l'épiderme, élaborée conjointement par les kératinocytes de la couche basale et par les fibroblastes. Elle joue un rôle fondamental comme support mécanique pour l'adhésion de l'épiderme au derme et contrôle les échanges de produits

métaboliques entre ces deux compartiments. Par ailleurs, elle sert de support de migration des kératinocytes lors de la cicatrisation et elle est traversée par divers types cellulaires (entre autres les cellules de Langerhans) lors de processus immunologiques et inflammatoires. Sa structure est scindée en quatre parties :

- la membrane basale des kératinocytes de la lame basale et les hémidesmosomes

- la lamina lucida, traversée par des filaments d'ancrage

- la lamina densa

- la zone fibrillaire sous basale, principalement constituée de fibres d'ancrage.

d. L' hypoderme

L'hypoderme est un tissu conjonctif richement vascularisé et constitué de lobules adipeux séparés par des travées conjonctives. Il est composé principalement d'adipocytes, riches en triglycérides et en acides gras, qui interviennent dans le stockage d'énergie sous forme de graisses. De plus, il contient des fibroblastes, des dendrocytes, des mastocytes ainsi que la partie profonde des annexes épidermiques (glandes sudorales et follicules pileux) et les troncs vasculaires et nerveux. Il joue également un rôle de protection mécanique et thermique.

3.2 Les ultraviolets

3.2.1. Introduction

La plupart des organismes vivants à la surface de la terre sont exposés quotidiennement à la lumière solaire et donc, à ses différents composants. Parmi ceux-ci, les rayons ultraviolets (UV) sont les principaux agents de l'environnement responsables des dommages à l'ADN. Ils sont également fortement impliqués dans le vieillissement (photo-vieillessement) et le cancer de la peau.

Les UV sont classés en trois types en fonction de leur longueur d'onde et donc de leur énergie : les UVC (190-290 nm), les UVB (290-320 nm) et les UVA (320-400 nm). La lumière solaire est elle-même composée de 62,7 % de lumière visible, de 31,9 % d'infrarouges, de 5,1 % d'UVA et de 0,3 % d'UVB. Les UVC sont normalement arrêtés au niveau de la couche d'ozone. Toutefois, étant donné les récentes altérations dont celle-ci fait l'objet, il y a un risque de plus en plus accru que les UVC atteignent la surface terrestre où ils pourraient être responsables d'une incidence accrue des cancers de la peau.

La pénétration des UV dans la peau est inversement proportionnelle à leur énergie. Ainsi, les UVA sont capables de pénétrer jusqu'aux limites du derme

inférieur, les UVB peuvent atteindre le derme supérieur tandis que les UVC sont arrêtés au niveau de l'épiderme (Fuchs J. and Packer L., 1991).

3.2.2. Dommages causés par les UV

a. Dommages directs à l'ADN

Les dommages causés par les rayons UV sont dépendants de leur longueur d'onde. Ainsi, les UVC et les UVB, sont capables d'engendrer des modifications directes de l'ADN. Ils y génèrent principalement des liens covalents entre deux pyrimidines adjacentes et forment ainsi deux produits principaux : les dimères pyrimidine cyclobutane et les photo-produits pyrimidine(6-4)pyrimidone (Mitchell D., 1988) (Fig. 18). L'isomère dit de Dewar de ces derniers est préférentiellement formé suite à une exposition aux UVB. Il a été montré que la production de dimères pyrimidine cyclobutane est de 5 à 10 fois supérieure aux (6-4)photo-produits et que celle-ci est estimée à 100.000 dimères pyrimidine cyclobutane par cellule basale de l'épiderme formés suite à 1 heure d'exposition solaire à midi à Kobe (34°N, Japon) (Eveno E. *et al.*, 1995, Ichihashi M. *et al.*, 1998). Ces différents types de dimères de pyrimidine inhibent la réplication de l'ADN, sont cytotoxiques et mutagènes. Parmi les dimères pyrimidine cyclobutane, les dimères thymine-cytosine (TC) et cytosine-cytosine (CC) sont les plus mutagènes puisque les mutations TC→TT et CC→TT sont fréquemment retrouvées dans le gène p53 des cancers induits par les UV (Daya-Grosjean L. *et al.*, 1995).

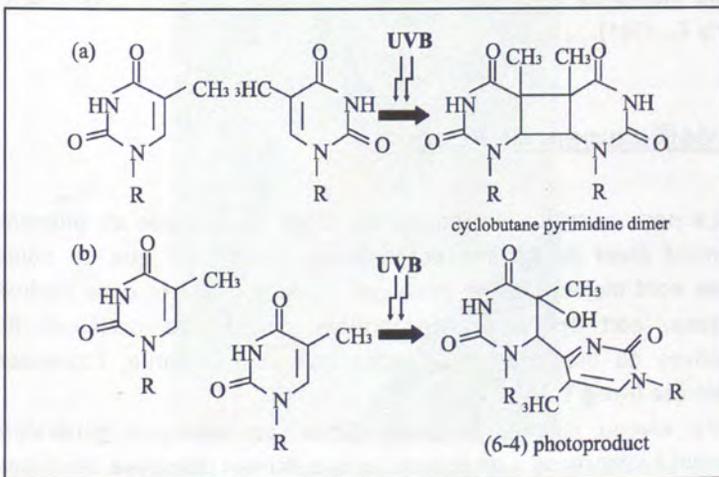


Fig. 18 : Liaison entre deux pyrimidines adjacentes suite à une exposition aux UVB. Les UVB sont capables de générer une liaison entre deux pyrimidines adjacentes formant ainsi des dimères de pyrimidine cyclobutane (a) et des photoproduits pyrimidine (6-4) pyrimidone (b) (Ichihashi M. *et al.*, 2003).

b. Réactions de photosensibilité

Les UVA et les UVB sont capables de faire entrer des molécules photosensibles dans un état excité. Ces molécules vont alors réagir avec différents composés cellulaires. On distingue deux types de réaction en fonction de la molécule photosensible :

- **la réaction de type I** : la molécule photosensible réagit directement avec une molécule substrat via un transfert d'électron ou d'hydrogène.
- **la réaction de type II** : la molécule photosensible réagit avec l'oxygène et va ainsi générer la formation des différents radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) qui vont engendrer des dommages aux différents composants cellulaires. Les principaux dommages causés par ces ROS sont la peroxidation lipidique ainsi que des modifications des bases de l'ADN avec la formation de 8-oxo-7,8-dihydroguanine, de thymine glycol et de 5-hydroxyméthyluracil (Fuchs J. and Packer L., 1991).

Les principales molécules photosensibles endogènes sont le NADH, les quinones, les flavines, les porphyrines, le 7-déhydrocholestérol, l'acide urocanique et la mélanine (Trautinger F., 2001 ; Fuchs J. and Packer L., 1991).

Notons que ce type de réaction est utilisée en photochimiothérapie via l'utilisation conjointe d'un médicament et d'une irradiation à la lumière visible ou aux UV. Ainsi, le 8-méthoxypsoralène est utilisé avec succès avec des irradiations aux UVA (pUVA thérapie) dans le traitement du psoriasis et du vitiligo (Joshi P. and Pathak M., 1984). L'hématoporphyrine est quant à elle utilisée avec des irradiations de lumière visible ou d'UVA dans le traitement de tumeurs cutanées malignes (Dougherty T., 1981).

3.3. Le vieillissement de la peau

La peau constitue un modèle de choix pour l'étude du phénomène de vieillissement étant donné son accessibilité. C'est ainsi que de nombreuses recherches sont menées sur la peau qui, outre son intérêt dans l'industrie des cosmétiques, sert également de modèle d'étude de certaines maladies dégénératives du tissu conjonctif telles que l'ostéoartrite, l'ostéoporose et l'artériosclérose (Krieg T. *et al.*, 1988).

Au niveau clinique et histologique, on distingue généralement le vieillissement « intrinsèque » de la peau, principalement déterminé génétiquement et le vieillissement « extrinsèque » de la peau, résultant de l'impact de l'environnement, et principalement du rayonnement ultraviolet et de ce fait également désigné « photo-vieillescence » (Jenkins G., 2002). Les deux types de vieillissement sont

observables chez un même individu sur des parties de peau plus ou moins exposées aux UV (pour une revue, Wlaschek M. *et al.*, 2001) (Fig. 19, Fig. 20).

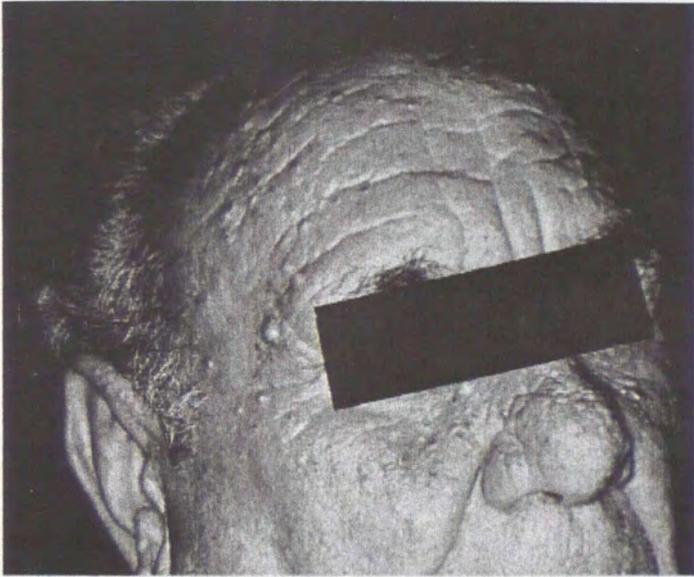


Fig. 19 : Peau présentant un phénotype typique de vieillissement extrinsèque résultant d'une exposition chronique au rayonnement solaire (Wlaschek M. *et al.*, 2001).

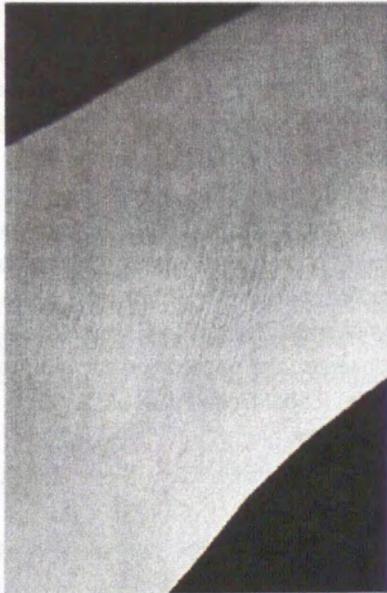


Fig. 20 : Peau présentant un phénotype typique de vieillissement intrinsèque (Scharffetter-Kochanek K. *et al.*, 2000).

3.3.1. Aspect clinique

Cliniquement, la peau ayant subi un vieillissement intrinsèque est fine, lisse et manque d'élasticité. Une peau ayant subi un vieillissement extrinsèque est quant à elle plus épaisse (aspect tanné), profondément ridée et pigmentée de façon irrégulière.

Différents sous-phénotypes sont associés à ces deux catégories principales en fonction de l'aspect plus ou moins marqué de ces différents critères (Waschek M. *et al*, 2001).

3.3.2. Aspect histologique

D'un point de vue histologique, ces deux types de vieillissement présentent une série de différences (Fig. 21).

Une peau ayant vieilli de façon intrinsèque présente une atrophie avec un affinement du derme et de l'épiderme. On observe également une diminution des composants structurels de la matrice extracellulaire du derme tels que le collagène et l'élastine, ainsi qu'une réorganisation des fibres de collagène. Il y a une réduction du nombre de fibroblastes et on voit apparaître des fibroblastes présentant une morphologie sénescence (Dimri G. *et al.*, 1995).

Une peau ayant subi un vieillissement extrinsèque présente quant à elle un épaissement de la couche cornée, de l'épiderme et du derme. Au niveau de l'épiderme, on voit apparaître des kératinocytes atypiques ainsi qu'une distribution hétérogène des mélanocytes, ce qui explique la pigmentation hétérogène de la peau. Mais c'est principalement au niveau du derme que l'on rencontre le plus de modifications. En effet, on y trouve une accumulation de matériel dit « élastostatique » provenant d'une réorganisation de l'élastine, de la fibrilline, de protéoglycane et de l'acide hyaluronique, ce qui entraîne des perturbations fonctionnelles de ces composants (Bernstein E. and Uitto J., 1996). Dans certains cas, on peut également observer une pénétration de neutrophiles résultant d'un état inflammatoire (héliodermatite) (Labat-Robert J. *et al.*, 2000).

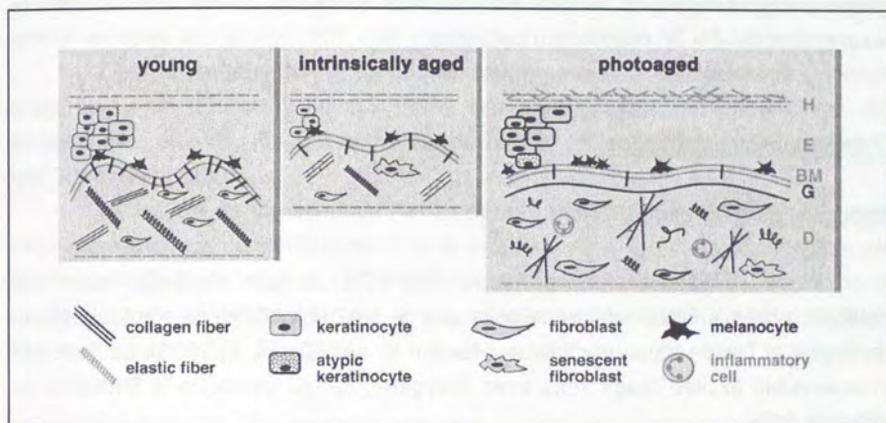


Fig. 21 : Représentations schématiques des caractéristiques histologiques des peaux jeunes, ayant subi un vieillissement intrinsèque ou extrinsèque. Une peau ayant vieilli de façon intrinsèque présente une atrophie avec un affinement du derme et de l'épiderme. On observe également une diminution des composants structurels de la matrice extracellulaire du derme et une réorganisation des fibres de collagène. On observe des fibroblastes présentant une morphologie sénescence. Une peau ayant subi un vieillissement extrinsèque présente un épaississement de la couche cornée, de l'épiderme et du derme. Au niveau de l'épiderme, on voit apparaître des kératinocytes atypiques ainsi qu'une distribution hétérogène des mélanocytes. Au niveau du derme, il y a des modifications de l'organisation des fibres de collagène et des fibres élastiques. On peut également observer une pénétration de neutrophiles (Wlaschek M. et al., 2001).

3.3.3. Aspect moléculaire

Au niveau moléculaire, il existe beaucoup de concordances entre les mécanismes mis en jeu dans les deux types de vieillissement de la peau. Ainsi, on retrouve plusieurs caractéristiques communes amenant à une activation des métalloprotéinases, une diminution de la synthèse de procollagène et des dommages du tissu conjonctif. Le « photo-vieillessement » se surimposerait donc au vieillissement « chronologique » de la peau et en accélérerait le processus (Ritté L. and Fisher G., 2002).

a. Vieillessement intrinsèque

Le processus de vieillissement intrinsèque de la peau est semblable à celui des autres organes impliquant une lente détérioration de la fonction du tissu. On a remarqué chez les fibroblastes sénescents du derme une expression accrue des MMP-1 et MMP-3 et une diminution de l'expression des TIMP-1 et TIMP-3 (Millis A. et al., 1992). Enfin, la biosynthèse du collagène et de l'élastine diminue dans la peau d'individus âgés (Uitto J., 1989).

Ces différents changements provoqueraient un déséquilibre de la balance synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire du derme, ce qui contribuerait à la désorganisation et à la réduction du collagène.

b. Vieillessement extrinsèque

Production de ROS par les UV

Les UV génèrent une production de ROS via leur interaction avec une molécule photosensible endogène telle que le NADH/NADPH, le tryptophane, la riboflavine et l'acide trans-urocanique (Hanson K. and Simon J., 1998). La molécule photosensible excitée réagit alors avec l'oxygène, ce qui provoque la formation de différents ROS.

Des preuves indirectes ont démontré que l'oxygène singulet et l' H_2O_2 étaient les principaux ROS induits par le rayonnement UVA et provoqueraient la surexpression au niveau de l'ARNm et au niveau protéique des MMP-1, MMP-2 et MMP-3 (Herrmann G. *et al.*, 1996; Wenk J. *et al.*, 1999; Scharfetter K. *et al.*, 1993). Le radical hydroxyl intervient quant à lui dans la surexpression des MMP-1 et MMP-3 suite à une exposition aux UVB (Brenneisen P. *et al.*, 1998). Enfin, l'oxygène singulet généré par les UVA activerait la voie des MAPK JNK et p38 (Klotz L. *et al.*, 1999). Ces différents ROS sont capables d'activer différentes protéines telles que Raf, les protéines tyrosines phosphates (PTPs) et MEKK1 (Rittié L. and Fisher G., 2002).

Transduction du signal induite par les UV.

Les UV génèrent une série d'activation de différentes voies de transduction du signal qui peut être résumée comme suit.

Tout d'abord, les UV sont capables d'activer des récepteurs de la surface cellulaire de facteurs de croissance et de cytokines. Parmi ceux-ci, il y a l'EGF-R (Epidermal Growth Factor-Receptor) (Rosette C. and Karin M., 1996), le $TNF\alpha$ -R (Tumor Necrosis Factor α -Receptor) (Dy L. *et al.*, 1999), l'IL-1 R (InterLeukin-1 Receptor) (Rosette C. and Karin M., 1996) et le PDGF-R (Platelet Derived Growth Factor-Receptor) (Knebel A. *et al.*, 1996). Rosette et Karin (1996) ont montré que l'activation des récepteurs de l'EGF, de l'IL-1 et du $TNF\alpha$ par les UV résultait d'un regroupement (clustering) des récepteurs en surface et en une internalisation de ceux-ci.

Une fois les récepteurs activés, il y a un recrutement de petites protéines adaptatrices (GTP-binding small proteins) Ras, Rac et cdc42. Ces petites protéines sont des régulateurs importants de la voie des MAPK ERK, JNK et p38 (Pawson T. and Scott J., 1997).

Ras recrute la kinase Raf-1 qui active la voie des MAPK ERK (Leevers S. *et al.*, 1994). Rac-1 est un constituant de la NADPH oxydase qui va engendrer une production de ROS et principalement d'anions superoxydes qui vont activer les

différentes voies des MAPK (Fisher G. and Voorhees J., 1998). Enfin, cdc42 mais aussi Rac-1 peuvent se lier aux séquences régulatrices de MEKK-1 qui va ensuite activer les voies des MAPK ERK, JNK et p38 (Xu S. and Cobb M., 1997).

L'activation des JNK et de p38 va ensuite mener à l'activation de protéines telles que c-jun (Fisher G. *et al.*, 1998), provoquant ainsi une dimérisation des facteurs c-fos et c-jun et à une activation du facteur de transcription AP-1 (Fisher G. and Voorhees J., 1998).

Le facteur de transcription AP-1 apparaît particulièrement intéressant dans cette problématique de vieillissement de la peau car AP-1 régule la transcription des MMP-1, MMP-3 et MMP-9 (Fisher G. and Voorhees J., 1998) et inhibe la transcription de gènes codant pour le procollagène de type I, COL1A1 et COL1A2 (Chung K. *et al.*, 1996) (Fig. 22).

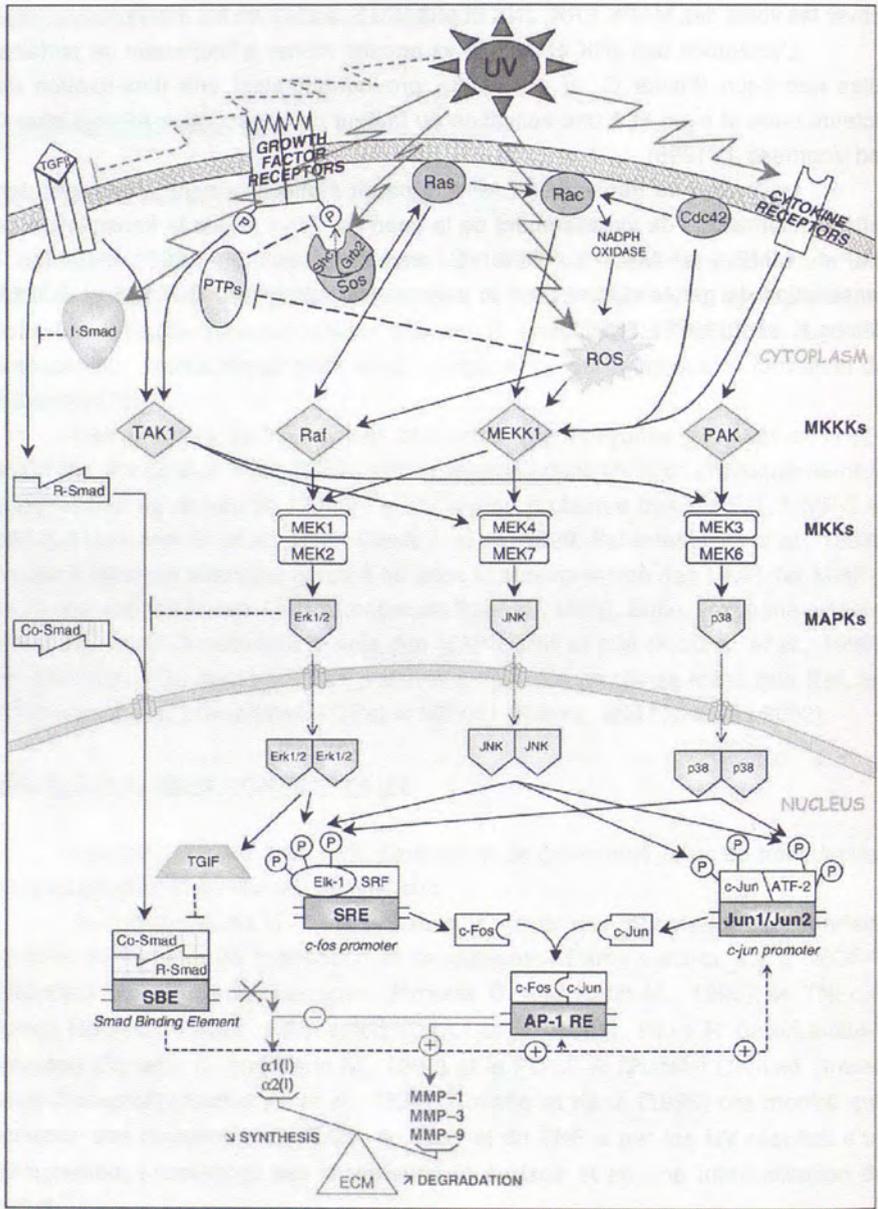


Fig. 22 : Illustration des voies de transduction du signal activées par une exposition aux UV (Rittié L. and Fisher G., 2002).

But du travail

BUT DU TRAVAIL ET CONTEXTE

In vitro, les cellules somatiques prolifératives, dont les fibroblastes, ont une capacité proliférative limitée. Ceci se marque par un arrêt progressif des divisions cellulaires conduisant à un blocage irréversible du cycle cellulaire dû à un raccourcissement critique des télomères. Ce phénomène est appelé sénescence réplivative. Outre cet arrêt irréversible de la prolifération, les fibroblastes sénescents possèdent d'autres caractéristiques. Par exemple, on retrouve des changements morphologiques typiques, une activité enzymatique β -galactosidase associée à la sénescence (SA β -gal), la surexpression de divers gènes (*apolipoprotéine J*, *fibronectine*, *ostéonectine*, etc.) ainsi qu'une délétion de 4.977 pb dans l'ADN mitochondrial. Depuis, il a été montré que de nombreux types cellulaires prolifératifs entraînent en sénescence réplivative excepté les cellules germinales et les cellules tumorales.

La sénescence réplivative peut être induite de façon prématurée et irréversible par différents types de stress *in vitro*, ceci a été décrit comme la Sénescence Induite Prématurément par des Stress ou SIPS. Les différents agents stressants engendrant la SIPS sont entre autres le peroxyde d'hydrogène, le *tert*-butylhydroperoxyde, l'éthanol, les rayons γ , l'hyperoxie continue, etc.

Lors de notre thèse, nous avons souhaité mettre au point un nouveau modèle de SIPS généré cette fois par un stress susceptible d'être rencontré *in vivo* par la cellule. La peau constitue un modèle de choix pour les études menées sur le vieillissement. En effet, il semble que les mécanismes intervenants dans le vieillissement de la peau sont assez représentatifs et peuvent servir de modèle au vieillissement d'autres organes (Wlaschek M. *et al.*, 2003). De plus, la peau connaît deux types de vieillissement se distinguant par leur origine. On distingue ainsi le vieillissement intrinsèque, principalement déterminé génétiquement, et le vieillissement extrinsèque, résultant de l'impact de l'environnement et principalement des rayons ultraviolets (et de ce fait, appelé « photo-vieillissement ») (pour une revue, Scharffetter-Kochanek K. *et al.*, 2000). La peau est particulièrement soumise aux dommages oxydatifs. Ceux-ci peuvent être générés par des sources exogènes, telles que la pollution, l'ozone ou les rayons ultraviolets (UVA ou UVB). Ils peuvent également être produits par des sources endogènes lors du processus d'inflammation via l'activation des neutrophiles. Malgré le nombre important de travaux réalisés sur la peau et sur les stress oxydatifs, très peu d'études sont menées *in vitro* sur l'étude des effets à long terme de ces stress sur le vieillissement de la peau.

Lors de notre thèse, nous avons étudié les effets à long terme du rayonnement UV comme modèle afin de mimer et d'étudier le photo-vieillissement de la peau. Nous avons choisi d'étudier les effets du rayonnement UV de type B (UVB). Les UVB pénètrent dans la peau et sont capables d'atteindre le derme supérieur (Rosette C. and Karin M., 1996) où ils engendrent une série de dommages

cellulaires par l'interaction de deux types de réaction, d'une part un stress oxydatif et d'autre part des dommages ionisants directs à l'ADN (pour une revue, Ichiashi M. *et al.*, 2003). L'étude de la réponse des fibroblastes à ces stress est particulièrement intéressante dans un contexte d'étude de vieillissement car on sait à quel point le rôle joué par ceux-ci dans le vieillissement *in vivo* de la peau est important, notamment de part leur implication dans l'équilibre synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire (Rittié L. and Fisher G., 2002).

Dans ce travail, nous proposons de mettre au point un modèle de SIPS induite par les UVB chez des FHDs de derme. Une étude de la cytotoxicité des doses d'UVB employées sera effectuée afin de réaliser des stress d'UVB à des doses n'engendrant pas de mort cellulaire (doses subcytotoxiques). Afin de nous rapprocher des conditions physiologiques *in vivo*, nous effectuerons des stress répétés et nous envisageons de réaliser des nombres croissants de stress afin d'obtenir l'effet le plus marqué sur les biomarqueurs de la sénescence.

En ce qui concerne les différents biomarqueurs de la sénescence, nous étudierons principalement ceux qui ont été décrits pour être activés chez les FHDs de poumon WI-38 sénescents ou en SIPS induite par le *t*-BHP ou l' H_2O_2 (Dumont P. *et al.*, 2000). Ainsi, nous nous focaliserons sur l'activité SA β -gal, la diminution des capacités prolifératives (via l'étude de l'incorporation de [3 H]-thymidine dans l'ADN et du niveau d'expression de p53, p21^{WAF-1} et p16^{INK-4A}), l'étude du niveau d'expression de gènes associés à la sénescence (*apolipoprotéine J (apo J)*, *fibronectine*, *ostéonectine*, *SM22* etc.) ainsi que la délétion de 4.977 pb dite « commune » de l'ADN mitochondrial.

Une fois ces étapes effectuées, nous pousserons plus loin nos investigations et nous étudierons les mécanismes moléculaires intervenants dans l'apparition des biomarqueurs. Au cours de notre travail, Fripiat *et al.* (2001) ont montré que le TGF- β 1 était impliqué dans l'apparition des différents biomarqueurs de la sénescence chez les FHDs de poumon IMR-90 en SIPS induite par l' H_2O_2 . Nous étudierons donc si le TGF- β 1 est également impliqué dans la SIPS induite par les UVB d'une part en stimulant les FHDs de derme avec des doses croissantes de TGF- β 1 et d'autre part en bloquant la voie dépendante du TGF- β 1 chez les FHDs de derme en SIPS induite par les UVB.

Enfin, on pourra envisager des études fonctionnelles en se basant sur ce nouveau modèle. Dumont *et al.* (2002) ont montré que l'*apo J* de chien (gp80) protégeait de la cytotoxicité et de la SIPS induite par le *t*-BHP ou l'éthanol. Etant donné que la séquence humaine de l'*apo J* est disponible, nous pourrions tester l'effet de la transfection de l'*apo J* humaine sur la cytotoxicité de doses élevées d'UVB et sur l'apparition des différents biomarqueurs de la sénescence induits suite à la SIPS sous UVB.

Au début de ce travail, notre but était de mettre au point un modèle de SIPS induite par les UVB nous permettant de réaliser des études mécanistiques et fonctionnelles. Nous vous invitons maintenant à lire les résultats que nous avons obtenus.

Résultats

ARTICLE I : UVB-induced premature senescence **of human diploid skin fibroblasts** (The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2002, 34, 1331-1339)

Les cellules humaines sont constamment soumises à des stress oxydatifs *in vivo*, dont l'origine diffère en fonction de leur localisation. Ainsi, par exemple, les pneumocytes sont exposés aux radicaux libres générés par la pollution et par la fumée de tabac. Les cellules endothéliales doivent faire face à l'hypertension, aux LDL oxydés, à l'inflammation due au processus d'ischémie/reperfusion, aux infections. Les kératinocytes, les mélanocytes et les fibroblastes du derme sont exposés au rayonnement ultraviolet produisant des radicaux libres, etc. Il a été montré par différents laboratoires, que l'exposition de divers types cellulaires prolifératifs à des doses subcytotoxiques d'agents oxydatifs induisait une sénescence prématurée des cellules ou SIPS (Sénescence Induite Prématurément par des Stress). Ceci a été démontré chez les fibroblastes, les mélanocytes, les cellules endothéliales soumises à des doses subcytotoxiques d'agents stressants tels que le peroxyde d'hydrogène (Chen Q.M. *et al.*, 1998), le *tert*-butylhydroperoxyde (Dumont P. *et al.*, 2000), etc. Ces modèles sont particulièrement intéressants puisqu'on pense actuellement que la SIPS pourrait exister *in vivo*, et plus particulièrement à des sites d'inflammation particulièrement soumis à des stress tels que les ulcères, l'hypertension et les reflux veineux ou également l'ostéoarthritis (Toussaint O. *et al.*, 2003).

Lors de notre thèse, nous avons souhaité mettre au point un nouveau modèle de SIPS généré cette fois par un stress susceptible d'être rencontré *in vivo* par la cellule, ce qui nous permettrait, à une plus longue échéance dépassant l'objectif de notre travail, d'étudier si les éléments que nous mettrons en évidence comme étant spécifiques à la SIPS sont présents lors du vieillissement *in vivo*. La peau constitue un modèle de choix pour les études menées sur le vieillissement. En effet, les recherches menées sur la peau, de part son accessibilité, ne nécessitent pas l'utilisation de techniques invasives. De plus, il semble que les mécanismes intervenants dans le vieillissement de la peau sont assez représentatifs et peuvent servir de modèle au vieillissement d'autres organes tels, entre autres, que le système cardio-vasculaire, les os et le cerveau (Wlaschek M. *et al.*, 2003).

La peau est particulièrement soumise aux dommages oxydatifs. Ceux-ci peuvent être générés par des sources exogènes, telles que la pollution, l'ozone ou les rayons ultraviolets, qu'ils soient de type A (UVA) ou de type B (UVB) (Kohen R. and Gati I., 2000). Ils peuvent également être produits par des sources endogènes lors du processus d'inflammation via l'activation des neutrophiles (Ginsburg I. and Kohen R., 1995). Malgré le nombre important de travaux réalisés sur la peau et sur les stress oxydatifs, très peu d'études sont menées sur l'étude de l'effet à long terme de ces stress sur le vieillissement de la peau.

Lors de notre thèse, nous avons voulu étudier les effets à long terme du rayonnement UV comme modèle afin de mimer et d'étudier le photo-vieillessement de la peau. Nous avons choisi d'étudier les effets du rayonnement UV de type B (UVB) car celui-ci, bien que ne représentant que 2 % du rayonnement solaire touchant la surface de la terre, est impliqué dans plus de 95 % des dommages causés par l'exposition solaire (Rosette C. and Karin M., 1996). Etant donné que la longueur d'onde des UVB est située entre 290 et 320 nm, les UVB sont capables d'engendrer des dommages directs à l'ADN tels que les photo-produits pyrimidine(6-4)pyrimidone et les dimères de pyrimidines cyclobutane. De plus, tout comme les UVA, ils peuvent générer des stress oxydatifs via l'interaction avec des chromophores intracellulaires, ce qui va engendrer des dommages génétiques et l'activation de voies de transduction du signal liées à la croissance, à la différenciation, à la sénescence répliquative ou à la dégradation du tissu conjonctif.

Dans cet article, nous relatons les premières mises au point de nos modèles. Notre objectif était de réaliser des stress UVB à des doses subcytotoxiques et d'étudier si ceux-ci induisaient une apparition prématurée à long terme après les stress, c'est-à-dire à 72 heures après le dernier stress, de biomarqueurs de la sénescence cellulaire. Nous avons tout d'abord recherché les doses subcytotoxiques maximales n'engendrant pas de mort cellulaire après 3 ou 5 stress UVB. Pour cela, nous avons réalisé un dosage des protéines au Folin, utilisé en routine au laboratoire, puisque nous avons montré suite à des expériences préliminaires que ce test donnait des résultats comparables à d'autres tests classiques permettant de déterminer la mortalité cellulaire tels que le test MTT (Fig. 23) ou le test LDH.

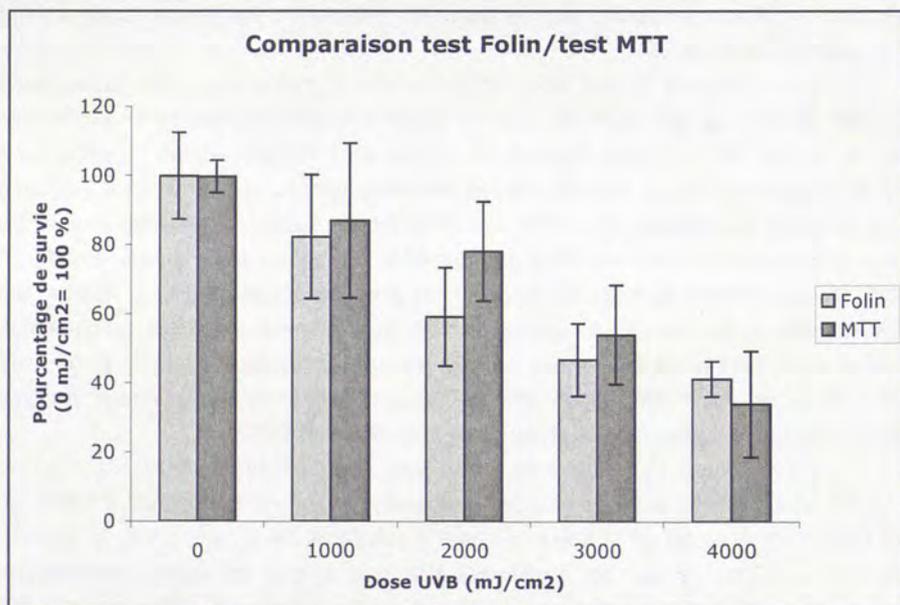


Fig. 23 : Comparaison entre le test de dosage des protéines (test Folin) et le test MTT sur la survie cellulaire des fibroblastes AGO4431 après un stress à des doses croissantes d'UVB.

Il s'est avéré que les doses de 625 mJ/cm² et de 500 mJ/cm² étaient les doses maximales d'UVB n'engendrant aucune mortalité cellulaire à raison de respectivement 3 ou 5 stress répétés. Nous avons ensuite montré que l'exposition de FHDs de derme à 3 stress de 625 mJ/cm² ou à 5 stress de 500 mJ/cm² d'UVB provoquaient l'apparition prématurée des différents biomarqueurs principaux de la sénescence : l'apparition d'une activité SA β -gal, une diminution des capacités prolifératives et la surexpression de gènes associés à la sénescence cellulaire (*fibronectine*, *ostéonectine* et *SM22*).



UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts

Florence Chainiaux, Joao-Pedro Magalhaes, François Eliaers, José Remacle, Olivier Toussaint*

Laboratory of Cellular Biochemistry and Biology, Department of Biology, University of Namur (FUNDP), Rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur, Belgium

Received 6 December 2001; received in revised form 20 January 2002; accepted 30 January 2002

Abstract

In this work, we show that repeated stresses with UVB (290–320 nm) induce stress-induced premature senescence (SIPS) of skin human diploid fibroblasts (HDFs). HDFs at early cumulative population doublings were exposed three or five times to increasing subcytotoxic doses of UVB with one stress per day. After 2 days of recovery, several biomarkers of replicative senescence were established. First, there was an increase in the proportion of cells positive for senescence-associated β -galactosidase activity. Second, there was a loss of replicative potential as assessed by a very low level of [³H]-thymidine incorporation. Third, the steady-state level of the mRNA of three senescence-associated genes, i.e. fibronectin, osteonectin and SM22, was increased in HDFs at 72 h after three and five exposures to UVB. In conclusion, these results suggest that it is possible to induce SIPS in HDFs after repeated exposures to subcytotoxic doses of UVB. This model could be used to test whether HDFs in UVB-induced premature senescence are able to promote epithelial cell growth and tumorigenesis in skin, as shown recently with HDFs in H₂O₂-induced premature senescence.

© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: UVB; Stress-induced premature senescence; Fibroblasts; Tumorigenesis

1. Introduction

Senescence of replicative cells can be defined as irreversible growth arrest (replicative senescence) due either to telomere shortening linked with the DNA end-replication problem, overexpression of certain oncogenes or tumor suppressors, or stress-induced premature senescence (SIPS) after exposure to a variety of oxidative stresses and DNA damaging agents (for a review, see [1]). Examples of biomark-

ers of senescence of normal human diploid fibroblasts (HDFs) which appear at a long term after exposure to conditions like *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP), H₂O₂, hyperoxia, mitomycin C, hydroxyurea, 5-bromodeoxyuridine include senescence-like morphology, decrease in the maximum number of *in vitro* cumulative population doublings (CPDs), irreversible growth arrest in G1, senescence-associated β -galactosidase activity (SA β -gal), accelerated telomeres shortening, lipofuscin accumulation and change in expression level of many genes (for a review, see [2]).

Skin is exposed to UVB and UVA. UVB (290–320 nm) and UVA (320–400 nm) are essential components

* Corresponding author. Tel.: +32-81-724132;

fax: +32-81-724135.

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

of sunlight that generate severe oxidative stress in the skin. UVB crosses the epidermis and reaches the upper dermis [3]. The UVB interact with cellular chromophores and photosensitizers, resulting in the generation of reactive oxygen species (ROS), DNA damage (e.g. pyrimidine dimers) and activation of cytoplasmic signal transduction pathways that are related to growth, differentiation, replicative senescence and connective tissue degradation [4]. The biological responses to UV can be immediate and transient (inflammation, sunburn cell formation, pruritus) or delayed and chronic (photoaging, immunosuppression, photocarcinogenesis) [5].

The aim of this study was to develop a model of UVB-induced premature senescence using subcytotoxic doses of UVB. We show that repeated exposure of skin HDFs to subcytotoxic doses of UVB lead to the long-term appearance of several biomarkers of senescence such as senescence associated β -galactosidase activity, a sharp decrease in the DNA synthesis capability and overexpression of several genes known to be overexpressed in senescent HDFs.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

AG04431 skin HDFs were obtained from the Coriell Institute for Medical Research (USA). HDFs were routinely cultivated in 75 cm² flasks (Cel Cult, UK) containing 15 ml of basal medium eagle (BME) (Gibco-BRL, UK) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Flow Laboratories, UK) and 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. Cultures were grown at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. When confluent, cells were subcultivated until they reached irreversible growth arrest, that is replicative senescence, as previously described [6].

2.2. UVB light exposure

Cultures of HDFs at early CPDs were submitted to repeated UVB stress. HDFs were washed once with PBS and exposed to UVB radiation in a thin layer of phosphate buffer saline pH 7.4, 10 mM phosphate (PBS) using three Philips TL 20W/01 lamps (Philips,

The Netherlands) at day 3 after subcultivation at 10,000 cells/cm², which represented half-confluence. These lamps emit mainly UVB, peaking at 311 nm. Radiation was carried out at room temperature at a target distance of 30 cm. The emitted radiation was checked using a UVR-radiometer with a UVB-sensor (Bioblock Scientific, Belgium). After radiation, the PBS was replaced with BME containing 1% FCS in order not to interfere with the LDH cytotoxicity assays which were achieved preliminarily to the protein assay and cell counting. Control samples were submitted to the same conditions without UVB illumination. HDFs were submitted to a repeated subcytotoxic exposure to UVB stress with one stress per day for 3 or 5 days.

2.3. Cytotoxicity assays

At 48 h after the last stress, cells were washed twice with PBS and lysed with NaOH 0.5 N. The protein content of the samples was assayed by the Folin method described by Lowry et al. [7]. Triplicates were always performed. The results are expressed as mean \pm S.D.

2.4. Senescence-associated β -galactosidase (SA β -gal) activity

At 48 h after the last stress, cells were trypsinised and seeded in squared 35 mm culture dishes (Falcon, UK) containing 2 ml of BME and 1% FCS at a density of 700 cells per cm². At 24 h after, SA β -gal activity was determined as described by Dimri et al. [8]. The population of SA β -gal positive cells was determined by counting 400 cells per dish. The proportions of cells positive for SA β -gal activity are given as percentage of the total number of cells counted in each dish. Triplicates were always performed. The results are expressed as mean \pm S.D.

2.5. Measurement of DNA synthesis

At 24 h after the last stress, cells were seeded in 24 well plates (Cel Cult, UK) at a density of 10,000 cells/well. A 1 μ Ci [³H]-thymidine (specific activity: 2 Ci/mmol, Du Pont NEN, USA) was added to BME + 1% FCS for 48 h. Cells were washed twice with PBS, fixed 5 min with trichloroacetic acid (TCA), washed once with 70% ethanol and once with PBS.

Table 1
Primers used for semi-quantitative RT-PCR

Gene	Position (bp)	Sequence
Fibronectin	4834–4856	5'-ggc att cac tga tgt gga tgt cg-3'
	5247–5269	5'-cat aag tcc tga tac aac cae gg-3'
Osteonectin	63–84	5'-ggc ctg gat ctt ctt cct t-3'
	412–434	5'-aag aag tgg cag gaa gag tgc aa-3'
SM22	249–266	5'-tgg cgt gat tet gag caa-3'
	470–487	5'-ctg cca agc tgc cca agg-3'
23 kDa HBP	280–300	5'-tgc ccc aca aaa cca agc gag-3'
	614–634	5'-tgg get gag acc agg agt ccc-3'

NaOH 0.5 N was added for 30 min and neutralized by HCl 0.5 N. The incorporated radioactivity was quantified by a scintillation counter (Beckman Coulter Inc., USA). Triplicates were always performed. The results are expressed as mean \pm S.D.

2.6. Semi-quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted (total RNA extraction kit, Promega, USA) 72 h after the last stress. Semi-quantitative RT-PCRs were achieved in the exponential linear zone of amplification for each gene studied in one step (access RT-PCR kit, Promega, USA). In presence of [α^{32} P] dideoxycytosine (0.025 μ Ci per reaction). RT-PCR were performed using 50 ng RNA, 5 U AMV reverse transcriptase, 5 U Teflon polymerase, 200 μ M dNTPs, 1 mM MgSO₄ and 50 pmol of each primer. The primers are listed in Table 1. After a reverse transcription step of 45 min at 48 °C, the following PCR cycles were used: denaturation, 94 °C, 30 s; annealing, 60 °C, 30 s (except for SM22: 53 °C, 30 s); elongation, 68 °C, 30 s. The number of cycles necessary to be in the exponential zone of the PCR was determined and was 20 cycles for fibronectin, 24 cycles for osteonectin and SM22 and 22 cycles for 23 kDa Highly Basic Protein (23 kDa HBP). A 23 kDa HBP mRNA level was used as reference after it was checked it was stable in our conditions. RT-PCR products were electrophoresed on a 5% (w/v) polyacrylamide gel and analyzed with an instant imager (Hewlett-Packard, USA). The dried gels were exposed to MP films (Amersham, Belgium). Negative controls were performed without RNA. Triplicates were always performed. The results are expressed as mean \pm S.D.

3. Results

3.1. Cytotoxicity after UV irradiation

To select the conditions of subcytotoxic stress, cytotoxicity induced by UVB irradiation was measured at 48 h after three or five repeated exposures to UVB doses ranging from 500 to 1000 mJ/cm² (Fig. 1). Cytotoxicity appeared at doses equal to or higher than 750 mJ/cm² after three stresses and at doses equal to or higher than 625 mJ/cm² after five stresses. Therefore the subcytotoxic doses used throughout this study were 625 mJ/cm² for three repeated stresses and 500 mJ/cm² for five repeated stresses.

3.2. Effect of subcytotoxic UVB stresses on the proportion of cells positive for SA β -gal activity

SA β -gal activity was described by Dimri et al. [8]. It was shown to be a reliable biomarker of long-term growth arrest [9]. In our study, the percentage of cells positive for SA β -gal activity increased with the CPDs. It increased from 10% of positive cells at 56% of their proliferative life span to 53% of positive cells at 90% of their proliferative life span (Fig. 2). An increase in the proportion of the cells positive for SA β -gal activity was detectable in HDFs at 56% of their proliferative life span at 72 h after UVB exposures. This proportion was around 15% at 72 h after three stresses at 625 mJ/cm² and 24% at 72 h after five stresses at 500 mJ/cm².

3.3. Effect of subcytotoxic UVB stresses on the mitotic index

The progressive decrease of the proliferation potential followed by irreversible growth arrest is an important feature of replicative senescence. The level of [3 H]-thymidine incorporation was determined at 72 h after each stress at UVB doses ranging from 375 to 750 mJ/cm² in both stress models (Fig. 3). In UVB-stressed cells, sharp dose-dependent decreases of incorporation were found when compared with control cells at the same CPDs. Moreover the higher number of exposures, the lower incorporation level observed. After three exposures to UVB at 625 mJ/cm², a quasi-null level of incorporation is still observed at 72 h after the last stress. This decrease was

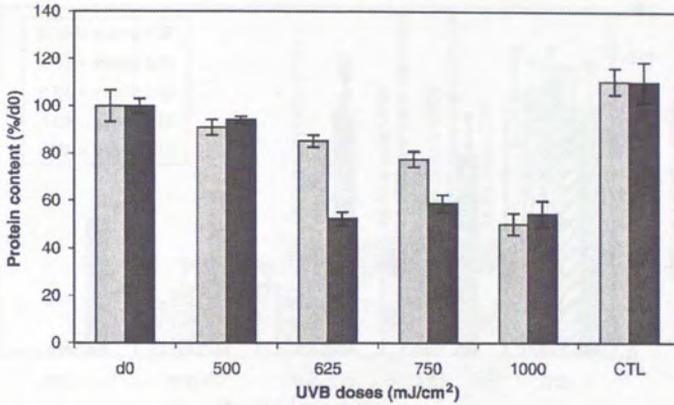


Fig. 1. Cytotoxicity at 48 h after three or five repeated exposures to UVB. Protein content was determined in HDFs at early CPDs (56% of their proliferative life span) to three (grey columns) or five (black columns) repeated UVB stress with one stress per day. Doses ranged from 500 to 1000 mJ/cm². The results are expressed as percentage of the values found at day 0 (d0) before any stress. CTL represents HDFs at early CPDs submitted to the same culture conditions than the stressed cells but without any UVB exposure. The difference between d0 and CTL represented the normal growth of the cells in these conditions. Results are given as mean \pm S.D. from three independent experiments.

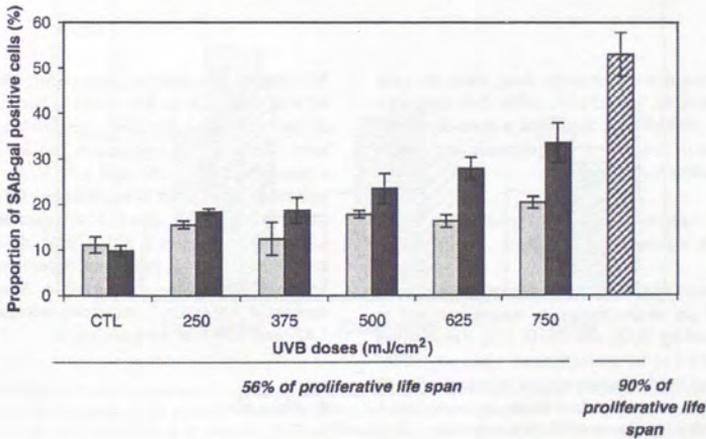


Fig. 2. Effects of repeated UVB stress on the proportion of skin HDFs positive for SA β -gal activity. Fibroblasts at 56% of their proliferative life span were exposed to three (grey columns) or five (black columns) repeated UVB stress. CTL represents the control cells submitted to the same culture conditions than the stressed cells but without any UVB exposure. The proportion of SA β -gal positive cells was also determined for fibroblasts at 90% of their proliferative life span (dashed column). The results are presented as mean \pm S.D. from three independent experiments.

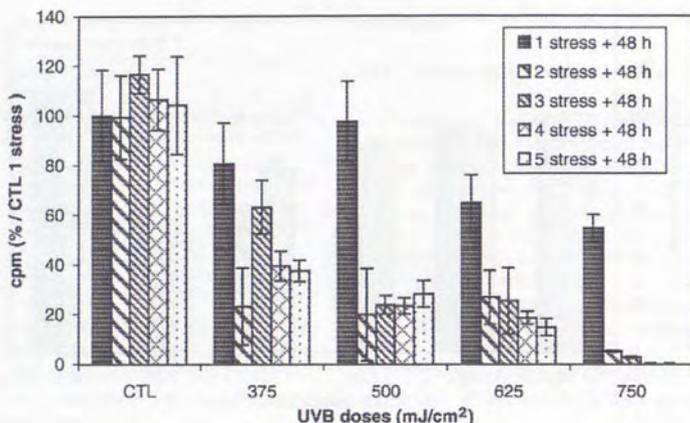


Fig. 3. Estimation of the proliferative potential of skin HDFs repeatedly exposed to UVB by measure of the incorporation of [3 H]-thymidine into DNA between days 3 and 7 after stress. The results obtained after one to five stresses were expressed as percentages of the counts per minute (cpm) incorporated by the control cells, which correspond to cells incubated in the same conditions as the stressed cells but without UVB exposure. Other controls obtained at times corresponding to each of the successive stress gave similar values and are also shown. Doses of UVB from 375 to 750 mJ/cm 2 were used in these experiments. The results represent the mean \pm S.D. from three independent experiments.

sharper above this subcytotoxic dose, when the cells were exposed to 750 mJ/cm 2 . After five exposures to UVB at 500 mJ/cm 2 , there was a dose-dependent and number of stress-dependent dramatic decrease of [3 H]-thymidine incorporation.

3.4. Gene expression 72 h after repeated subcytotoxic exposure to UVB stress

It was found previously that fibronectin, osteonectin and SM22 are overexpressed in senescence and in SIPS induced by H $_2$ O $_2$ and *t*-BHP [10]. These genes are also found to be overexpressed when rat fibroblasts immortalized by a temperature permissive SV-40 T antigen are submitted to heat shock, undergo growth arrest, and display a senescence-like morphology [11]. We studied the steady-state mRNA level of these three genes by semi-quantitative RT-PCR in HDFs at late CPDs (>90% of their proliferative life span) and at 72 h after three subcytotoxic stresses at 625 mJ/cm 2 and after five subcytotoxic stresses at 500 mJ/cm 2 (Fig. 4).

We used the housekeeping gene coding for the 23 kDa HBP as reference. In skin HDFs at late CPDs (>90% of their replicative life span), the steady-state mRNA level of fibronectin, osteonectin and SM22 were increased by 2.04-, 1.30- and 1.72-fold, respectively, compared with HDFs at much earlier CPDs (56% of their replicative life span). After repeated exposures to three UVB stresses at 625 mJ/cm 2 , the steady-state mRNA level of these genes underwent a respective increase of 1.56-, 1.86- and 1.65-fold. After five UVB stresses at 500 mJ/cm 2 , respective increases of 2.33-, 1.85- and 1.30-fold were observed.

4. Discussion

Senescent HDFs, including HDFs in H $_2$ O $_2$ -induced SIPS, promote epithelial cell growth and tumorigenesis [12]. Since UVB crosses the epidermis and reaches the upper dermis, it could be possible that HDFs in UVB-induced premature senescence accumulate

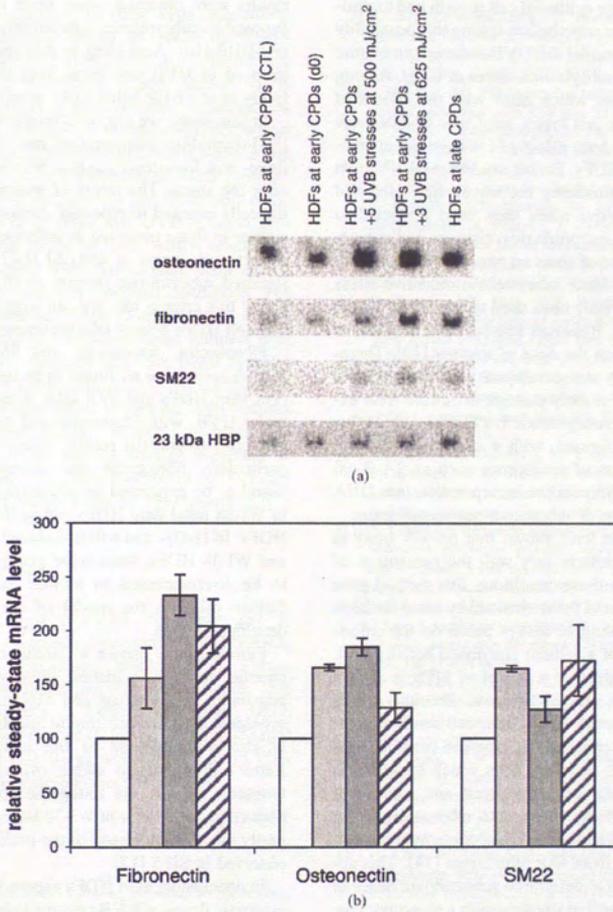


Fig. 4. Steady-state mRNA level of fibronectin, osteonectin and SM22 72 h after three or five repeated subcytotoxic exposures of UVB. (a) Autoradiographs after migration of the products obtained by semi-quantitative RT-PCR performed on fibronectin, osteonectin, and SM22 mRNA with 23 kDa HBP mRNA taken as reference. (b) Quantification of the autoradiographs: HDFs at early CPDs (white columns), HDFs at early CPDs 72 h after three repeated UVB stress at 625 mJ/cm² (grey columns) and five repeated UVB stress at 500 mJ/cm² (black columns), and HDFs at late CPDs (dashed columns). A 23 kDa HBP mRNA steady-state level was used as reference since its level was checked to be stable in all conditions tested. The signal obtained for fibronectin, osteonectin and SM22 in non-stressed HDFs at early CPDs is considered as 100%.

in vivo and promote epithelial cell growth and tumorigenesis. One of the steps before testing this possibility is to develop a model of UVB-induced premature senescence using subcytotoxic doses of UVB. Among the multiple papers which dealt with the effects of UVB on different cell types, very few studies were aimed at the long-term effect of UVB on the appearance of SIPS in HDFs. Earlier studies used UV light but without discriminating the wavelength used and were very descriptive since they were restricted to the description of morphological changes and appearance/disappearance of spots on two-dimensional electrophoreses [13]. Short subcytotoxic oxidative stress protocols have already been used to induce SIPS (for a review, see [2]). Repeated stresses have allowed to decrease very much the dose of stressor [10]. Therefore in this study we developed a model of SIPS where skin HDFs at early passage in culture were exposed to repeated subcytotoxic UVB stress. Up to five stresses were performed, with a stress per day. We considered markers of senescence such as SA β -gal activity, low [3 H]-thymidine incorporation into DNA and overexpression of senescence-associated genes.

Previous studies have shown that protein assay at 48 h after stress reflects very well the percentage of surviving cells. In those conditions, this method gave results very similar to those obtained by other methods such as cell counting or assays based on the colorimetric detection of a cellular enzymatic activity [10]. The first step to develop a model of SIPS is always to find doses that are subcytotoxic. Previous works showed it is necessary to consider cell death 48 h after each repeated subcytotoxic stress to consider total cell death. Indeed, there are cells which apoptosis is triggered within the 24 h after stress and which will detach from the flasks before 48 h after stress. From our experience with other types of stress no more cell starts apoptosing from 48 h after stress [14]. This approach allowed us to determine subcytotoxic doses of UVB after three or five stresses, with a stress per day, these doses being 625 and 500 mJ/cm², respectively.

After three stresses, a significant increase in SA β -gal positive cells was observed at the subcytotoxic dose of 625 mJ/cm². This increase was greater at the higher dose of 750 mJ/cm². After five stresses at a subcytotoxic dose of 500 mJ/cm², the proportion of SA β -gal positive cells doubled. At 750 mJ/cm², this proportion increased by more than three-fold. Similar

results were obtained when fetal lung HDFs were exposed to subcytotoxic concentrations of H₂O₂ [15] or *t*-BHP [10]. According to this criteria, skin HDFs exposed to UVB and fetal lung HDFs exposed to H₂O₂ or to *t*-BHP behave like presenescent cells.

In this study, we also observed a very low level of [3 H]-thymidine incorporation into DNA both in the three- and five-stress models, between days 3 and 7 after the stress. The ratios of incorporation between the cells exposed to repeated stresses or not are very similar to those observed in cells exposed to a single subcytotoxic stress at 450 μ M H₂O₂ [16] or to five repeated subcytotoxic stresses at 30 μ M *t*-BHP [11]. Using this criteria too, we can suggest that the UVB stressed HDFs behave like presenescent cells.

Fibronectin, osteonectin and SM22 steady-state mRNA level were all found to be increased in senescent skin HDFs and 72 h after three or five stresses under UVB, with fibronectin and osteonectin giving the more spectacular results. These three genes, and particularly fibronectin and osteonectin were also found to be expressed in senescent osteoblasts [11], in WI-38 fetal lung HDFs and in IMR-90 fetal lung HDFs. In H₂O₂- and *t*-BHP-induced SIPS of IMR-90 and WI-38 HDFs, these three genes were also found to be overexpressed in similar extents [10]. This further validates the model of UVB-induced SIPS developed herein.

Fibronectin is known to facilitate the cellular anchorage to culture dishes, thereby decreasing the possibility of apoptosis and explaining in part why senescent cells are resistant to apoptosis. Osteonectin is also a component of the extracellular matrix. Retrovirally-mediated stable overexpression of osteonectin reduces the mitogenic effects of platelet-derived growth factor in WI-38 HDFs, which explains partly the sharp decrease of the proliferative potential observed in SIPS [17].

In conclusion, skin HDFs exposed to repeated subcytotoxic doses of UVB present a phenotype of SIPS, which shares many similarities with the fibroblasts obtained in presenescent cultures at 85–90% of their in vitro replicative life span.

Presenescent and senescent HDFs were shown to promote growth and tumorigenesis of preneoplastic and neoplastic epithelial cells, with greater effects obtained in the senescent cells [12]. HDFs in H₂O₂-induced premature senescence also promoted

growth and tumorigenesis of these cells. According to the results obtained herein, it would be worthwhile studying whether skin HDFs in UVB-induced SIPS have similar promoting effects. Indeed, UVB crosses the epidermis, which contains keratinocytes and melanocytes, and reaches the upper dermis, which contains fibroblasts. It would be also worthwhile to test whether skin HDFs in UVB-induced SIPS promote the growth either of melanocytes and melanoma cells.

The next step is to show that UVB-induced premature senescence exists *in vivo*, which would not be surprising. Indeed SIPS has already been shown to exist in many pathophysiological conditions. For instance, HDFs excised from gastric venous ulcers display several features of senescence: reduced proliferative capacity, enlarged size, SA β -gal activity, overexpression of fibronectin [18,19]. HDFs cultured from distal lower extremities in patients with venous insufficiencies also display cellular characteristics of senescence [20] as well as arteries subjected to balloon angioplasty [21], tissue surrounding liver carcinomas [22] and benign prostatic hyperplasia [23].

Acknowledgements

O. Toussaint is a Research Associate and F. Chainiaux is a Research Assistant of the FNRS, Belgium. J.-P. Magalhaes thanks FCT, Portugal. We wish to thank the European Union, 5th Framework Programme, Quality of Life, R&D, 'Protage' (QLK6-CT-1999-02193) and 'Functionage' (QLK6-CT-2001-00310), as well as the Région Wallonne, Belgium Initiative Project 'Modelage'.

References

- [1] M. Serrano, M.A. Blasco, Putting the stress on senescence, *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 (2001) 748–753.
- [2] O. Toussaint, E.E. Medrano, T. Von Zglinicki, Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes, *Exp. Gerontol.* 35 (2000) 927–945.
- [3] C. Rosette, M. Karin, Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors, *Science* 274 (1996) 1194–1197.
- [4] M. Helenius, L. Makelainen, A. Salminen, Attenuation of NF-kappaB signaling response to UVB light during cellular senescence, *Exp. Cell Res.* 248 (1999) 194–202.
- [5] K. Scharfetter-Kochanek, P. Brenneisen, J. Wenk, G. Herrmann, W. Ma, L. Kuhl, C. Mewes, M. Wlaschek, Photoaging of the skin from phenotypes to mechanisms, *Exp. Gerontol.* 35 (2000) 307–316.
- [6] L. Hayflick, P.S. Moorhead, The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res.* 25 (1961) 585–621.
- [7] O. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr, R. Randall, Protein measurement with Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [8] G.P. Dimiri, X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E.E. Medrano, M. Linskens, I. Rubeli, O. Pereira-Smith, M. Peacocke, J. Campisi, A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (1995) 9363–9367.
- [9] R.D. Ramirez, C.P. Morales, B.S. Herbert, J.M. Rohde, C. Passons, J.W. Shay, W.E. Wright, Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions, *Genes Dev.* 15 (2001) 398–403.
- [10] P. Dumont, M. Burton, Q.M. Chen, E.S. Gonos, C. Frippliat, J.B. Mazarati, F. Eliaers, J. Remacle, O. Toussaint, Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast, *Free Radical Biol. Med.* 28 (2000) 361–373.
- [11] E.S. Gonos, A. Derventzy, M. Kveiborg, G. Agiostaridou, M. Kassem, B.F.C. Clark, P.S. Jat, S.I.S. Rattan, Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence, *Exp. Cell Res.* 240 (1998) 66–74.
- [12] A. Krtolica, S. Parrinello, S. Lockett, P.Y. Desprez, J. Campisi, Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 12072–12077.
- [13] H.P. Rodemann, K. Bayreuther, P.I. Franze, K. Dittmann, M. Albiez, Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types *in vitro*, *Exp. Cell Res.* 180 (1989) 84–93.
- [14] O. Toussaint, D. Lambert, J. Remacle, Mathematical model of the survival curves and of the recovery times for mitosis of cell populations exposed to stresses, *In Vitro Toxicol.* 9 (1996) 251–259.
- [15] C. Frippliat, Q.M. Chen, S. Zdanov, J.P. Magalhaes, J. Remacle, O. Toussaint, Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor- β 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 2531–2537.
- [16] Q. Chen, B. 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.
- [17] P. Dumont, F. Chainiaux, F. Eliaers, C. Petropoulou, J. Remacle, C. Koch-Brandt, E.S. Gonos, O. Toussaint, Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and *tert*-butylhydroperoxide, *Cell Stress Chaperones* 7 (2002) 23–35.
- [18] M.V. Mendez, J.D. Raffetto, T. Phillips, J.O. Menzoian, H.Y. Park, The proliferative capacity of neonatal skin fibroblasts is reduced after exposure to venous ulcer wound fluid: a potential mechanism for senescence in venous ulcers, *J. Vasc. Surg.* 30 (1999) 734–743.

- [19] M.V. Mendez, A. Stanley, H.Y. Park, K. Shon, T. Phillips, J.O. Menzoian, Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence, *J. Vasc. Surg.* 28 (1998) 876–883.
- [20] M.V. Mendez, A. Stanley, T. Phillips, M. Murphy, J.O. Menzoian, H.Y. Park, Fibroblasts cultured from distal lower extremities in patients with venous reflux display cellular characteristics of senescence, *J. Vasc. Surg.* 28 (1998) 1040–1050.
- [21] M. Fenton, S. Barker, D.J. Kurz, J.D. Erusalimsky, Cellular senescence after single and repeated balloon catheter denudations of rabbit carotid arteries, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (2001) 220–226.
- [22] V. Paradis, N. Youssef, D. Dargere, N. Ba, F. Bonvoust, J. Deschatrette, P. Bedossa, Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C, and hepatocellular carcinomas, *Hum. Pathol.* 32 (2001) 327–332.
- [23] J. Choi, I. Shendrik, M. Peacocke, D. Peehl, R. Buttyan, E.F. Ikeguchi, A.E. Katz, M.C. Benson, Expression of senescence-associated beta-galactosidase in enlarged prostates from men with benign prostatic hyperplasia, *Urology* 56 (2000) 160–166.

ARTICLE II : Role of TGF- β 1 and clusterin in premature senescence induced in human skin fibroblasts by repeated short subcytotoxic exposures to UVB (soumis)

Ce dernier article regroupe les différentes études mécanistiques (étude du rôle du TGF- β 1) et fonctionnelles (étude de l'apolipoprotéine J (apo J) et d'extraits d'algues) que nous avons réalisées sur un modèle amélioré basé sur 10 stress successifs d'UVB à la dose subcytotoxique de 250 mJ/cm².

Mise au point d'un modèle de SIPS à 10 stress répétés sous UVB

Lors de la première partie de ce travail, nous avons tout d'abord voulu améliorer notre modèle : soit obtenir une apparition plus marquée des biomarqueurs de la sénescence à une dose d'UVB diminuée, se rapprochant plus de situations potentiellement existantes dans la Nature, même si cela devait se faire au prix de l'augmentation du nombre de stress. Nous avons opté pour la mise au point d'un modèle basé sur 10 stress sous UVB. Les différents biomarqueurs précédemment étudiés (activité SA β -gal, diminution des capacités prolifératives et surexpression de gènes associés au vieillissement (*fibronectine*, *ostéonectine* et *SM22*)) ont été déterminés ainsi qu'une délétion de l'ADN mitochondrial dite « commune » de 4.977 pb et le niveau d'ARN-m de l'apo J, c-jun, c-fos, p21^{WAF-1}, p53 et le niveau d'expression protéique de l'apo J, p53, p21^{WAF-1} et p16^{INK-4A}.

Etude de l'incubation d'extraits d'algues sur la SIPS induite par les UVB

La deuxième partie de notre travail a consisté en l'étude de l'incubation des FHDs de derme avec différents extraits d'algues sur l'apparition des différents biomarqueurs de la sénescence. Les résultats présentés ici sont issus d'une plus large étude où 13 extraits ont été préalablement testés. Ces 13 échantillons ont été classés selon leur capacité de protection envers des stress cytotoxiques aux UVB, le pourcentage de cellules positives pour la SA β -gal après 10 stress UVB à 250 mJ/cm² ainsi que l'arrêt prolifératif. Nous avons repris les 3 échantillons qui montraient un effet protecteur le plus important afin de réaliser une étude plus poussée sur d'autres biomarqueurs de la sénescence cellulaire après la SIPS induite

par les UVB : nous avons déterminé le niveau relatif d'ARN-m de l'apo J et de la fibronectine ainsi que la délétion commune de 4977 pb dans l'ADN mitochondrial.

Etude de la transfection de l'apo J humaine dans la protection des FHDs aux stress toxiques et à la SIPS induite par les UVB

Nous avons décidé d'étudier plus les effets de la surexpression de l'apo J. En effet, lors d'études préalablement réalisées, notre équipe a montré que le niveau relatif d'ARN-m de l'apo J était augmenté chez les FHDs en SIPS induite par le *t*-BHP ou l'H₂O₂ (Dumont P. *et al.*, 2000). De plus, nous avons montré que l'effet de la transfection de la séquence de l'apo J de chien (gp80) protégeait les cellules transfectées à la fois de stress cytotoxiques et de la SIPS induite par le *t*-BHP (Dumont P. *et al.*, 2002). L'apo J est une protéine sécrétée dont la fonction présumée est celle d'une protéine-chaperon extracellulaire (Poon S. *et al.*, 2002). Son activité est en effet semblable à celle des protéines de choc thermique (heat shock proteins ou hsp) (pour une revue, Humphreys D. *et al.*, 1999).

Nous avons tout d'abord étudié le niveau relatif de l'ARN-m de l'apo J. Ensuite, nous avons déterminé le niveau protéique relatif de l'apo J au sein des cellules et son niveau protéique extracellulaire chez les fibroblastes en SIPS induite par 10 stress sous UVB. Etant donné que ces niveaux étaient tous augmentés, et que la séquence humaine de l'ADN complémentaire (ADNc) de l'apo J était disponible, nous avons transfecté cet ADNc dans des fibroblastes humains immortalisés (WI-38 SV-40, originaires de poumon foetal) ou non (FHDs de derme). Nous avons étudié l'impact de la transfection de cet ADNc respectivement sur la survie après des stress d'intensités cytotoxiques ou la résistance à la SIPS induite par les UVB. Afin d'obtenir une transfection stable de l'ADNc de l'apo J chez les fibroblastes non immortalisés, nous avons opté pour la technique de la transfection rétrovirale, dont la mise en oeuvre est plus délicate. Heureusement, cette technique avait précédemment été utilisée avec succès lors de la transfection de gp 80 (Dumont P. *et al.*, 2002).

Etude du rôle du TGF- β 1 dans l'apparition des différents biomarqueurs

Au sein de notre équipe, des chercheurs travaillant sur un modèle de SIPS induit chez les FHDs de poumon IMR-90 après un stress subcytotoxique et unique sous H₂O₂, ont montré l'importance du rôle joué par le Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) dans l'apparition des différents biomarqueurs de la sénescence induits par ce stress : une morphologie sénescence, une activité SA β -gal et la surexpression de gènes associés à la sénescence (*apolipoprotéine J, fibronectine,*

ostéonectine et SM22). En effet, ils ont tout d'abord montré que l'ARN-m du TGF- β 1 est surexprimé à long terme après le stress (à 24, 48 et 72 heures) mais pas directement après le stress (à 4 ou 8 heures). De plus, le TGF- β 1 semble lié à l'apparition des différents biomarqueurs. Les FHDs stimulés avec du TGF- β 1 développent également ces biomarqueurs. Les FHDs exposés à une concentration en H₂O₂ induisant normalement la SIPS et dont la voie du TGF- β 1 est bloquée par des anticorps neutralisants dirigés soit contre le TGF- β 1 ou soit contre son récepteur II (T β RII), ne développent plus ces biomarqueurs (Fripiat C. *et al.*, 2001).

Dans un premier temps, nous avons déterminé le niveau relatif d'ARN-m du TGF- β 1 à long terme après 3 ou 5 stress à respectivement 625 mJ/cm² ou 500 mJ/cm² d'UVB par RT-PCR semi-quantitative en radioactivité. Nous avons ainsi montré une augmentation du niveau relatif d'ARN-m du TGF- β 1 de l'ordre de 1.20 et de 1.25 à 72 heures suite à respectivement 3 ou 5 stress répétés aux UVB (fig. 24).

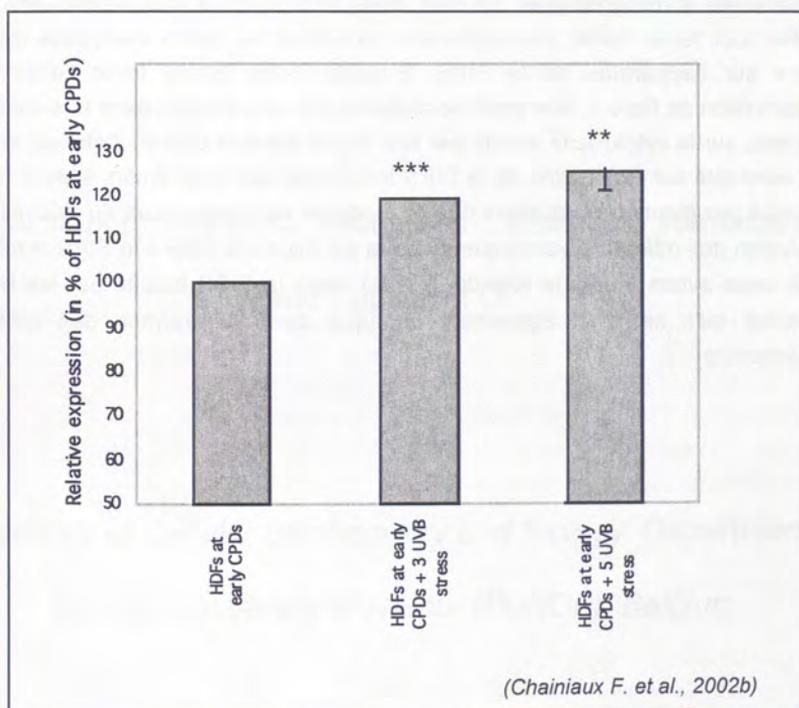


Fig. 24: Etude du niveau relatif d'ARN-m du TGF- β 1 chez des fibroblastes AGO4431 non stressés, soumis à 3 stress UVB à 625 mJ/cm² et soumis à 5 stress UVB à 500 mJ/cm².

Dans le présent article, nous avons étudié dans un premier temps le niveau relatif de l'ARN-m du TGF- β 1 à 24, 48 et 72 heures après le dernier d'une série de 10 stress sous UVB.

Etant donné que le niveau du TGF- β 1 était augmenté dans ces conditions, nous avons étudié l'effet de la stimulation de FHDs de peau par des doses

croissantes de TGF- β 1 sur l'apparition de différents biomarqueurs de la sénescence : l'activité SA β -gal, la surexpression de gènes associés à la sénescence (*apo J*, *fibronectine*, *ostéonectine* et *SM22*) et une morphologie de type sénescence chez les FHDs stimulés au TGF- β 1 (les travaux sur la morphologie ne sont pas repris dans le manuscrit). Enfin, nous avons mis en évidence le rôle joué par le TGF- β 1 dans l'apparition de ces biomarqueurs suite à la neutralisation du TGF- β 1 ou de son récepteur II (T β RII) chez les FHDs de peau stressés aux UVB.

En résumé, lors de ce travail nous avons développé un nouveau modèle de sénescence induite prématurément par 10 stress UVB à 250 mJ/cm² sur des FHDs de derme. Ces stress induisent l'apparition prématurée de différents biomarqueurs de la sénescence tels qu'un arrêt prolifératif, l'activité de la SA β -gal, la surexpression de gènes associés à la sénescence et la détection de la délétion commune de l'ADN mitochondrial de 4,977 pb. Ce modèle nous a permis de réaliser des études fonctionnelles et mécanistiques. En effet, nous nous sommes tout d'abord servi de ce modèle pour tester l'effet potentiellement protecteur de divers composés d'origine algale sur l'apparition de la SIPS. Ensuite, nous avons testé l'effet de la surexpression de l'*apo J*, une protéine-chaperonne surexprimée dans nos conditions de stress, sur la cytotoxicité induite par des doses élevées d'UVB, d'éthanol ou de *t*-BHP ainsi que sur l'apparition de la SIPS induite par les UVB. Enfin, suite à l'intérêt démontré par d'autres chercheurs de notre équipe sur l'implication du TGF- β 1 dans l'apparition des différents biomarqueurs de la sénescence suite à la SIPS induite par l'H₂O₂ nous avons étudié le rôle du TGF- β 1 dans la SIPS induite par les UVB et démontré qu'il semblait également impliqué dans l'apparition des différents biomarqueurs.

Role of TGF- β 1 and clusterin in premature senescence induced in human skin fibroblasts by repeated short subcytotoxic exposures to UVB

Chainiaux F., Borlon C., Wenders F., Eliaers F., Remacle J.
and Toussaint O.*

*Laboratory of Cellular Biochemistry and Biology, Department of
Biology, University of Namur (FUNDP), Belgium*

* Corresponding author. Tel.: +32-81-724132; fax: +32-81-724135

Mail address: Rue de Bruxelles, 61, B-5000 Namur, BELGIUM

E-mail address : olivier.toussaint@fundp.ac.be

SUMMARY

Premature senescence of human diploid fibroblasts (HDFs) can be induced after exposure to a variety of oxidative stress and DNA damaging agents. In this study we developed a robust model of UVB-induced premature senescence. After a series of 10 subcytotoxic exposures to UVB at 250 mJ/cm², the so-called biomarkers of senescence were markedly expressed (growth arrest, senescence associated β -galactosidase, and senescence-associated gene overexpression, deletion in mitochondrial DNA) in skin HDFs. Clusterin/Apolipoprotein J (Apo J) and Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) were amongst the genes overexpressed. Transfection of Apo J cDNA provided protection against both cytotoxicity and premature senescence-inducing doses of UVB and other stressful agents. Neutralizing antibodies against TGF- β 1 or its receptor II (T β RII) sharply attenuated the senescence traits, suggesting a role for TGF- β 1 in UVB-induced premature senescence. Lastly, we propose a proof-of-concept that this robust model represents an alternative *in vitro* model in photoaging research for screening potential anti-photoaging compounds.

RUNNING TITLE : TGF- β 1 and clusterin in UVB-induced premature senescence

List of abbreviations

GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HDF, human diploid fibroblast

MAPK, mitogen activated protein kinase

RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction

SA β -gal, senescence-associated β -galactosidase

SIPS, stress-induced premature senescence

t-BHP, *tert*-butylhydroperoxide

TGF- β 1, transforming growth factor- β 1

T β RII, transforming growth factor- β receptor II

INTRODUCTION

Exposure of human proliferative cell types such as human diploid fibroblasts (HDFs), endothelial cells, melanocytes etc., to acute stress with subcytotoxic concentrations of oxidative agents like *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP) [1] or hydrogen peroxide (H_2O_2) [2], induces stress-induced premature senescence (SIPS) establishing at day 2-3 after the stress [3], long before the cells reach the critical telomere length observed in replicative senescence. Cells in SIPS induced by acute oxidative stress display several features of replicative senescence like a typical senescent morphology [4], senescence-associated β -galactosidase (SA β -gal) activity [5], deletion in mitochondrial DNA [1], very limited telomere shortening [6] and change in expression level of several senescence-associated genes like clusterin/apolipoprotein J (apo J), coding a protein with extracellular chaperone-like activity [1]. It is also known that Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) signaling pathway regulates the appearance of several features of replicative senescence in H_2O_2 -induced premature senescence [7]. In addition cells in SIPS display long-term stress-specific irreversible mRNA and protein expression level changes coined "molecular scars" [8].

UVB (290-320 nm) are essential components of sunlight crossing the epidermis and reaching the upper dermis composed mainly of fibroblasts and extracellular matrix thereby affecting photoaging [9]. UVB interact with cellular chromophores and photosensitizers resulting in the generation of reactive oxygen species, DNA damage and activation of cytoplasmic signaling pathways related to growth, differentiation, replicative senescence and connective tissue degradation [10]. Preliminary data demonstrated the feasibility of detecting biomarkers of senescence in skin HDFs after subcytotoxic exposures to UVB [11]. Unfortunately only a low number of stresses was performed which did not allow a strong appearance of biomarkers of senescence nor mechanistic studies.

In this work, we present a ten-stress model with marked senescence-associated features. Based on this robust model, firstly functional studies could be undertaken on the potential role of apo J in resisting UVB-induced cytotoxicity and SIPS. Secondly, this model allowed to test the involvement of TGF- β 1 in UVB-induced SIPS. Lastly, this *in vitro* model represents an alternative for screening new compounds efficient against photoaging.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell culture, exposure to UVB, cytotoxicity assay and SA β -gal activity

AG04431 skin HDFs (Coriell Institute for Medical Research, USA) were classically grown in BME medium (Invitrogen, UK) + 10 % (v: v) of fetal calf serum (FCS) (Invitrogen, UK) and 2mM L-glutamine and 100 mg/ml streptomycin. Cells at 55-60% of *in vitro* proliferative life span were subcultivated at half confluence (10,000 cells/cm²) in BME + 1% FCS. At 72 h after plating, they were washed once with phosphate buffer saline pH 7.4 (10 mM, 0.9 g NaCl) (PBS) and exposed to UVB radiation in a thin layer of PBS using three Philips TL 20W/01 lamps (Philips, The Netherlands) emitting UVB peaking at 311 nm and placed at 30 cm above the flasks. The emitted radiation was checked under flask lid using an UVR-radiometer with a UVB sensor (Bioblock Scientific, Belgium). After radiation, PBS was replaced by BME + 1% FCS. Stress was performed twice a day for five days. Control cells were exposed to the same culture conditions without UVB exposure. At 48 h after the last stress, the cellular protein content was assayed by the Folin method described by Lowry *et al.* [12]. This method was previously shown to give accurate estimates of the number of surviving cells in such conditions [1]. The results (mean of triplicates \pm S.D.) are expressed as percentage of surviving cells. Alternatively, cells were seeded at 48 h after the last stress in squared 35 mm culture dishes (Falcon, UK) at 700 cells/cm² in BME + 1% FCS. SA β -gal activity was determined 24 h later as described in [5]. The population of SA β -gal positive cells was determined by counting 400 cells per dish. The proportions of cells positive for the SA β -gal activity are given as percentage of the total number of cells counted in each dish. The results are expressed as mean of triplicates \pm S.D..

SV-40 WI-38 cells seeded in multidishes at 200,000 cells/well of 10 cm² (Cel Cult, UK) were exposed to a single 1 h-stress under increasing concentrations of *t*-BHP (0-500 mM) (Merck, Germany), a 2 h-stress under ethanol (0-10%) diluted in MEM medium, or a UVB stress performed (0-4500 mJ/cm²) in a thin layer of PBS. After rinsing twice with MEM, the cells were given fresh MEM + 10% FCS. Cell survival was assessed at 24 h after the stress using the classical method of cellular protein assay [12]. The results are expressed as percentage of survival of the control cells (not exposed to the stressor). The results are expressed as mean of triplicates \pm S.D..

Estimation of DNA synthesis and protein level of p53, p21^{WAF-1} and p16^{INK-4a}

At 24, 48 and 72 h after the last stress, cells were seeded in 24 well plates (Cell Cult, UK) at 10,000 cells/well in BME + 1% FCS. 1 μ Ci [³H]-thymidine (specific activity: 2

Ci/mmol, Du Pont, NEN, USA) was added to BME + 1% FCS for 48 h. Quantification of radioactivity was performed by a scintillation counter (Packard Instrument Company, USA) as explained in [1]. The results are expressed as mean of triplicates \pm S.D..

At 72 h after the last stress, cells were washed once with PBS and lysed on ice (2% SDS, 10mM Tris, 1mM EDTA pH 6.8, anti-protease complete (Roche, Germany)). After homogenization of the lysates, 30 μ g of proteins were electrophoresed on Bis-Tris Gel NuPage 4-12% (Invitrogen, UK). The proteins were transferred on hybond-P membrane (Amersham Biosciences, Sweden). The antibodies used were anti-p53 antibody (sc-6243), anti-p21^{WAF-1} antibody (sc-6246), anti-p16^{INK-4} antibody (sc-468) (Santa Cruz Biotechnology, USA), anti- α -tubulin antibody (AM2495-11, Innogenex, USA) and horseradish peroxidase-linked secondary antibody (Amersham Biosciences, Sweden). The bands were visualized chemoluminescently (ECL Advance Detection Kit, Amersham Biosciences, Sweden). Semi-quantification was obtained with the ImageMaster TotalLab software (Pharmacia, Sweden).

Real Time RT-PCR

At 72 h after the last stress, total RNA was extracted from three independent cultures using Total RNAgent extraction kit (Promega, USA). Total RNA (2 μ g) was reversed transcribed using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, UK). Primers (table 1A) were designed using the Primer Express 1.5 software (Applied Biosystems, The Netherlands). Amplification reactions assays contained 1x SYBR Green PCR Mastermix and primers (Applied Biosystems, The Netherlands) at optimal concentration. A hot start at 95°C for 5 min was followed by 40 cycles at 95°C for 15 sec and 65°C for 1 min using the 7000 SDS thermal cycler (Applied Biosystems, The Netherlands). Melting curves were generated after amplification and data were analyzed using the thermal cycler software. Each sample was tested in triplicate.

Detection of the common 4,977 bp mitochondrial DNA deletion

Mitochondrial DNA was extracted as described in [13] and the presence of mitochondrial DNA was assessed by PCR amplification of a 247 bp conservative region of the mitochondrial DNA using respectively H1/L1 as described in [14]. Nested PCR to detect the deletion was performed with H2/L2 and H3/L3 primers as described in [1]. Sequences of the primers are shown in table 1B. PCR was carried out with 500 ng of mitochondrial DNA, 2.5 U AmpliTaq Gold Polymerase (Roche, Germany), 200 μ M dNTPs and 1 μ M of the primers. After initial denaturation (94°C, 10 min), PCR conditions, according to the respective primers were: [H1/L1] denaturation, 94°C, 1 min; annealing, 58°C, 1 min; elongation, 72°C, 45 sec; 30 cycles; [H2/L2] denaturation, 94°C, 30 sec; annealing, 55°C, 35 sec; elongation, 72°C, 1 min; 40 cycles; [H3/L3] denaturation, 94°C, 30 sec; annealing, 52°C, 45 sec;

elongation, 72°C, 1 min; 25 cycles. Final elongation (72°C, 10 min) was the last step of all these PCRs. PCR products were detected with ethidium bromide after agarose gel electrophoresis. The first set of primers (H2/L2) flanking the deletion gives a 524 bp fragment and the set of nested primers (H3/L3) give a 404 bp fragment. Nested PCR was carried out with 1 µl of the 50 µl mixture obtained with the H3/L3 primers.

Analysis of the effects of three algal extracts

A blind study was performed with three algal extracts named A1, A2 and A3 provided by a private company. At 1 h before each stress, culture medium (BME + 1% FCS) was replaced by fresh medium containing the extract. Cells were then washed once with PBS and submitted to the UVB stress in a thin layer of PBS containing the extract. After each stress, fresh medium containing the algal extract was added on the stressed cells. Biomarkers of senescence were checked at 72 h after 10 subcytotoxic exposures to UVB.

Transfection of apolipoprotein J cDNA

Cloning of apo J cDNA

A 1350-bp complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) fragment containing the entire open reading frame of human apo J (RZPD, Germany) was amplified by PCR from the pBluescript II SK plasmid using forward primer APOJPNF (table 1C) (Hpa I restriction site at 5'end) and TRAPOFR (Bam HI restriction site at 5'end). The purified amplicons were digested by Hpa I and Bam HI and inserted by T4 ligase reaction (Promega, USA) into the pLXSN retroviral vector (Clontech, USA).

Cloning of apo J V5/His tag cDNA

The 1350-bp cDNA fragment of human apo J was amplified by PCR from the pBluescript II SK plasmid using forward primer APOJ31F (Bam HI restriction site at 5'end) and reverse primer APOJ31R (Xba I restriction site at 5'end). The purified amplicons were digested by Bam HI and Xba I and inserted by T4 ligase reaction into the pCDNA3.1 V5/His (Clontech, USA). The apo J V5/His sequence was amplified by PCR using forward primer APOJPNF (Hpa I restriction site at 5'end) and reverse primer APOJPNR (Bam HI restriction site at 5'end). The purified amplicons were digested by Hpa I and Bam HI and inserted by T4 ligase reaction into the pLXSN retroviral vector. The different constructs were checked by restriction profiles and sequencing (data not shown).

Transfections

Subconfluent SV-40 WI-38 cells (American Type Culture Collection, USA) were cultivated in 100-mm culture dishes (Cel Cult, USA) containing 10 ml of MEM (Invitrogen, USA) without serum and were transfected for 8 h with 30 µg of either

pLXSN/apo J expression vector, pLXSN/apo J-V5-His expression vector or pLXSN vector without insert, using $\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_3$ precipitation method (CalPhos mammalian transfection kit, Clontech, USA). At 48 h after transfection, the cells were plated and exposed to the selection medium containing 0.5 mg/ml G418 (Invitrogen, USA). Colonies were isolated after 3 weeks of selection and expanded in MEM + 10 % FCS supplemented with 0.5 mg/ml G418.

Overexpression of apo J in AG04431 HDFs between 35 and 40% of the replicative lifespan was achieved by retroviral infections. The pLXSN/apo J expression vector, the pLXSN/apo J-V5-His expression vector and the pLXSN vector without insert were transfected in the PT67-packaging cell line (Invitrogen, USA) by $\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_3$ precipitation. After 15 days of selection under 0.5 mg/ml G418, stable virus-producing cell lines were obtained. At 18 h prior the infections, AG04431 HDFs were plated in 100-mm culture dishes at 500,000 cells/dish. The culture medium of PT67 cells accumulated viruses for 3 days. This medium was collected, filtered through a 0.45 mm filter (Sarstedt, Germany) supplemented with 4 mg/ml of hexadimethrine bromide (Sigma, USA). The retroviral supernatants were added (10 ml/dish) to the target AG04431 cells for 24 h. At day 2 after the infection, a 2-week selection under 0.5 mg/ml G418 was started.

To check for apo J overexpression at protein level, cell lysates were prepared in lysis buffer (2% SDS, 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 6.8, anti-protease complete (Roche, Germany)). We used anti-clusterin β (Santa Cruz, USA) and anti-V5 (Invitrogen, UK) antibodies. The level of α -tubulin was used as reference level.

Stimulation with TGF- β 1 and neutralization of TGF- β 1 and TGF- β 1 receptor II

Skin HDFs under 55-60% of *in vitro* proliferative life span were plated at 10,000 cells/cm² in BME + 1% FCS. At 72 h after subcultivation, the cells were stimulated with increasing concentrations of TGF- β 1 (R&D systems, UK) diluted in the culture medium for 72 h.

Neutralization : after the last UVB stress, skin HDFs were incubated with a specific antibody against TGF- β 1 (3 μ g/ml, R&D systems, UK) or against the TGF- β 1 receptor II (10 μ g/ml, R&D systems, UK) as described in [15]. The medium containing the neutralization antibodies was replaced every day for 3 days.

Statistical analysis

A statistical analysis of the results was achieved using the statistical student t test. Ns = non significant ($p > 0.05$), * = $0.05 > p > 0.01$, ** = $0.01 > p > 0.001$, *** = $p < 0.001$.

RESULTS

A preliminary part of this work was devoted to test whether marked appearance of features of replicative senescence would be observed after a series of 10 subcytotoxic stresses performed as described in materials and methods. Skin HDFs at early CPDs were exposed 10 times to UVB (125, 250, 375 or 500 mJ/cm²) with 2 stresses per day for 5 days. Cell viability was determined by cell counting (data not shown) and by protein assay at 48 h after the last stress. These methods were previously shown to give results comparable to other viability methods [1]. Cytotoxicity was found at 375 mJ/cm² and 500 mJ/cm² (fig. 1A). The subcytotoxic dose used throughout this study will be 250 mJ/cm².

SA β -gal and Mitochondrial DNA deletion after repeated exposures to UVB

The UVB stressed skin HDFs and the senescent skin HDFs were characterized by a major proportion of enlarged cells which is typical of senescent cultures. The percentage of cells positive for SA β -gal activity increased along the population doublings with 8% of positive cells at early CPDs (d0) to 53% in cells over 90% of their proliferative life span. A 3-fold increase of positive cells was found after 10 exposures to UVB at 250 mJ/cm² when compared to the control cells (fig. 1B).

The common 4,977 bp deletion in the mitochondrial DNA is detected in both replicatively senescent and *t*-BHP-induced senescent HDFs [1]. Nested PCR performed as explained in the materials and methods allowed to detect this deletion after a series of 10 stresses at 250 mJ/cm² UVB. Indeed a 404 bp PCR product resulting from the 4,977 bp deletion was observed in UVB-stressed cells (fig. 1.C.b.). We checked the integrity of the mitochondrial DNA. First we amplified the intact 5,501 bp fragment present in the non-deleted fragment amplified with the H2/L2 primers (data not shown). Second we amplified a conservative 247 bp fragment of the mitochondrial DNA using the primers H1/L1 (fig. 1.C.a).

Decreased proliferative potential after repeated subcytotoxic exposures to UVB

A progressive decrease of the proliferation potential is observed along the population doublings of HDFs [16]. Determination of the level of incorporation of [³H]-thymidine was performed at 24, 48 and 72 h after a series of 10 UVB stresses at 250 mJ/cm². The incorporation remained very low at 48 and 72 h after the series of stress while it increased sharply in the control cells until they reached confluence at 72 h (fig. 2.A.). Western blottings were performed with proteins extracted at 72 h after a series of 10 UVB stresses, considering α -tubulin protein level as reference level. The protein level of p53, p21^{WAF-1} and p16^{INK-4a} was respectively increased by 2.3-, 1.8- and 1.5- fold

compared to the control cells (fig. 2.B.). Active p53 is known to trigger p21^{WAF-1} overexpression while p21^{WAF-1} and p16^{INK-4a} are cyclin-dependent kinase inhibitors which block the cell cycle in G1/S [17]. Unpublished results show that the DNA-binding activity of p53 is sharply increased at least until 72 h after a series of 10 UVB stresses.

mRNA level of cell cycle- and senescence-associated genes

Apo J, fibronectin, osteonectin and SM22 mRNA steady-state levels are increased in senescent HDFs and at 72 h after exposure of HDFs to *t*-BHP and H₂O₂ [1]. We determined these mRNA steady-state levels at 72 h after a series of 10 exposures to subcytotoxic UVB stress. p53 and p21^{WAF-1} mRNA level was checked since their protein level increased in such conditions. c-fos and c-jun mRNA level were also studied since they are known to be overexpressed in the aged skin [18]. Semi-quantitative real time RT-PCR showed that all these senescence-associated genes tested were overexpressed in both UVB-treated and senescent cells (figure 2.C.a. and 2.C.b.).

Use of UVB-induced SIPS in photoaging research

Skin fibroblasts play a paramount role in skin ageing namely by decreasing skin elasticity with age [19]. Demonstrating a role of UVB-induced SIPS *in vivo* is out of scope of this work. Nevertheless the model of UVB-induced SIPS described herein could represent an *in vitro* model allowing to test the efficiency of synthetic or natural compounds against the photoaging of skin HDFs. With this respect, a blind study was undertaken in which skin HDFs were exposed 10 times to UVB at 250 mJ/cm² in the presence of non-cytotoxic concentrations of three extracts of littoral sea algae (A1, A2 or A3). No change in the features of senescence was observed when cells were incubated with the extracts without UVB exposure (not shown). Extract A1 was the best extract since it prevented the appearance of SA β-gal activity, protected partly against growth arrest, allowed overexpression of protective apo J, prevented mitochondrial DNA deletion as well as overexpression of fibronectin, the latter being recognized features of senescence. The two other extracts provided much attenuated protection (figure 3.A. and 3.B.). From this example, we understand that this model of UVB-induced SIPS is very promising in photoaging research.

Increased Apo J protein level after repeated subcytotoxic exposures to UVB

At 72 h after a series of 10 exposures to UVB at 250 mJ/cm², a 1.5-fold intracellular increase of Apo J level was found considering α-tubulin protein level as reference level. More strikingly, a considerable 7.2-fold increase of extracellular Apo J was

detected in the culture medium collected at 72 h after the series of stress when compared to control counterparts (figure 4.A. and 4.B.).

Overexpression of human apo J protects SV-40 WI-38 HDFs against cytotoxic stress

Transfection of SV-40 WI-38 HDFs with human apo J cDNA resulted in its overexpression at the protein level, both in its native (figure 5.A.a.) and tagged form (figure 5.A.b.) when compared to cells transfected with the empty vector. Overexpression of both native and tagged form of the protein favored cell survival when the cells were exposed to cytotoxic doses of UVB (figure 5.B.a.) and to cytotoxic concentrations of ethanol (figure 5.B.b.) and *t*-BHP (figure 5.B.c.). The results obtained with both forms were similar.

Role of apo J against UVB-induced SIPS

Apo J cDNA was retrovirally transfected in skin HDFs. Overexpression of both native and tagged form were found both at mRNA and protein level (figure 6). Both native and tagged form of apo J protected against the increase of the proportion of SA β -gal positive cells observed after a series of 10 exposures to 250 mJ/cm² UVB (figure 7.A.). Unexpectedly overexpression of both forms of apo J decreased the level of [³H]-thymidine incorporation into DNA. This seems to contradict previous results obtained in foetal lung HDFs suggesting that, while being a biomarker of senescence, apo J does not change the proliferative potential of the cells [20, 21]. A possible scenario is metabolic exhaustion due to overexpression of the protein. Anyway a very similar ratio of [³H]-thymidine incorporation was found between the cells expressing Apo J, tagged or not, and the cells transfected with empty vector, whether exposed to UVB or not (figure 7.B.). This suggests no stress-related effect of apo J on [³H]-thymidine incorporation. The UVB-induced overexpression of fibronectin shown above vanished when apo J was overexpressed (figure 7.C.).

TGF- β 1 mRNA level is increased after repeated subcytotoxic exposures to UVB

The steady-state mRNA level of TGF- β 1 was determined by semi-quantitative real time PCR at several times after 10 subcytotoxic exposures of skin HDFs to UVB at 250 mJ/cm². GAPDH mRNA level was considered as reference. A respective 2.0-, 1.7- and 1.4-fold overexpression was found at 24, 48 and 72 h after the last UVB stress (figure 8.A.). Such results were similar to those obtained in H₂O₂-induced SIPS of foetal lung HDFs [7].

SA β -gal activity and mRNA level of senescence-associated genes increase after stimulation with TGF- β 1

Skin HDFs were stimulated for 72 h with 1, 5 and 10 ng/ml of human TGF- β 1 diluted in culture medium + 1 % FCS. The proportion of HDFs positive for SA β -gal activity increased at all TGF- β 1 concentrations with a 1.6-fold increase at 5 ng/ml (figure 8.B.). However such increase did not reach the levels obtained after a series of 10 UVB exposures, suggesting partial involvement of TGF- β 1.

Semi-quantitative real time RT-PCR showed that the steady-state mRNA level of the senescence-associated genes apo J, fibronectin, osteonectin, SM22 and p21^{WAF-1} plus TGF- β 1 mRNA was increased after 72 h of stimulation with 1 to 10 ng/ml TGF- β 1. Remarkably, p53 mRNA level did not change after stimulations with TGF- β 1 whereas it increased after a series of 10 exposures to 250 mJ/cm² UVB, as shown above. TGF- β 1 has already been described as a potential inducer of p21^{WAF-1} [22] which is confirmed herein at 5 and 10 ng/ml TGF- β 1 (figure 8.C.).

Effects of the neutralization of TGF- β 1 and TGF- β 1 receptor II

Neutralizing antibodies against TGF- β 1 or TGF- β 1 receptor II prevented the UVB-induced increase of the proportion of cells positive for SA β -gal activity (figure 9.A.). These antibodies also caused an observable decrease of the incorporation of [³H]-thymidine into DNA of the cells not exposed to UVB. This suggests that basal levels of TGF- β 1 might participate in cell growth as already reported [23]. Similar ratios of [³H]-thymidine incorporation existed between the cells exposed to UVB or not and thereafter incubated with the neutralizing antibodies (figure 9.B.). This suggests that TGF- β 1 either does not play a major role in the UVB-induced growth arrest or is redundant with other mechanisms. Similar results were observed in H₂O₂-induced SIPS [7]. Real Time RT-PCR was used to determine the steady-state mRNA levels of fibronectin, osteonectin, SM22, apo J, p21^{WAF-1} and TGF- β 1 after 72 h of incubation with neutralizing antibodies against TGF- β 1 following a series of 10 subcytotoxic exposures to UVB. Although a stress-induced overexpression of each gene was observed, these overexpressions vanished when the cells were incubated with the neutralizing antibodies (figure 10). In these experiments pools of total RNA were obtained from three independent experiments.

DISCUSSION

Skin represents an excellent and accessible model organ allowing the study of intrinsic and extrinsic factors coordinately contributing to the complex phenomenon of aging [for a review, 24]. Evidence show that intrinsic and extrinsic aging of the skin are probably driven by similar biological, biochemical and molecular mechanisms [for a review, 25]. Extrinsic aging, also called photoaging, is mainly due to UV-induced damage of the dermal connective tissue of the skin, resulting in qualitative and quantitative alterations of the dermal extracellular matrix [for a review, 26]. Dermal fibroblasts are essential regulators of the synthesis and the degradation of extracellular matrix [for a review, 27]. UVB generates DNA damage, particularly cyclobutane pyrimidine dimers and (6-4) photoproducts [for a review, 28] and severe oxidative stress in skin via interactions with intracellular chromotophores and photosensitizers. This results both in transient and permanent genotoxicity, and in the activation of cytoplasmic signal transduction pathways related to growth, differentiation, replicative senescence and connective tissue degradation [for a review, 24]. Very few of the multiple studies that dealt with the effects of UV were aimed at investigating the long-term effects of UV.

In this study we developed a model of premature senescence induced by 10 successive exposures to a subcytotoxic dose of UVB at 250 mJ/cm². Indeed, repeated exposures to UVB increased sharply SA β -gal activity reaching levels observed after exposure(s) of foetal lung HDFs to *t*-BHP or H₂O₂ [1]. Increases in SA β -gal positive cells were previously found in keratinocytes and fibroblasts from skin samples from old donors compared to younger counterparts [5]. Nested PCR was necessary to detect the DNA fragment resulting from the 4,977 bp deletion indicating the low frequency of this deletion, as also suggested by studies on senescent HDFs and on HDFs in *t*-BHP-induced SIPS [1]. It was reported that the *in vivo* frequency of this deletion was higher in sun-exposed compared with non-exposed skin biopsies taken from the same individuals [29]. This deletion was confined to the dermal rather than the epidermal compartment of the skin and seems to reflect photo- rather than chronological aging [30]. This deletion has been shown to be mediated by singlet oxygen [14]. Growth arrest is an important feature of cellular senescence. A drastically decreased proliferative potential of HDFs in UVB-induced SIPS was observed after 10 exposures to UVB. This decreased potential was correlated with an overexpression of p53, p21^{WAF-1} and p16^{INK-4A}.

The relative steady-state mRNA level of c-jun and c-fos increased in dermal HDFs after a series of UVB exposures. It was already known that c-jun is overexpressed at the mRNA and protein levels *in vivo* after exposure of human skin to UV [31]. Increased levels of c-JUN protein compete with JunD resulting in the preferential formation of c-JUN:c-FOS AP-1 complexes in both the epidermis and the dermis [32]. AP-1 regulates the expression of several metalloproteinases (MMP-1, MMP-3 and

MMP-9), whose overexpression has been correlated with the activation of AP-1 by UV-irradiation [25].

The senescence-related genes fibronectin, osteonectin, SM22 and apo J were overexpressed at 72 h after the last UVB stress. Fibronectin is an essential component of the extracellular matrix and may contribute to the morphological changes observed in senescent HDFs as well as anchorage of cells to their substrate [33]. Osteonectin is a calcium binding protein able to inhibit the cell entry into the S phase through selective binding of platelet-derived growth factor [34]. SM22 (transgelin) encodes for a putative calcium binding protein involved in senescence-induced morphological changes [35]. Apo J is an extracellular protein with chaperone-like activity similar to small heat shock proteins [36, 37]. The steady-state mRNA levels of these four genes increased in replicative senescence and in H₂O₂- and *t*-BHP-induced SIPS [1] which broadens their role in cellular senescence.

WI-38 HDFs transfected with gp80, the canine apo J sharing 88% homology with its human counterpart, better resisted exposures to cytotoxic concentrations of *t*-BHP or ethanol and better resisted *t*-BHP- and ethanol-induced SIPS [20]. As observed herein transfection of human apo J in SV-40 WI-38 cells favors survival after cytotoxic exposures to UVB, *t*-BHP and ethanol. Additionally dermal HDFs transfected with human apo J were protected against UVB-induced increase of both SA β -gal positive cells and fibronectin mRNA steady-state mRNA level. Noteworthy apo J expression has been reported to be regulated by TGF- β 1 via modulation of c-fos [38].

The remarkable induction of SIPS after 10 exposures to UVB allowed to study the role of TGF- β 1 in this type of premature senescence. TGF- β 1 steady-state mRNA level was increased at least until 72 h after the last UVB stress. Stimulation with TGF- β 1 induced SA β -gal activity and overexpression of four senescence-associated genes. Neutralization of TGF- β 1 or its receptor (T β RII) using specific antibodies after a series of UVB stress decreased sharply the appearance of these senescence-associated features. Exposure of foetal lung IMR-90 HDFs to a subcytotoxic concentration of H₂O₂ induces a first phase of activation of p38^{MAPK} [15]. This activation triggers an overexpression of TGF- β 1, which starts a positive feedback loop allowing sustained activation of p38^{MAPK}. p38^{MAPK} phosphorylates and activates the transcription factor ATF-2 that interacts with hypophosphorylated retinoblastoma protein (pRb). This complex induces the appearance of features of replicative senescence. This regulatory loop could also be one of the triggers of UVB-induced SIPS in addition to the activation of p53. Indeed TGF- β 1 is known to be overexpressed in skin *in vivo* after UVB exposure [39]. However the specific biological functions of each TGF- β isoforms and their role in photoaging and tumorigenesis in human skin remain to be elucidated. In addition investigating the signaling pathway(s) leading to UVB-induced SIPS could be informative about the role of TGF- β 1 in skin photoaging.

Lastly the results obtained here with algal extracts suggest this model can be used to discriminate potential anti-photoaging products. This represents a proof-of-concept that this model of UVB-induced SIPS can represent an alternative *in vitro* model for testing anti-photoaging products. Indeed, no *in vitro* alternative method exists for

detecting the potential long-term beneficial or deleterious effects of molecules on the photoaging of the skin. Indeed the alternative toxicological methods available today for mammalian cells are restricted to assays estimating cytotoxicity, irritation and molecule uptake [40]. Moreover this model of repeated subcytotoxic exposures better mimicks the repeated exposures to UVB occurring in everyday life and responsible for photoaging.

Acknowledgments

F. Debacq-Chainiaux and O. Toussaint are respectively research assistant and research associate of the FNRS, Belgium. We thank the European projects "Functionage" (contract # QLK6-2001-00310) and "CRAFT-Cellage" (contract # CRAFT-1999-71628) as well as the Région Wallonne projects "Modelage" and "TOXISIPS" and the Région Wallonne/FSE project "Arrayage" (EPH 3310300 R0472/215316)

References

- [1] Dumont P., Burton M., Chen Q.M., Gonos E., Fripiat C., Mazarati J.-B., Eliaers F., Remacle J., Toussaint O. (2000) *Free Radical Biol Med* **28**, 361-373
- [2] Chen Q.M., Bartolomew J.C., Campisi J., Acosta M., Reagan, J.D., Ames, B.N. (1998) *Biochem J* **332**, 43-50
- [3] Brack C., Lithgow G., Osiewicz H., Toussaint O. (1999) *EMBO J* **19**, 1929-34
- [4] Bayreuther K., Rodemann H.P., Hommel R., Dittmann K., Albiez M. Francz P.I. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 5112-6
- [5] Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M. Campisi J. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 9363-7
- [6] de Magalhaes J.-P., Chainiaux F., Remacle J., Toussaint O. (2002) *FEBS Lett* **523**, 157-162
- [7] Fripiat C., Chen Q.M., Zdanov S., Magalhaes J.-P., Remacle J., Toussaint O. (2001) *J Biol Chem* **276**, 2531-37
- [8] Dierick J.-F., Kalume D.E., Wenders F., Salmon M., Dieu M., Raes M., Roepstorff P., Toussaint O. (2002) *FEBS Lett* **531**, 499-504
- [9] Rosette C., Karin M. (1996) *Science* **274**, 1194-7
- [10] Helenius M., Makelainen L., Salminen A. (1999) *Exp Cell Res* **248**, 194-202
- [11] Chainiaux F., Magalhaes J.-P., Eliaers F., Remacle J., Toussaint O. (2002) *Int J Bioch Cell Biol* **34**, 1331-9
- [12] Lowry O., Rosebrought N., Farr A., Randall R. (1951) *J Biol Chem* **193**, 265-275
- [13] Filser N., Margue C., Richter C. (1997) *Biochem Biophys Res Comm* **233**, 102-107
- [14] Berneburg M., Grether-Beck S., Kürten V., Ruzika T., Briviba K., Sies H., Krutmann J. (1999) *J Biol Chem* **274**, 15345-15349
- [15] Fripiat C., Dewelle J., Remacle J., Toussaint O. (2002) *Free Radic Biol Med* **33**, 1334-1346
- [16] Cristofalo V.J., Sharf B.B. (1973) *Exp Cell Res* **76**, 419-427
- [17] Sherr C.J., Roberts J.M. (1999) *Genes Dev* **13**, 1501-1512
- [18] Grassilli E., Bellesia E., Salomoni P., Croce M.A., Sikora E., Radziszewska E., Tesco G., Vergelli M., Latorraca S., Barbieri D., Fagiolo U., Santacaterina S., Amaducci L., Tiozzo R., Sorbi S., Franceschi C. (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **226**, 517-23
- [19] Bernstein E.F., Chen Y.Q., Tamai K., Shepley K.J., Resnik K.S., Zhang H., Tuan R., Mauviel A., Uitto J. (1994) *J Invest Dermatol* **103**, 182-6
- [20] Petropoulou C., Trougakos I.P., Kolettas E., Toussaint O., Gonos E.S. (2001) *FEBS Lett* **509**, 287-297
- [21] Dumont P., Chainiaux F., Eliaers F., Petropoulou C., Remacle J., Koch-Brandt C., Gonos E.S., Toussaint O. (2002) *Cell Stress Chaperones* **7**, 23-35
- [22] Datto M.B., Li Y., Panus J.F., Howe D.J., Xiong Y., Wang X.F. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 5545-5549

- [23] Kletsas D., Stathakos D., Sorrentino V., Philipson L. (1995) *Exp Cell Res* **217**, 477-483
- [24] Wlaschek M., Tantcheva-Poor I., Naderi L., Ma W., Schneider L., Razi-Wolf Z., Schüller J., Scharfetter-Kochanek K. (2001) *J Photochem Photobiol* **63**, 41-51
- [25] Rittié L., Fisher G. (2002) *Ageing Res Rev* **1**, 705-720
- [26] Wlaschek M., Ma W., Jansen-Dürr P., Scharfetter-Kochanek K. (2003) *Exp Gerontol* **38**, 1265-1270
- [27] Quan T., He T. Y., Kang S., Voorhees J., Fisher G. (2002) *J Invest Dermatol* **119**, 499-506
- [28] Ichihashi M., Ueda M., Budiyo A., Bito T., Oka M., Fukunaga M., Tsuru K., Horikawa T. (2003) *Toxicology* **189**, 31-39
- [29] Pang C., Lee H., Yang J., Wei Y. (1994) *Arch Biochem Biophys* **312**, 534-538
- [30] Birch-Machin M., Tindall M., Turner R., Haldane F., Rees J. (1998) *J Invest Dermatol* **110**, 149-152
- [31] Fisher G., Talwan H., Lin J., Lin P., McPhillips F., Wang Z., Li X., Wan Y., Kang S., Voorhees J. (1998) *J Clin Invest* **101**, 1432-1440
- [32] Angel P., Szabowski A., Schorpp-Kistner M. (2001) *Oncogene* **20**, 2413-2423
- [33] Kumazaki T., Kobayashi M., Mitsui Y. (1993) *Exp Cell Res* **205**, 396-402
- [34] Funk S., Sage E. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 2648-2652
- [35] Lecka-Czernick B., Moerman E., Jones R., Goldstein S. (1996) *Exp Gerontol* **31**, 159-174
- [36] Poon S., Treweek T., Wilson M., Easterbrook-Smith S., Carver J. (2002) *FEBS Lett* **513**, 259-266
- [37] Humphreys D., Carver J., Easterbrook-Smith S., Wilson M. (1999) *J Biol Chem* **274**, 6875-6881
- [38] Jin G., Howe P. (1999) *Eur J Biochem* **263**, 534-542
- [39] Quan T., He T., Kang S., Voorhees J., Fisher G. (2002) *J Invest Dermatol* **119**, 499-506
- [40] Toussaint O., Dumont P., Dierick J.-F., Pascal T., Fripiat C., Chainiaux F., Magalhaes J.-P., Eliaers F., Remacle J. (2000) *Biogerontology* **1**, 179-183

A	Genes	Positions (bp)	Sequences
	<i>Apolipoprotein J</i>	937-959	5'-gga tga agg acc agt gtg aca ag-3'
		1032-1050	5'-cag cga cct gga ggg att c-3'
	<i>Fibronectin</i>	5023-5041	5'-tgt ggt tgc ctt gca cga t-3'
		5111-5131	5'-gct tgt ggg tgt gac ctg agt-3'
	<i>Osteonectin</i>	868-889	5'-gag acc tgt gac ctg gac aat g-3'
		957-982	5'-gga agg agt gga tt aga tca caa ga-3'
	<i>SM22</i>	511-530	5'-cgt gga gat ccc aac tgg tt-3'
		586-606	5'-aag gcc aat gac atg ctt tcc-3'
	<i>p21WAF-1</i>	495-515	5'-ctg gag act ctc agg gtc gaa-3'
		599-617	5'-cca gga ctg cag gct tcc t-3'
	<i>p53</i>	1209-1229	5'-aag aaacca ctg gat gga gaa-3'
		1263-1283	5'-cag ctc tgc gaa cat ctc gaa-3'
	<i>c-fos</i>	249-268	5'-tea ccc gca gac tcc ttc tc-3'
		323-343	5'-gtg gga atg aag ttg gca ctg-3'
	<i>c-jun</i>	2016-2033	5'-gga tca agg cgg aga gga a-3'
		2088-2102	5'-tcc agc cgg gcg att-3'
	<i>TGF- β 1</i>		5'-agg gct acc atg cca act tct-3'
			5'-ccg ggt tat gct ggt tgt aca-3'
	<i>GAPDH</i>	942-963	5'-acc cac tcc tcc acc ttt gac-3'
		1033-1053	5'-gtc cac cac cct gtt gct gta-3'
B	Primers	Positions (bp)	Sequences
	H1	219-238	5'-atg ctt gta gga cat aat aa-3'
	L1	447-466	5'-agt ggg agg gga aaa taa ta-3'
	H2	8150-8169	5'-ccg ggg gta tac tac ggt ca-3'
	L2	13631-13650	5'-ggg gaa geg agg ttg acc tg-3'
	H3	8197-8215	5'-cag ttt cat gcc cat cgt c-3'
	L3	13560-13578	5'-gat gag agt aat aga tag g-3'
C	Primers	Sequences	
	APOJ31F	5'-cgc gga tcc gcg gcc acc atg atg aag act ctg ctg ctg tt-3'	
	APOJ31R	5'-tgc tet aga gcc ctc ctc ccg gtg ctt ttt gcg-3'	
	APOJPNF	5'-g ggt taa ccc gcc acc atg atg aag act ctg ctg ctg tt-3'	
	APOJPNR	5'-c ggg atc ccg gcg ggt tta aac tca atg gtg-3'	
	TRAPOJR	5'-c ggg atc ccg tca ctc ctc ccg gtg ctt ttt gc-3'	

Figure 1

Effect of 10 repeated exposures to UVB on cell survival, SA β -gal activity and common 4,977 bp mitochondrial DNA deletion.

(1A) Cytotoxicity at 24 h after 10 exposures to UVB. Doses of UVB ranged from 0 to 500 mJ/cm² with 2 stresses per day for 5 days (dashed columns). Results are expressed as percentage of cell survival compared to day 0 (d0, 100 %, white columns) before any stress. Results are given as mean \pm S.D. of 3 independent experiments.

(1B) Proportion of cells positive for the SA β -gal activity at 72 h after 10 exposures to UVB at 250 mJ/cm². Cells at early CPDs before exposure to UVB (day 0 (d0), white columns), incubated 10 times in a thin layer of PBS without (CTL, grey columns) or with UVB exposure (UVB, dashed columns) and cells at late CPDs (\pm 90% of their proliferative life span) (black columns) were considered. Results are given as mean \pm S.D. of 3 independent experiments.

(1C) Detection of the common 4,977 bp mitochondrial DNA deletion by nested PCR after 10 exposures of UVB at 250 mJ/cm². (a) Detection of a conserved 247 bp fragment of the mitochondrial DNA in cells incubated 10 times in a thin layer of PBS along UVB exposure (UVB) or not (CTL). Cells at day 0 (d0, before any incubation in PBS) are also considered. (b) Detection of the deletion by nested PCR. The 4,977 bp deletion is detected (404 bp product) in UVB-exposed cells (UVB) and not in CTL or d0 cells.

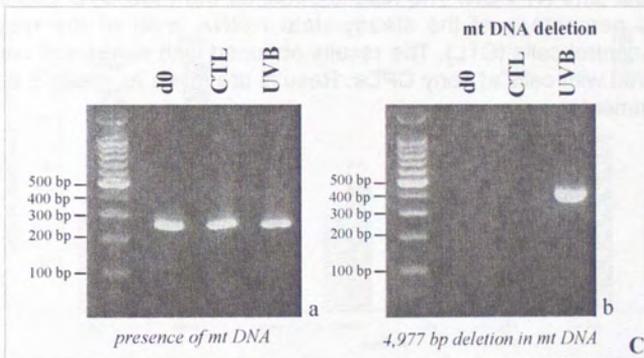
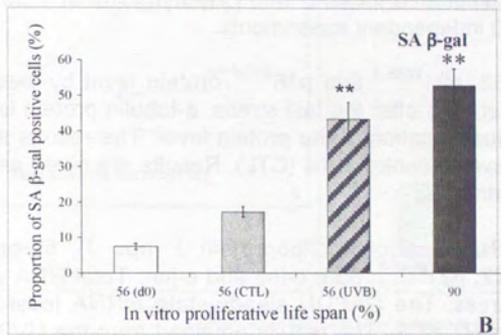
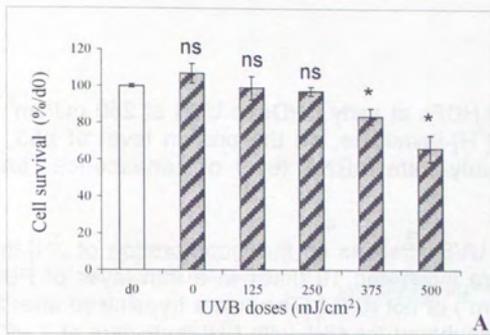


Figure 1

Figure 2

Effect of 10 exposures of HDFs at early CPDs to UVB at 250 mJ/cm² per exposure on the incorporation of [³H]-thymidine, on the protein level of p53, p21^{WAF-1} and p16^{INK-4} and on the steady-state mRNA level of senescence- and cell cycle-associated genes.

(2.A.) Effect of repeated UVB stresses on the incorporation of [³H]-thymidine. Skin HDFs at early CPDs were incubated 10 times in a thin layer of PBS along UVB exposure (UVB, 250 mJ/cm²) or not (CTL). They were trypsinised after 24, 48 or 72 h after the last stress and incubated for 48 h with [³H]-thymidine at 1 µCi. Results are given as mean ± S.D. of 3 independent experiments.

(2.B.) (a) Analysis of p53, p21^{WAF-1} and p16^{INK-4} protein level by western blotting. Proteins were extracted at 72 h after the last stress. α-tubulin protein level was used as reference level. (b) Quantification of the protein level. The results are expressed as 100% of the protein level in control cells (CTL). Results are given as mean ± S.D. from 3 independent experiments.

(2.C.) Steady-state mRNA level of apolipoprotein J (apo J), fibronectin (fibro), osteonectin (osteo), SM22, p21^{WAF-1}, p53, c-fos and c-jun. Total RNA was extracted at 72 h after the last stress. The GAPDH steady-state mRNA level was used as reference in the real time RT-PCR. The results obtained from the UVB treated cells are expressed as percentage of the steady-state mRNA level of the respective mRNA species in control cells (CTL). The results obtained with senescent cells (late CPDs) are compared with cells at early CPDs. Results are given as mean ± S.D. of 3 independent experiments.

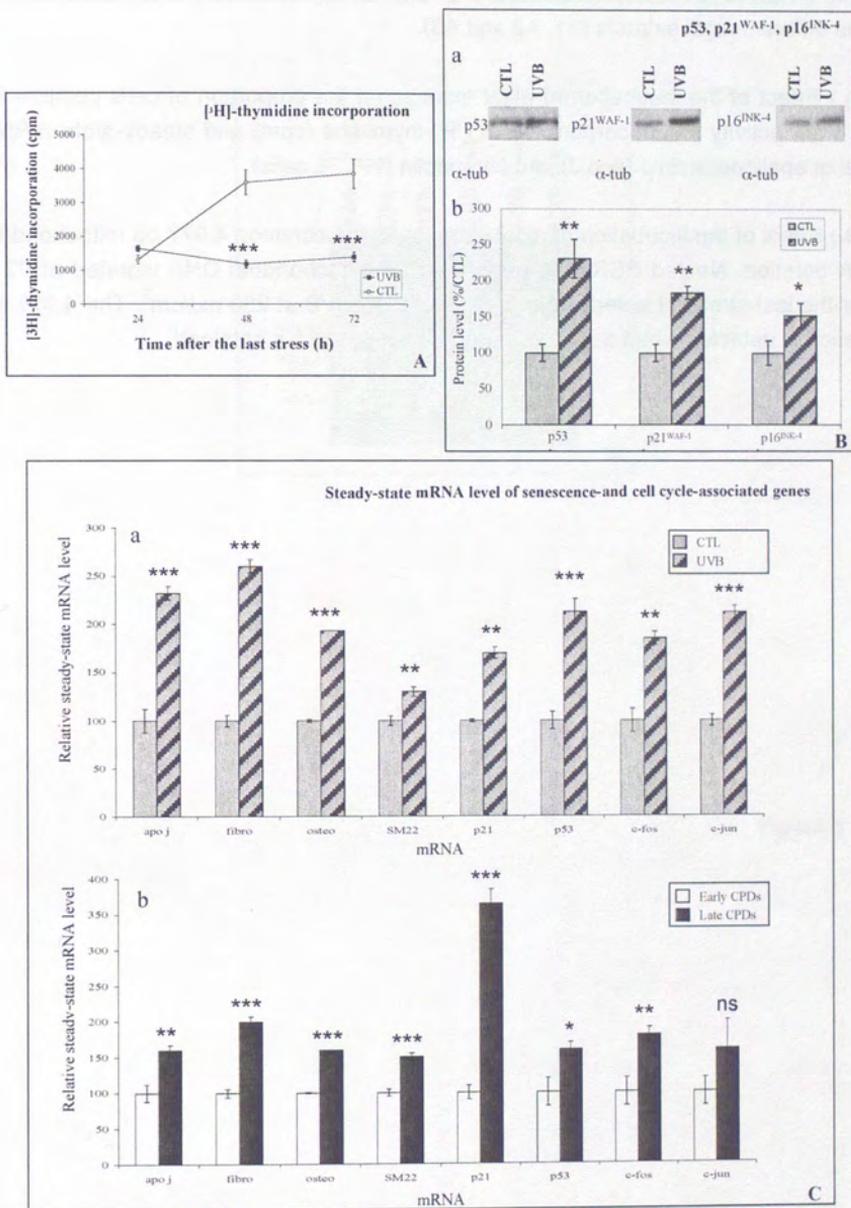


Figure 2

Figure 3

Effect of incubations of algal extracts on the SIPS phenotype. HDFs exposed (UVB) or not (CTL) to 10 subcytotoxic doses of UVB at 250 mJ/cm^2 were incubated with three different algal extracts (A1, A2 and A3).

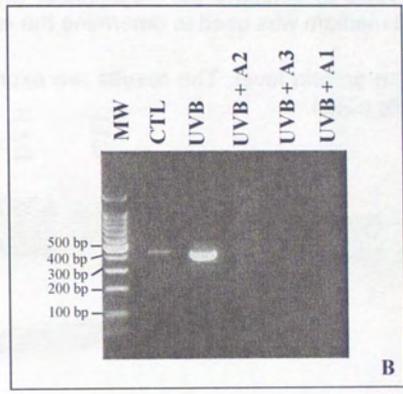
(3.A.) Effect of the incubation of algal extracts on the proportion of cells positive for SA β -gal activity (%), incorporation of [^3H]-thymidine (cpm) and steady-state mRNA level of apolipoprotein J (apo J) and fibronectin (%/CTL cells).

(3.B.) Effect of the incubation of algal extracts on the common 4,977 bp mitochondrial DNA deletion. Nested PCR was performed on mitochondrial DNA isolated at 72 h after the last stress of a series of 10 exposures to UVB at 250 mJ/cm^2 . The 4,977 bp deletion is detected when a 404 bp amplification product is obtained.



	SA β -gal (% of cell population)	[3 H]-T (cpm)	APO J mRNA	Fibronectin mRNA
CTL	29.4 \pm 2.3	1714 \pm 189.1	100	100
UVB	47.8 \pm 3.0	190 \pm 20	170 \pm 10	
UVB + A1	3.8 \pm 0.5	672.5 \pm 66.2	180 \pm 20	110 \pm 40
UVB + A2	40.2 \pm 0.8	817.5 \pm 156.0	150 \pm 10	220 \pm 20
UVB + A3	39.3 \pm 3.9	815.7 \pm 148.9	160 \pm 10	240 \pm 40

A



B

Figure 3

Figure 4

Effect of 10 exposures of HDFs at early CPDs to UVB at 250 mJ/cm² per exposure on the intracellular and extracellular protein level of apo J.

(4.A.) Analysis of intracellular and extracellular protein level of apo J by western blotting. Proteins were extracted at 72 h after the last stress. α -tubulin protein level was used as reference level to estimate the intracellular level of Apo J while the same volume of collected medium was used to determine the extracellular levels.

(4.B.) Quantification of the protein level. The results are expressed as 100% of the protein level in control cells (CTL).

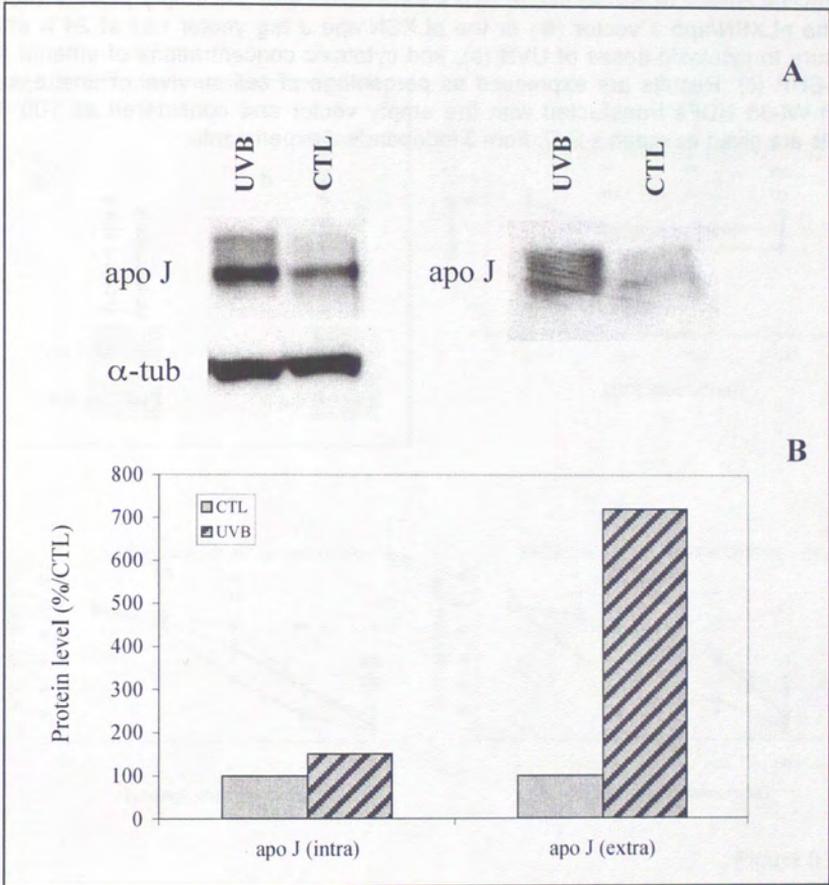


Figure 4

Figure 5

(A) Overexpression of apo J and apo J-V5/His tag after transfection in SV-40 WI-38 HDFs compared with SV-40 WI-38 HDFs transfected with the empty pLXSN vector. Western blots were performed as described in materials and methods.

(B) Survival curves of SV-40 WI-38 HDFs transfected with the empty pLXSN vector (■), the pLXSN/apo J vector (●) or the pLXSN/apo J tag vector (▲) at 24 h after exposure to cytotoxic doses of UVB (a), and cytotoxic concentrations of ethanol (b) and *t*-BHP (c). Results are expressed as percentage of cell survival of unstressed SV-40 WI-38 HDFs transfected with the empty vector and considered as 100 %. Results are given as mean \pm S.D. from 3 independent experiments.



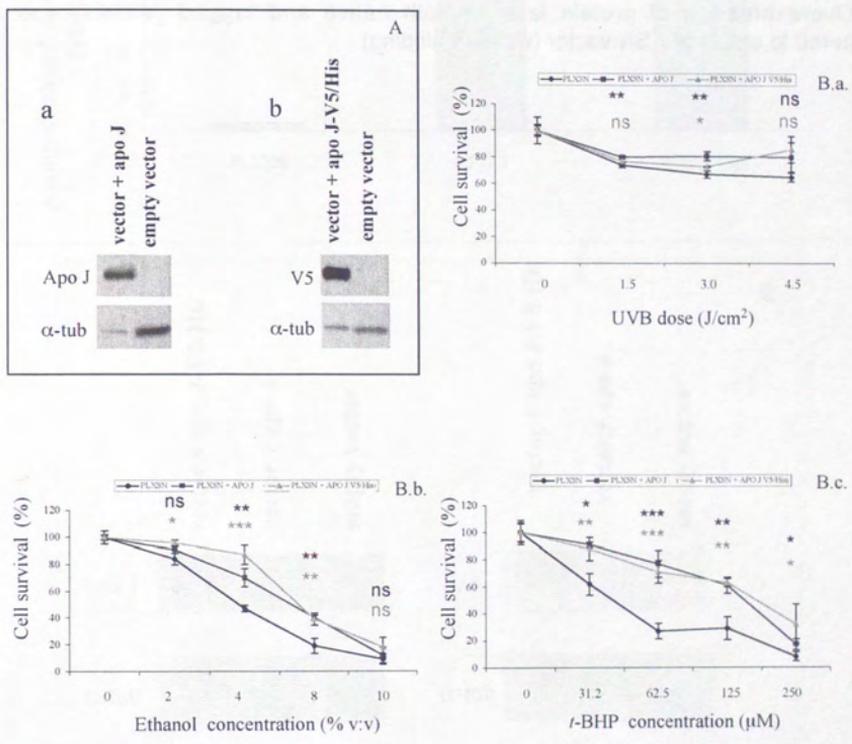


Figure 5

Figure 6

Overexpression of human apolipoprotein J (apo J) after retrovirally-mediated overexpression in skin HDFs.

(A) Overexpression at mRNA level of both native and tagged (V5/His) apo J compared to empty pLXSN vector. Real-time RT-PCR was used to detect apo J mRNA.

(B) Overexpression of protein level of both native and tagged (V5/His) apo J compared to empty pLXSN vector (western blotting).



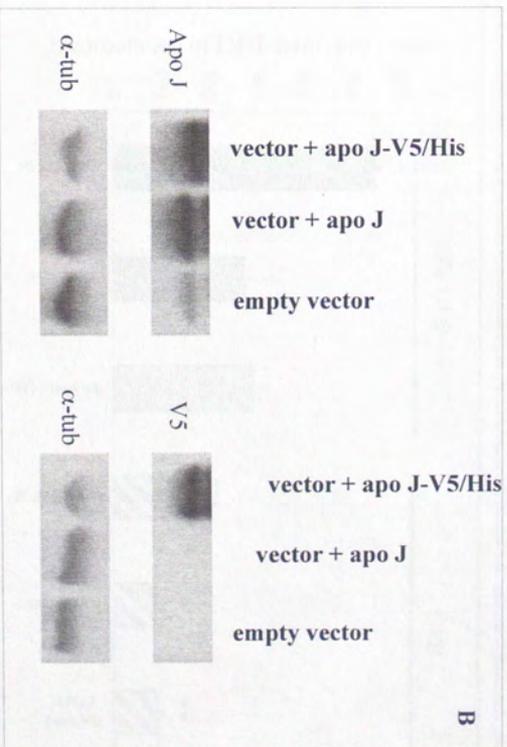
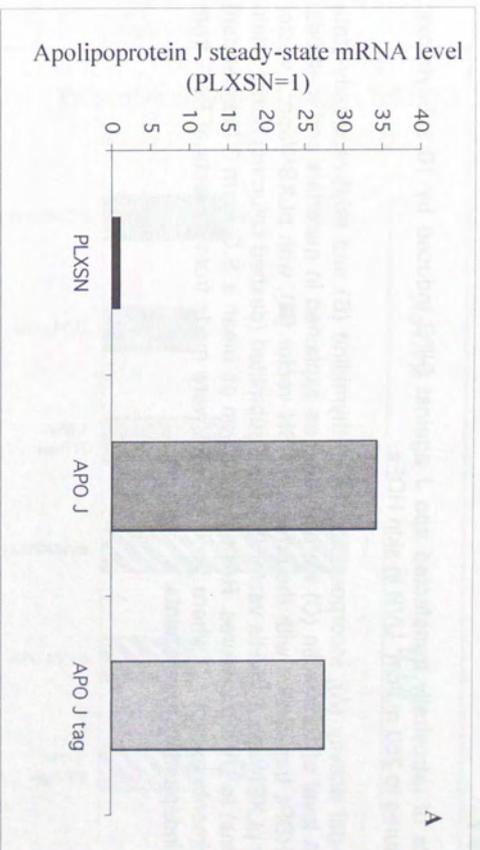


Figure 6

Figure 7

Effects of retrovirally transfected apo J against SIPS induced by 10 subcytotoxic exposures to 250 mJ/cm² UVB in skin HDFs.

SA β -gal activity (A), incorporation of [³H]-thymidine (B) and relative steady-state mRNA level of fibronectin (C) were studied as explained in materials and methods. Skin HDFs transfected with the empty pLXSN vector (■), with pLXSN/apo J vector (▣) or pLXSN/apo J-V5/His vector (□) were submitted (dashed columns) or not (plain columns) to UVB exposures. Results are given as mean \pm S.D. from 3 independent experiments except (C) where pools of RNA were made from extracts of RNA from three independent experiments.

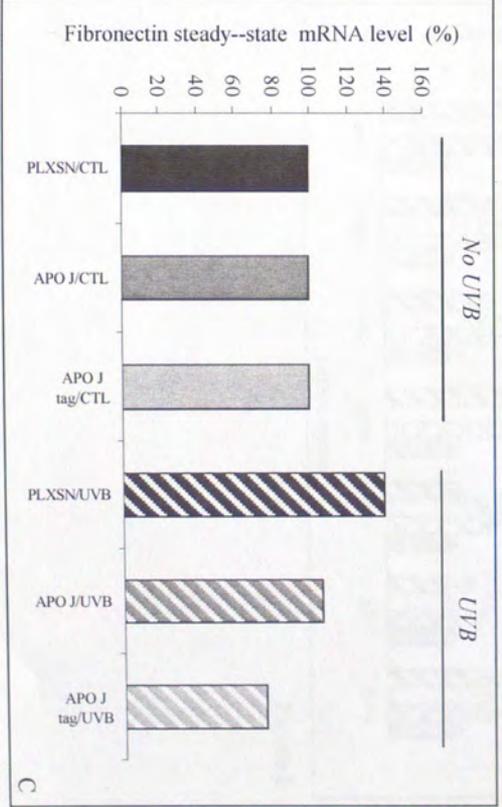
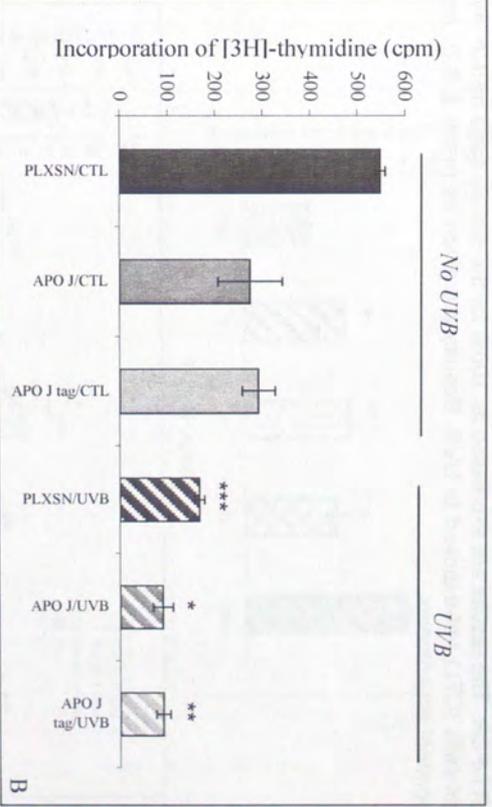
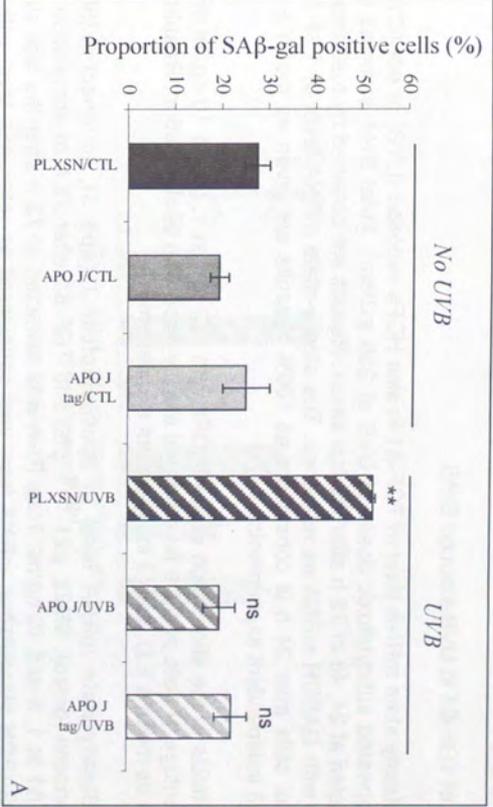


Figure 7

Figure 8

Role of TGF- β 1 in UVB-induced SIPS

(A) Steady-state mRNA level of TGF- β 1 in skin HDFs exposed (UVB) or not (CTL) to 10 repeated subcytotoxic doses of UVB at 250 mJ/cm². Total RNA samples were extracted at 24, 48 or 72 h after the last stress. Results are obtained by real time RT-PCR with GAPDH mRNA as reference. The steady-state mRNA level of TGF- β 1 in control cells after 24 h is considered as 100%. Results are given as mean \pm S.D. from 3 independent experiments.

(B) Effects of the stimulation of skin HDFs with TGF- β 1 at 1, 5 and 10 ng/ml on the percentage of cells positive for SA β -gal activity after 72 h of stimulation. Results are given as mean \pm S.D. from 3 independent experiments.

(C) Steady-state mRNA level of apolipoprotein J (apo J), fibronectin (fibro), osteonectin (osteo), SM22, p21^{WAF-1}, p53 and TGF- β 1 after 72 h of stimulation with TGF- β 1 at 1, 5 and 10 ng/ml. Total RNA was extracted at 72 h after the last stress. The GAPDH steady-state mRNA level was considered as reference level with real time RT-PCR. The results are expressed as 100% for the steady-state mRNA level in control cells (CTL) not exposed to UVB. Results are given as mean \pm S.D. from 3 independent experiments.



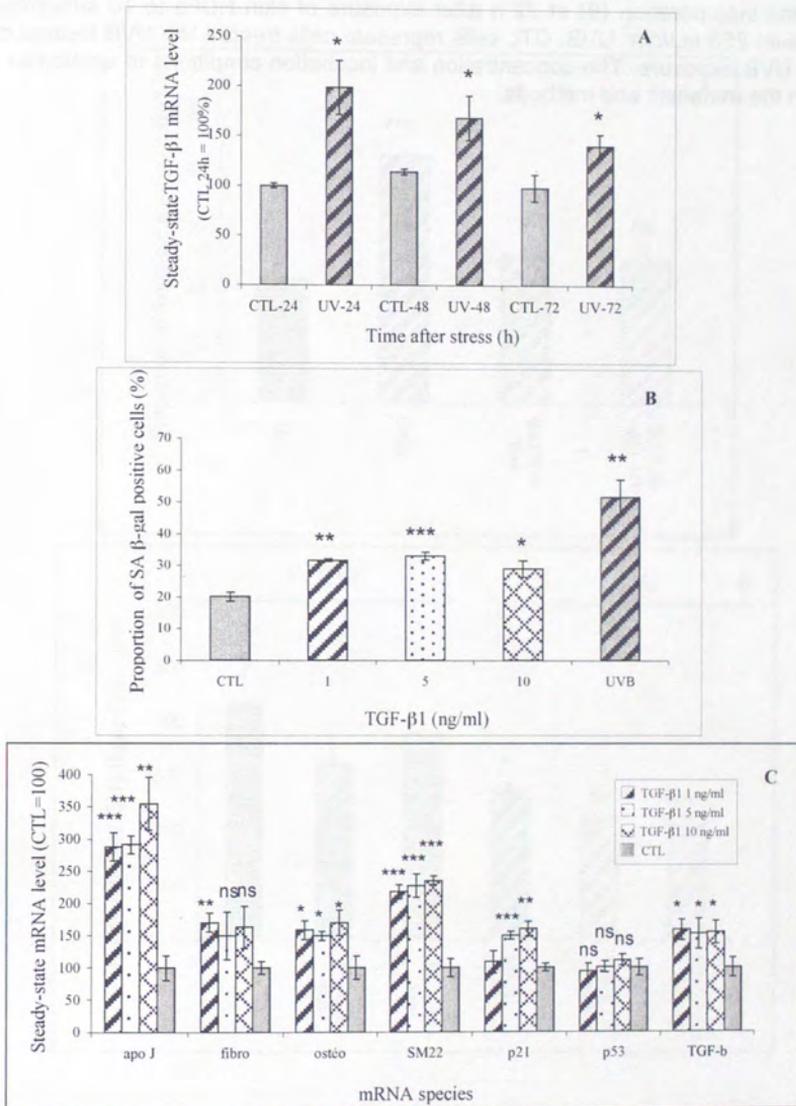


Figure 8

Figure 9

Effect of anti-TGF β -1 receptor II and anti-TGF- β 1-neutralizing antibodies on the proportion of cells positive for SA β -gal activity (A) and the incorporation of [3 H]-thymidine incorporation (B) at 72 h after exposure of skin HDFs to 10 subcytotoxic stress with 250 mJ/cm 2 UVB. CTL cells represent cells treated like UVB-treated cells except UVB exposure. The concentration and incubation conditions of antibodies are given in the materials and methods.



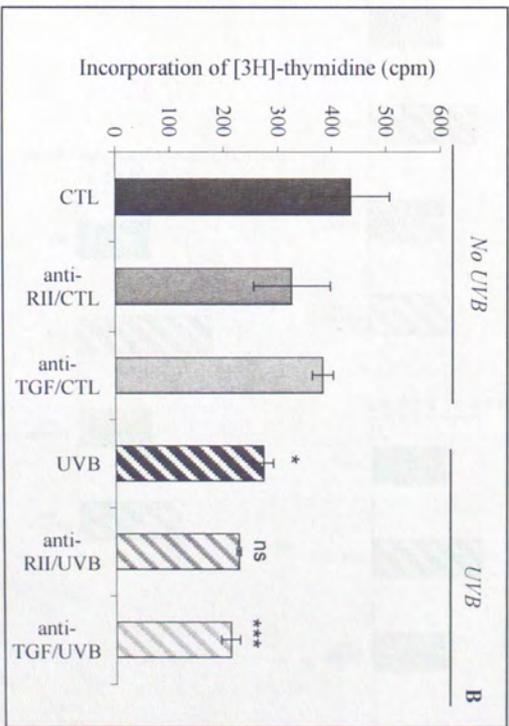
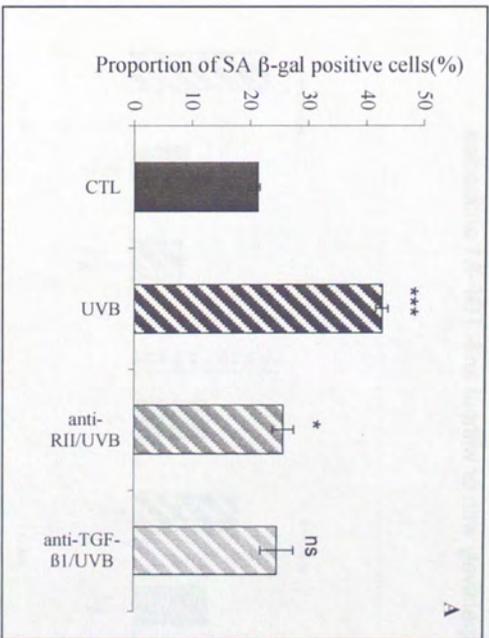


Figure 9

Figure 10

Effects of anti-TGF- β 1 neutralizing antibodies (3 μ g/ml) on the steady-state mRNA level of fibronectin (A), osteonectin (B), SM22 (C), TGF- β 1 (D) and p21^{WAF-1} (E) at 72 h after a series of 10 exposures of skin HDFs to UVB at 250 mJ/cm². Anti-TGF CTL and CTL represents cells treated like UVB treated cells except UVB exposure and incubated respectively with or without anti-TGF- β 1 antibodies.



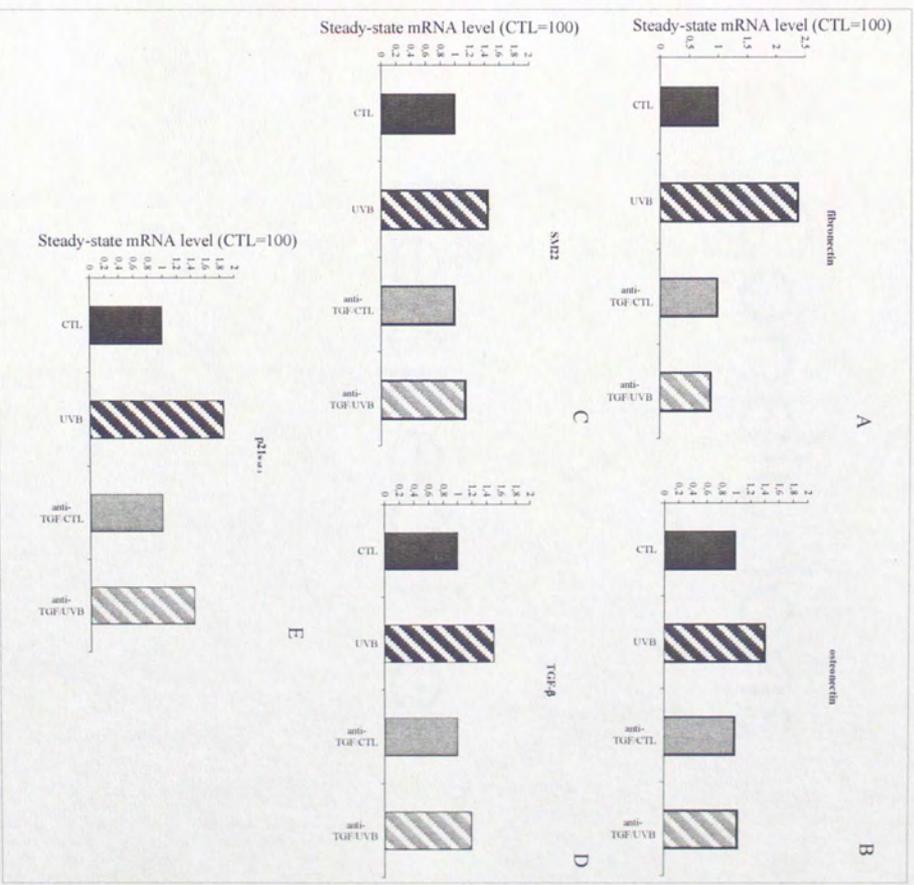
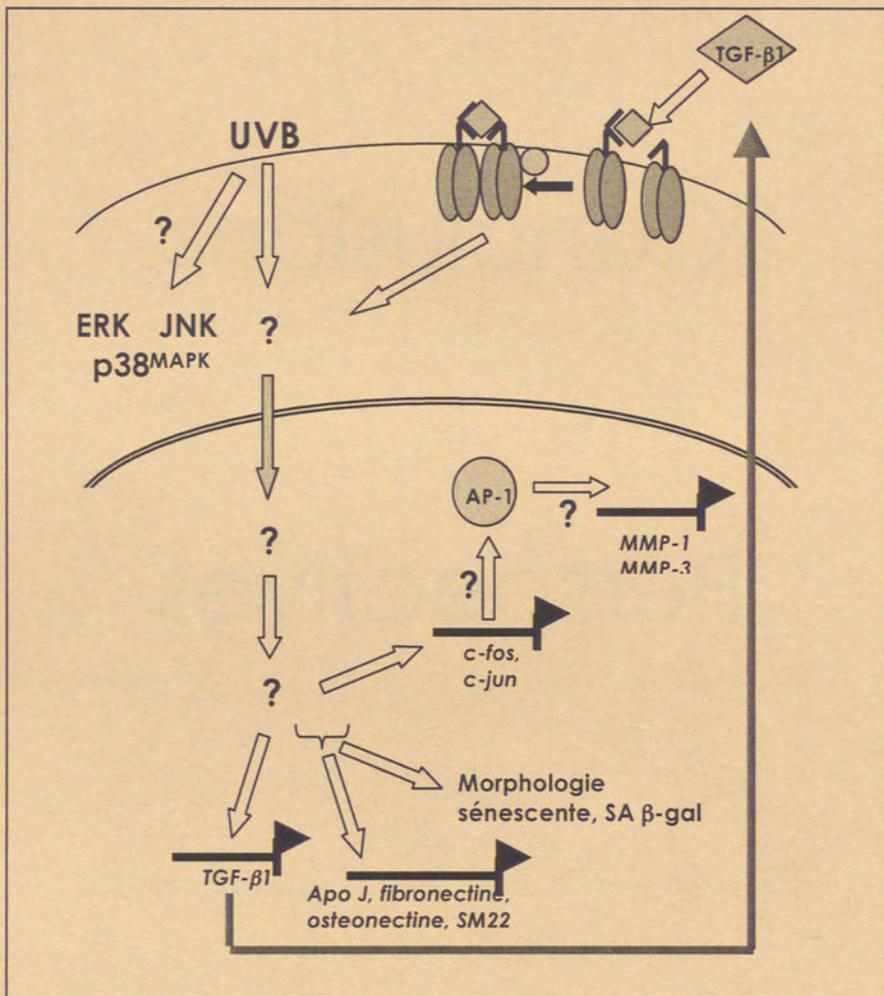


Figure 10

Conclusions
&
Perspectives



DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La peau, un modèle de choix pour l'étude du vieillissement

En 1961, Hayflick et Moorhead, en montrant que les fibroblastes humains diploïdes (FHDs) avaient une capacité proliférative limitée, brisaient le mythe de l'immortalité des cellules maintenues en culture. Depuis, les recherches menées sur le vieillissement ont pris un essor considérable qui n'a fait que s'accroître depuis une vingtaine d'années.

Ainsi, des recherches sont réalisées sur différents types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les kératinocytes ou les fibroblastes afin de caractériser et de comprendre les mécanismes intervenant dans l'établissement de la sénescence répliquative. D'autre part, les études génétiques réalisées sur les organismes modèles tels, entre autres, que *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila megalonaster* ou *Mus musculus* ont apporté de précieuses informations sur les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus de vieillissement (pour une revue, voir Finkel T. and Holbrook N., 2000).

Toutefois, il faut toujours rester prudent quant à la transposition de ces résultats aux mécanismes impliqués dans le vieillissement des tissus et des organes humains.

C'est pourquoi beaucoup d'études sur le vieillissement sont actuellement réalisées sur la peau, qui outre son intérêt dans l'industrie des cosmétiques, offre de nombreux avantages pour une recherche fondamentale. En effet, la peau présente l'avantage d'être un organe facilement accessible et ne nécessite pas le recours à des techniques invasives, toujours plus délicates à mettre en oeuvre. De plus, de nombreuses preuves tendent à démontrer que les mécanismes intervenants dans le vieillissement cutané sont assez représentatifs et peuvent servir de modèle au vieillissement d'autres organes tels, entre autres, que le système cardio-vasculaire, les os et le cerveau (Wlaschek M. *et al.*, 2003). De plus, l'étude des mécanismes impliqués dans le vieillissement cutané permettra d'avancer dans la compréhension des mécanismes impliqués dans les maladies dégénératives du tissu conjonctif comme l'ostéoarthritis, l'ostéoporose et l'athérosclérose (Krieg T. *et al.*, 1988). Les études réalisées sur le vieillissement cutané permettent de discerner l'impact de l'environnement sur celui-ci. En effet, comme nous l'avons présenté dans l'introduction, on peut discerner deux composantes du vieillissement cutané. Ces deux composantes sont d'une part une composante intrinsèque, principalement déterminée génétiquement et comparable au vieillissement d'autres organes, et d'autre part une composante extrinsèque résultant de l'impact de l'environnement et principalement du rayonnement ultraviolet. Ainsi, suivant les zones cutanées étudiées, plus ou moins soumise au rayonnement solaire, la peau présentera des caractéristiques dermatologiques et histologiques différentes. Toutefois, la plupart

des recherches effectuées tendent à montrer que les mécanismes moléculaires sous-jacents sont relativement identiques dans les deux cas et que le rayonnement UV ne ferait qu'accélérer ces mécanismes.

Implication des ROS dans le vieillissement de la peau

Une des théories principales du vieillissement est la théorie dite des radicaux libres (Harman D., 1956). Cette théorie repose sur le concept que le vieillissement résulterait d'une accumulation des dommages causés par les ROS et d'une diminution des mécanismes de défense de la cellule dont les enzymes anti-oxydantes. Est-ce que cette théorie pourrait être appliquée à la compréhension du vieillissement de la peau ?

La peau est particulièrement soumise aux dommages oxydatifs. Ceux-ci peuvent être générés par des sources exogènes, telles que la pollution (fumée de cigarettes, etc.), l'ozone ou les rayons ultraviolets, qu'ils soient de type A (UVA) ou de type B (UVB) (Kohen R. and Gati I., 2000). Ils peuvent également être produits par des sources endogènes lors du processus d'inflammation via l'activation des neutrophiles (Ginsburg I. and Kohen R., 1995). Afin de pouvoir faire face aux dommages oxydatifs, la peau possède un système enzymatique anti-oxydant particulièrement efficace, voir supérieur à la plupart des organes (Kohen R. and Gati I., 2000). Il est proposé que la diminution de l'efficacité de ce système soit un facteur important intervenant dans le vieillissement de la peau. Ceci est encore matière à controverse. En effet, certains articles ont montré une diminution de l'efficacité des enzymes anti-oxydantes dans la peau avec l'âge. Citons par exemple une diminution de la Cu,Zn-superoxyde dismutase, de la catalase et de la glutathion peroxydase (Wei Y.H. *et al.*, 2001 ; Kohen R. and Gati I., 2000). Par contre, il a été démontré, chez la souris, que l'activité de la Cu,Zn-superoxyde dismutase, de la catalase et de la glutathion reductase dans la peau restaient constantes avec l'âge (Lopez-Torris M. *et al.*, 1994). Une autre étude a montré que les fibroblastes issus de donneurs âgés étaient plus vulnérables à l'accumulation de protéines oxydées générées par un stress oxydatif et étaient moins capables de réparer ou de détruire ces protéines que des fibroblastes issus de donneurs plus jeunes (Mercker K. *et al.*, 2000).

De plus, il a été montré que les ROS engendraient des changements des protéines de structure du tissu conjonctif du derme. Ainsi, les ROS engendrent l'augmentation du niveau d'ARN-m de la tropo-élastine (Kawaguchi Y. *et al.*, 1997). Enfin, les ROS jouent un rôle important dans le métabolisme du collagène, d'une part en détruisant le collagène interstitiel et d'autre part en inactivant les TIMPs et en augmentant la synthèse et l'activation des MMPs (pour une revue, Rittié L. and Fisher G., 2002). On postule donc actuellement, suite à ces différents points, que les ROS jouent un rôle important dans le vieillissement de la peau.

Mise au point d'un modèle de sénescence induite prématurément par les UVB

Malgré le nombre important de recherches réalisées *in vitro* sur la peau et sur les ROS, très peu d'études sont menées sur l'étude de l'effet à long terme des ROS sur le vieillissement de la peau.

Depuis une dizaine d'années ont émergé des modèles de stress subcytotoxiques engendrant à long terme l'apparition d'un vieillissement prématuré, ce qui est actuellement répertorié sous le terme de Sénescence Induite Prématurément par des Stress ou SIPS.

Lors de notre thèse, nous avons voulu étudier les effets à long terme du rayonnement UV comme modèle afin de mimer et d'étudier le photo-vieillessement de la peau. Nous avons choisi d'étudier les effets du rayonnement UV de type B (UVB) car celui-ci, bien que ne représentant que 2 % du rayonnement solaire touchant la surface de la terre, est impliqué dans plus de 95 % des dommages causés par l'exposition solaire (Rosette C. and Karin M., 1996). Les UVB sont capables de pénétrer dans la peau et d'atteindre le derme supérieur. Etant donné que leur longueur d'onde est située entre 290 et 320 nm, les UVB sont capables d'engendrer des dommages directs à l'ADN tels que les (6-4) photo-produits et les dimères de pyrimidine cyclobutane. De plus, tout comme les UVA, ils peuvent générer des stress oxydatifs via l'interaction avec des chromophores intracellulaires, ce qui va engendrer des dommages génétiques et l'activation de voies de transduction du signal liées à la croissance, à la différenciation, à la sénescence répllicative ou à la dégradation du tissu conjonctif. Ainsi, il a été montré par des preuves indirectes que l'oxygène singulet et le peroxyde d'hydrogène sont les principaux ROS impliqués dans la surexpression au niveau ARN-m et au niveau protéique des métalloprotéinases MMP-1, MMP-2 et MMP-3 suite à une exposition aux UVA (Scharffetter-Kochanek K. *et al.*, 1993 ; Hermann G. *et al.*, 1996 ; Wasckek M. *et al.*, 1995 ; Wenk J. *et al.*, 1999). Par contre, le radical hydroxyl et les intermédiaires de la peroxydation lipidique tels que la malondialdéhyde (MDA) et la 4-hydroxy-2(E)-nonenal (4-HNE) semblent quant à eux impliqués dans l'induction de la MMP-1 et de la MMP-3 suite à une exposition aux UVB (Brenneissen J. *et al.*, 1998). Enfin, le rayonnement UVB semble engendrer les mêmes dommages que ceux générés par le rayonnement solaire dans la peau *in vivo* (Quan T. *et al.*, 2002).

Nous avons donc réalisé les mises au point d'un modèle permettant d'étudier les effets à long terme du rayonnement UV. Nous avons choisi d'étudier l'effet de stress sous UVB sur des FHDs de peau.

Ce modèle devait impérativement répondre à deux critères fondamentaux. Tout d'abord, les doses d'UVB utilisées ne devaient induire aucune ou très peu de cytotoxicité. Nous avons donc recherché des doses subcytotoxiques en déterminant la concentration protéique de nos échantillons à 24 h après le dernier stress. Des études précédemment réalisées au laboratoire avaient montré une très bonne corrélation entre le nombre de cellules vivantes et la concentration protéique des

échantillons (Dumont P. *et al.*, 2000). Plusieurs modèles ont ainsi été mis au point constitués de 3, 5 ou 10 stress répétés aux doses subcytotoxiques respectives de 625 mJ/cm², 500 mJ/cm² ou 250 mJ/cm². On observe donc un effet cumulatif des stress : au plus le nombre de stress est élevé, plus faible est la dose d'UVB n'engendrant aucune cytotoxicité.

Ensuite, les modèles mis au point devaient engendrer l'apparition de biomarqueurs de la sénescence pris comme référence. Les modèles de SIPS préalablement mis au point au laboratoire nous ont poussé à déterminer l'apparition de ces biomarqueurs à 72 heures après les stress. Il s'est avéré que le modèle composé de 10 stress successifs à 250 mJ/cm² engendrait l'apparition la plus importante de ces différents biomarqueurs. Dans la suite de notre travail, c'est donc sur ce dernier modèle, qui est sans doute plus représentatif des conditions physiologiques *in vivo*, que nous nous sommes basés afin de réaliser des études mécanistiques et fonctionnelles.

Etude de la morphologie

Les fibroblastes suivent une certaine évolution morphologique en culture au fur et à mesure des passages en culture. Ainsi, Bayreuther *et al.* (1989) ont déterminé la présence de 7 états morphologiques distincts, appelés morphotypes, dont la proportion varie en fonction des passages en culture des FHDs. Suite à 10 stress sous UVB, nous avons observé un enrichissement de la population en morphotypes dits post-mitotiques au détriment des morphotypes mitotiques, ce qui révèle donc un vieillissement de la population des FHDs stressés.

Etude de l'activité SA β -gal

Les FHDs soumis à 3, 5 ou 10 stress sous UVB présentent un enrichissement de cellules positives à l'activité SA β -gal et ce, d'autant plus que le nombre de stress est élevé. Ce marqueur, spécifique des cellules sénescences, est également activé lors de la SIPS induite par l'H₂O₂ ou le *t*-BHP chez les FHDs de poumon (Dumont P. *et al.*, 2000). Cette activité, aisément mise en évidence par une coloration histochimique, est également présente chez les cellules sénescences *in vivo* (Dimri *et al.*, 1995). Dimri *et al.* ont de plus montré que cette activité était présente dans des fibroblastes ou des kératinocytes issus de biopsies de peau et que le pourcentage de cellules positives à cette activité enzymatique était plus importante dans des biopsies de peau issues de donneurs âgés comparé à des biopsies de peau réalisées chez des individus plus jeunes.

Etude de la délétion commune de 4,977 pb de l'ADN mitochondrial

On détecte chez les FHDs soumis à 10 stress sous UVB la délétion dite « commune » de 4.977 pb de l'ADN mitochondrial. Celle-ci est également détectée chez des FHDs de poumon sénescents ou soumis à la SIPS induite par l'H₂O₂ ou le *t*-BHP (Dumont P. *et al.*, 2000). Ce marqueur a également été observé dans des biopsies de peau. En effet, Pang *et al.* (1994) ont montré que cette délétion avait une incidence plus importante dans des biopsies de peau issues de zones exposées au soleil par rapport à des zones protégées. Ce marqueur serait donc relativement spécifique du photo-vieillessement. De plus, il a été montré que cette délétion était principalement retrouvée dans le derme plutôt que dans l'épiderme (Birch-Machin M. *et al.*, 1998). Berneburg *et al.* (1999) ont montré que cette délétion était également détectable chez des FHDs de peau soumis à des stress répétés aux UVA et que cette délétion était médiée par l'oxygène singulet.

Diminution de la capacité proliférative

Principale caractéristique des cellules sénescents, l'arrêt de la prolifération a été mis en évidence chez les cellules soumises à 3, 5 ou 10 stress d'UVB via l'étude de l'incorporation de [³H]-thymidine dans l'ADN. On a montré que cet arrêt était d'autant plus marqué que le nombre de stress et que la dose d'UVB utilisée était importante. Il a été montré chez les FHDs soumis à 10 stress sous UVB que le niveau relatif d'ARN-m de p21^{WAF-1} et de p53 était surexprimé ainsi que le niveau protéique de p16^{INK-4A}, p21^{WAF-1} et p53. Cet arrêt de la prolifération est également détecté chez des FHDs de poumon sénescents ou en SIPS induite par l'H₂O₂ ou le *t*-BHP (Dumont P. *et al.*, 2000). Le mécanisme impliqué dans l'arrêt de la prolifération en sénescence répliquative est le suivant. Le raccourcissement des télomères arrivant à une longueur critique est ressenti comme un dommage important à l'ADN et mène à l'activation du facteur de transcription p53. Celui-ci engendre la surexpression de l'inhibiteur de kinase dépendante de cycline (CDKI) p21^{WAF-1}. p21^{WAF-1} empêche la phosphorylation et l'inactivation de pRb (Sherr C. and Roberts J., 1999). Une autre voie, dépendante de la CDKI p16^{INK-4A} contrôle également l'activité de pRb (Alcorta D. *et al.*, 1996). Cette voie est activée par un mécanisme encore inconnu actuellement mais indépendant du raccourcissement des télomères (Rheinwald J. *et al.*, 2002). Cette voie constitue donc une deuxième barrière à la division cellulaire qui semble, quant à elle, irréversible (Beauséjour C. *et al.*, 2003).

Surexpression du niveau relatif d'ARN-m de *c-fos* et de *c-jun*

Une augmentation du niveau relatif d'ARN-m de *c-fos* et de *c-jun* a été mise en évidence chez les FHDs de peau soumis à 10 stress sous UVB. Notons que *c-fos* est plutôt connu pour être réprimé lors de la sénescence répliquative, expliquant en partie l'arrêt de la prolifération. Le niveau relatif d'ARN-m de *c-fos* est réprimé chez les FHDs en SIPS induite par le *t*-BHP (Dumont P. *et al.*, 2000). Toutefois, il a été montré que *c-fos* était exprimé à un niveau basal relativement élevé dans la peau humaine (Fisher G. and Voorhees J., 1998) et que les UV induisent une surexpression de *c-jun* au niveau de l'ARN-m et protéique dans la peau humaine *in vivo* (Fisher G. *et al.*, 1998). *c-Jun* entrerait alors en compétition avec JunD pour l'association avec *c-Fos*, formant ainsi des complexes hétérodimériques *c-Jun* :*c-Fos* formant le facteur AP-1. AP-1 est surexprimé dans la peau *in vivo* suite à une exposition aux UV, et ce aussi bien dans l'épiderme que dans le derme (Fisher G.J. and Voorhees J.J., 1998, Angel P. *et al.*, 2001). AP-1 serait ensuite impliqué dans la surexpression des métalloprotéinases, et plus particulièrement des MMP-1, MMP-3 et MMP-9, engendrant ainsi la dégradation de la matrice extracellulaire (Fisher G.J. *et al.*, 1996, 1997) suite à l'exposition de peau humaine au rayonnement UV. Notons que des études préliminaires réalisées suite à 10 stress successifs sous UVB ont montré une surexpression du niveau relatif d'ARN-m de MMP-1, ce qui va dans le même sens que ce qui est décrit *in vivo*.

Etude du niveau relatif d'ARN-m de la fibronectine, de l'ostéonectine et de SM22

Nous avons montré une augmentation du niveau d'ARN-m de la fibronectine, de l'ostéonectine et de SM22 suite à 3, 5 ou 10 stress sous UVB. La fibronectine est un composant essentiel de la matrice extracellulaire impliquée dans de nombreuses fonctions telles que l'adhésion cellulaire, l'organisation du cytosquelette, la médiation de signaux mitogènes et la réparation tissulaire. Elle jouerait également un rôle dans les changements morphologiques chez les cellules sénescents (Kumazaki T. *et al.*, 1993). L'ostéonectine et SM22 sont deux protéines de liaison au calcium (Funk S. and Sage E., 1991, Lecka-Czernick B. *et al.*, 1996). L'ostéonectine inhibe de plus l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire. Ces gènes sont également surexprimés chez des FHDs de poumon sénescents ou soumis à la SIPS induite par l'H₂O₂ ou le *t*-BHP (Dumont P. *et al.*, 2000). Il serait intéressant de réaliser des profils d'expression génique à plus grande échelle via par exemple l'utilisation de damiers à ADN afin de dresser un profil assez complet de l'ensemble des changements d'expression génique présents dans notre modèle. En effet, lors de l'élaboration de ce modèle, nous avons principalement vérifié le niveau d'expression de gènes connus pour être associés à la sénescence. Une étude à plus

grande échelle et sans *à priori* serait d'une importance cruciale dans la suite du développement de nos recherches. Notons que plusieurs études ont été réalisées sur les profils d'expression génique obtenus suite à des stress UVB sur des kératinocytes (Sesto A. *et al.*, 2002 ; Li D. *et al.*, 2001). Ces études ont principalement montré une surexpression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et dans la réponse aux stress de même que dans la transcription basale, l'épissage, la traduction et la dégradation liée au protéasome tandis que les gènes impliqués dans le métabolisme étaient sous-exprimés.

Etude de l'effet d'extraits d'algues sur l'apparition des différents biomarqueurs de la sénescence cellulaire dans la SIPS induite par 10 stress sous UVB

Une fois le modèle de SIPS induite par les UVB établi, nous avons étudié l'impact de l'incubation des FHDs de derme soumis à la SIPS induite par 10 stress UVB avec des extraits d'algues. La première partie de ce travail, réalisée sur 13 extraits d'algues, a consisté en la recherche d'une dose subcytotoxique de ces extraits. Ensuite, nous avons réalisé les premiers tests de protection qui consistaient en une étude de la protection éventuelle de ces extraits sur la cytotoxicité induite par des doses élevées d'UVB. Un premier tri de ces échantillons a alors été effectué sur base de leur effet protecteur de la SIPS induite par les UVB via l'étude de la proportion de cellules positives à la SA β -gal et l'étude de la prolifération via l'incorporation de [3 H]-thymidine. Nous avons sélectionné trois échantillons suite à ces tests préliminaires que nous avons arbitrairement appelés A1, A2 et A3. Nous avons étudié la protection de ces trois échantillons face à la SIPS induite par les UVB en contrôlant la morphologie cellulaire, le niveau relatif d'ARN-m de l'*apo J* et de la *fibronectine* ainsi que la détection de la délétion commune de 4.977 pb de l'ADN mitochondrial. Nous avons pu ainsi mettre en évidence une protection plus ou moins marquée de ces trois extraits par rapport à ces différents biomarqueurs de la sénescence cellulaire. Ces résultats nous permettent donc de proposer que ce modèle de SIPS induite par UVB pourrait être utilisé comme nouvel outil toxicologique. Celui-ci présente l'originalité d'étudier les effets à long terme de doses non cytotoxiques de composés sur l'apparition des différents biomarqueurs de la sénescence cellulaire sur les FHDs de peau soumis à ces stress répétés sous UVB, et donc représente un modèle simplifié pour étudier l'effet de ces composés sur le photo-vieillessement du derme. Ce modèle est tout à fait innovant car la plupart des tests actuellement utilisés dans le domaine des cosmétiques sont des tests de cytotoxicité, des tests d'irritation, des études d'une fonction ou d'une activité enzymatique spécifique, des tests tératogènes ou mutagènes (Toussaint O. *et al.*, 2003). C'est ainsi que le principe même de la SIPS peut être utilisée comme modèle toxicologique afin d'étudier les effets à long terme d'une ou de plusieurs expositions

à des molécules utilisées à des doses subcytotoxiques ou d'étudier l'effet protecteur d'autres molécules envers ces effets néfastes.

Etude de l'expression et de la transfection de l'apolipoprotéine

J (apo J)

L'apo J a, quant à elle, plus particulièrement attiré notre attention. En effet, l'apo J, également connue sous le nom de clusterine, est une glycoprotéine hétérodimérique dont la fonction présumée est celle de protéine-chaperon extracellulaire (Poon S. *et al.*, 2002). Son activité est en effet semblable à celle des heat shock proteins (Humphreys D. *et al.*, 1999). Nous avons mis en évidence que l'apo J était surexprimée au niveau de l'ARN-m chez les FHDs soumis à 10 stress sous UVB. Ceci avait également été détecté chez des FHDs de poumon sénescents ou en SIPS induite par l' H_2O_2 ou le *t*-BHP (Dumont P. *et al.*, 2000). En SIPS induite par les UVB, nous avons montré que le niveau protéique intracellulaire de l'apo J était augmenté. Une forte élévation du niveau de l'apo J est aussi observée dans le milieu de culture indiquant un niveau plus élevé de sécrétion. Des études sur l'apo J avaient déjà été menées au sein de notre laboratoire via l'étude des effets de la transfection de la séquence de l'apo J de chien (gp80) sur la cytotoxicité de stress à fortes doses de *t*-BHP et d'éthanol et sur la SIPS induite par le *t*-BHP (Dumont P. *et al.*, 2002). Nous avons donc voulu étudier l'effet de la surexpression de l'apo J sur la cytotoxicité induite par de fortes doses d'UVB et sur la SIPS induite par les UVB. Etant donné que la séquence humaine de l'ADNc de l'apo J était disponible, nous avons réalisé des transfusions de l'ADNc de l'apo J humaine, taggée ou non. Nous avons montré que les fibroblastes WI 38 SV-40 transfectés avec l'apo J montraient une cytotoxicité plus faible face à des doses toxiques d'UVB, de *t*-BHP et d'éthanol. De plus, nous avons montré que les FHDs de peau transfectés avec l'apo J étaient protégés de l'activation de la SA β -gal ainsi que de la surexpression du niveau relatif d'ARN-m de la fibronectine induits par la SIPS sous UVB.

Etude du rôle du TGF- β 1 dans l'apparition du phénotype sénéscent

Nous avons ensuite décidé d'étudier les mécanismes moléculaires responsables de l'apparition du phénotype sénéscent suite à 10 stress sous UVB. Le TGF- β 1 est impliqué dans l'apparition du phénotype sénéscent induit par la SIPS générée par un stress subcytotoxique sous H₂O₂ (Fripiat C. *et al.*, 2001). Nous avons montré que le niveau relatif d'ARN-m du TGF- β 1 était surexprimé à 24, 48 et 72 h après le dernier stress UVB. nous avons également montré que la stimulation de FHDs de peau à différentes doses de TGF- β 1 induisait une morphologie sénéscente, une augmentation de la proportion de cellules positives à l'activité SA β -gal ainsi que la surexpression du niveau relatif d'ARN-m de gènes associés à la sénescence cellulaire. De plus, la neutralisation du TGF- β 1 ou de son récepteur de type II (tbRII) suite à une série de 10 stress sous UVB induisant la SIPS diminuait le nombre de cellules présentant une activité SA β -gal et n'engendre plus de surexpression du niveau relatif d'ARN-m de la *fibronectine*, de l'*ostéonectine* et de *SM22*. Lors de la SIPS induite par l'H₂O₂, Fripiat *et al.* (2003) ont montré que p38^{MAPK} est activée et est responsable de la surexpression du TGF- β 1. Lorsque le TGF- β 1 est surexprimé, il engendre une boucle de rétro-action positive de l'activation de p38^{MAPK} qui cette fois est maintenue à long terme. p38^{MAPK} phosphoryle et active le facteur de transcription ATF-2 qui, de part son interaction avec la protéine de rétinoblastome (pRb) hypophosphorylée, est responsable de l'apparition des différents biomarqueurs de la sénescence cellulaire. Il serait donc intéressant d'étudier si dans notre modèle de SIPS induite par les UVB, la même voie est activée et donc de déterminer le rôle de p38^{MAPK}, d'ATF-2 et de pRb dans l'apparition des différents biomarqueurs de la sénescence cellulaire. Notons que nous savons déjà que l'activité de liaison à l'ADN d'ATF-2 est augmentée pendant au moins 72 h après une série de 10 stress sous UVB enclenchant la SIPS (non publié).

Cette voie représente donc un intérêt tout particulier et son implication expliquerait en grande partie l'apparition des différents biomarqueurs. Toutefois, cette voie ne semble pas expliquer l'arrêt de la prolifération ni chez les FHDs soumis à la SIPS induite par l'H₂O₂ ni chez les FHDs soumis à la SIPS induite par les UVB. Il est donc plus que probable que d'autres voies sont encore à découvrir ou à développer. Ainsi, nous avons montré que la voie dépendante du facteur de transcription p53, probablement activé suite à des dommages à l'ADN, semblait particulièrement activée dans notre modèle de SIPS induite par les UVB. Il est évident que cette voie a un rôle crucial dans l'arrêt des divisions cellulaires observées dans ce modèle. Une voie qui aurait pu être intéressante dans ce cadre était la voie dépendante du raccourcissement des télomères mais nous avons montré que des FHDs de derme immortalisés avec la sous-unité catalytique h-TERT (BJ-h-TERT) développaient également les différents biomarqueurs de la sénescence

suite à une exposition répétée à des doses subcytotoxiques d'UVB (de Magalhaes J.-P. *et al.*, 2002).

En ce qui concerne le rôle joué par le TGF- β 1 dans la peau, on sait que le niveau relatif d'ARN-m du TGF- β 1 est surexprimé après une exposition aux UVB dans la peau *in vivo* (Quan T. *et al.*, 2002), au contraire du TGF- β 2. Il semble donc que les isoformes du TGF- β sont différemment exprimées et régulées en réponse au stress UVB. La fonction spécifique de chacune des isoformes du TGF- β dans le photo-vieillessement et dans la tumorigenèse reste donc encore à être élucidée. D'autre part, il a été montré que le niveau d'ARN-m du TGF- β 1 était également augmenté à court terme chez des fibroblastes après une exposition unique aux UVB et que le TGF- β 1 induisait l'expression de hsp 70 (Cao Y. *et al.*, 1999). L'étude des voies de transduction induite lors de la SIPS sous UVB pourrait donc apporter de précieuses informations quant au rôle joué par le TGF- β 1 dans le photo-vieillessement cutané.

Ce modèle de sénescence induite prématurément par des stress UVB engendre chez les cellules stressées une série de caractéristiques de la sénescence répliative. De plus, l'état de ces cellules stressées semble assez proche de l'état de fibroblastes *in vivo*, lors du photo-vieillessement. Ce modèle peut donc être présenté comme modèle simplifié d'étude du photo-vieillessement du derme. De plus, ce modèle offre l'avantage d'étudier les effets à long terme des UVB sur les FHDs. En effet, la plupart des recherches qui sont réalisées sur les UV étudient les effets à court terme de ceux-ci. Or, il a été montré qu'en ce qui concernait l'activité des antioxydants activés suite à une exposition couplée d'UVA et d'UVB, les effets à court terme se différencient des effets à long terme. Ainsi, une diminution de l'activité de la catalase, de la glutathion peroxydase et de la Mn-superoxyde dismutase est observée à court terme (4 heures) après l'exposition. Toutefois, 5 jours plus tard, les activités enzymatiques antioxydantes retournaient soit au niveau d'activité qu'elles avaient avant l'exposition (catalase), soit à un niveau supérieur (glutathion peroxydase, Cu,Zn-superoxyde dismutase, Mn-superoxyde dismutase) (Leccia M.T. *et al.*, 2001).

Notons que des études ont montré que des fibroblastes issus de biopsies de patients ayant subi une pUVA thérapie (ingestion de psoralène + exposition aux UVA) ont une capacité proliférative limitée *in vitro* comparativement à des cellules issues de donneurs non traités (Jacobson-Kram D. *et al.*, 1982). *In vitro*, le traitement de fibroblastes avec du 8-méthoxy-psoralène (8-MOP) ainsi qu'une exposition aux UVA engendre l'apparition de cellules dans un état ressemblant à la sénescence (Herrmann G. *et al.*, 1998), caractérisées par l'apparition de cellules post-mitotiques ainsi que par la surexpression de MMP-1 et MMP-3.

Etude de l'expression génique et protéique

Maintenant que nous disposons d'un modèle robuste de SIPS induite par les UVB chez les FHDs de derme, il serait intéressant, comme nous l'avons déjà commencé lors de l'élaboration de ce modèle et lors des études mécanistiques du rôle joué par le TGF- β 1, d'intégrer notre modèle dans les recherches qui sont actuellement réalisées au sein de notre équipe sur d'autres modèles de SIPS. Ainsi, comme nous l'avons déjà soulevé, il serait intéressant de caractériser de façon plus complète l'état des FHDs en SIPS induite par les UVB en étudiant leur profil génique globale. Ainsi, nous avons proposé l'utilisation de damiers à ADN à haute densité car des études similaires réalisées sur les kératinocytes exposés aux UVB ont apporté de précieuses informations sur les altérations provoquées par ce type de stress. Des études sont actuellement réalisées afin de dresser les changements au niveau de l'expression génique des FHDs en SIPS induite par le *t*-BHP, l'éthanol ou l' H_2O_2 . La réalisation d'une étude transcriptomique à haute échelle et la comparaison des résultats obtenus sera d'une importance particulièrement cruciale afin de mettre en évidence des mécanismes communs impliqués dans l'apparition prématurée des différents biomarqueurs de la sénescence.

Cette étude transcriptomique pourrait être adjointe d'une étude protéomique car les changements de niveau d'ARN ne sont pas forcément répercutés au niveau protéique (Gygi S. *et al.*, 1999). Ainsi, nous pourrions baser cette étude protéomique sur celle réalisée au sein de notre équipe afin de déterminer le profil des changements protéiques chez les FHDs sénescents et en SIPS induite par le *t*-BHP ou l'éthanol. Cette étude a montré que les protéines dont le niveau d'expression variait en sénescence ou en SIPS étaient des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique, les systèmes de défense, la maintenance du potentiel redox, la morphologie cellulaire et les voies de transduction du signal (Dierick J.-F. *et al.*, 2002). Plus particulièrement, neuf protéines ont été mises en évidence qui interviennent dans le métabolisme énergétique. Une modification de la respiration au profit de la glycolyse a ainsi été mise en évidence chez les FHDs sénescents ou en SIPS induit par le *t*-BHP ou l'éthanol. Or, il a été montré que la glycolyse était augmentée chez les cellules sénescents. Il serait intéressant d'étudier si ces changements sont également présents chez les cellules en SIPS induite par les UVB. Brièvement, la pyruvate kinase M 2, une enzyme régulatrice de la glycolyse, est surexprimée chez les FHDs sénescents et chez les FHDs en SIPS induite par le *t*-BHP ou l'éthanol. Par contre, ces auteurs ont observé, chez les FHDs sénescents, une diminution de l'ordre de 40 % de la quantité de glucose-6-phosphate-1-déshydrogénase (G6PDH), une enzyme intervenant dans la voie des pentoses phosphates, principale voie responsable de la production de NADPH et de ribose-5-phosphate (Kletzien R. *et al.*, 1994). Or, les cellules déficientes en G6PDH ont un phénotype proche de la sénescence (Ho H. *et al.*, 2000). Etant donné que la glutathion reductase utilise du NADPH pour réduire le glutathion, la diminution de la quantité de G6PDH pourrait expliquer la faible concentration de glutathion réduit observé chez les FHDs sénescents (Yuan H. *et al.*, 1996). Rappelons que le

glutathion est le co-facteur de la glutathion peroxydase impliquée dans la détoxification des acides gras peroxydés. Il nous semblerait donc intéressant pour ces raisons d'étudier l'activité de ces différentes enzymes ainsi que l'activation de la glycolyse et de la voie des pentoses-phosphates chez les FHDs soumis à la SIPS sous UVB.

SIPS et vieillissement *in vivo*

Une des questions fondamentales sous-jacente à ce travail est la suivante : est-ce que la SIPS est un bon modèle du vieillissement des organes *in vivo* ? et est-ce qu'un modèle tel que nous l'avons décrit permet-il d'avancer dans la compréhension du photo-vieillissement de la peau ?

Plusieurs études ont montré la présence de cellules sénescents durant le vieillissement *in vivo*, entre autres via l'étude des différents biomarqueurs de la sénescence répllicative *in vitro* tels que les changements morphologiques, l'activité de la SA β -gal, les délétions de l'ADN mitochondrial, l'augmentation de la dégradation de la matrice extracellulaire, etc. (pour une revue, voir Campisi J., 1999). Toutefois, ces cellules sénescents sont présentes en minorité dans les tissus, ceci a été nommé « mosaïque d'Hayflick » (Toussaint O. *et al.*, 2002). Malgré le fait que ces cellules soient minoritaires dans le tissu, il est probable qu'elles jouent un rôle important dans le vieillissement du tissu (Shay J.W. and Wright W.E., 2000). Est-ce que ces cellules sont la résultante d'un processus semblable à la sénescence répllicative ou à la SIPS ?

Il est plus que probable que les cellules somatiques *in vivo* n'atteignent jamais la limite extrême de leur capacité proliférative. En effet, des cellules issues de certaines biopsies de centenaires sont capables de se diviser *in vitro* pendant autant de passages que des cellules de jeunes donneurs (Tesco G. *et al.*, 1998). De plus, si on estime que, dans des conditions proches des conditions physiologiques, des cellules telles que les fibroblastes peuvent effectuer plus de 80 passages en culture avant d'atteindre la sénescence répllicative, il est difficilement envisageable que les cellules aient la possibilité d'atteindre autant de divisions *in vivo*.

Par contre, il est clair que les cellules *in vivo* sont exposées à toute une série de stress différents en fonction de leur localisation. Ainsi, par exemple, les fibroblastes et les mélanocytes sont soumis aux ultraviolets, les cellules endothéliales sont soumises à l'inflammation etc. Tous ces stress sont susceptibles d'engendrer des processus d'inflammation qui semblent quant à eux fortement liés à la SIPS. En effet, il a été montré que les mélanocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales pouvaient entrer en SIPS. De plus, des cellules possédant des caractéristiques de la sénescence se trouvent en proportion plus importante près de sites d'inflammation tels que les ulcères veineux ou l'ostéoarthrite (Mendez M.V. *et al.*, 1998 ; Price J.S. *et al.*, 2002). Il a été montré *in vitro* que la stimulation répétée de FHDs aux cytokines pro-inflammatoires interleukine-1 α (IL-1 α) ou tumor necrosis factor- α (TNF- α) induisait la SIPS (Toussaint O. *et al.*, 1996). Or, on trouve des

niveaux respectifs élevés de TNF- α et d'IL-1 α dans les fluides issus d'ulcères veineux de jambes et dans l'hyperplasie prostatique (Mendez M.V. *et al.*, 1998), situations où des cellules présentant des caractéristiques de cellules sénescents sont observées. De plus, il a été rapporté que des cytokines pro-inflammatoires pouvaient induire la surexpression des métalloprotéinases favorisant la dégradation de la matrice extracellulaire des fibroblastes (pour une revue, voir Toussaint O. *et al.*, 2002).

En ce qui concerne le photo-vieillessement de la peau, des études ont montré chez la souris que l'exposition répétée aux UV induisait un état d'inflammation via l'augmentation de mastocytes, de cellules mononucléaires et de neutrophiles dans le derme (Kligman L.H. and Murphy G.F., 1996 ; Lavker R.M. and Kligman A.M., 1988). Ce contexte peut donc être particulièrement favorable à un phénomène de SIPS induite *in vivo* par les UV via l'activation de cellules immunitaires.

Études tri-dimensionnelles

Les résultats que nous avons obtenus lors de notre thèse nous ont permis de mettre au point un modèle de sénescence induite prématurément par des stress sous UVB sur des FHDs de derme. Ce modèle engendre chez les cellules stressées un état proche de la sénescence rélicative tels que cela a été suggéré par la présence dans ces cellules de toute une série de biomarqueurs de la sénescence. Nous avons également remarqué avec beaucoup d'intérêt que l'état de ces cellules stressées semblait assez proche de l'état de fibroblastes *in vivo* lors du photo-vieillessement. Nous pouvons donc présenter notre modèle comme modèle d'étude du photo-vieillessement du derme. Toutefois, il est clair que si nous voulons nous approcher encore plus des conditions physiologiques, il serait intéressant d'étudier l'effet de tels stress sur des fibroblastes maintenus en culture tri-dimensionnelle. En effet, de nombreuses études tendent à démontrer que l'étude de cellules dans une matrice tri-dimensionnelle apporte des différences considérables quant à l'expression génique et à différentes fonctions biologiques se rapprochant ainsi encore plus de ce qui est étudié *in vivo*.

Différents modèles de peau reconstruite *in vitro* ont été mis au point suivant que ce soit l'épiderme ou le derme qui soit « reconstruit », ou les deux. On dispose ainsi de modèles de derme reconstruit appelé « derme équivalent » où les fibroblastes sont intégrés dans une matrice tri-dimensionnelle de collagène. Les fibroblastes réorganisent ce réseau de collagène et le contractent (Bell E. *et al.*, 1979). Ce modèle engendre des contraintes mécaniques proches des conditions *in vivo*. Le derme équivalent est un modèle tissulaire dans lequel on retrouve de nouveau les interactions cellule-matrice perdues lors des cultures en monocouche. Les fibroblastes développent dans ce réseau de collagène un comportement proche de celui qu'ils ont *in vivo*. En effet, la présence d'une matrice de collagène a un impact sur la régulation de la croissance des fibroblastes (Sarber R. *et al.*, 1989) et

sur leur densité au sein d'un tissu (Chaussain-Miller C. *et al.*, 2003). On obtient ainsi une densité cellulaire similaire à la densité fibroblastique du derme *in vivo*. De plus, cette matrice va directement influencer leur comportement, que ce soit au niveau de la synthèse des différents collagènes et des collagénases (Nusgens B. *et al.*, 1984; Mauch C. *et al.*, 1988 & 1989) et de l'expression d'activités enzymatiques (Coulomb B. *et al.*, 1983; Asselineau D. and Bell E., 1984), mais aussi au niveau de la perméabilité membranaire à certains réactifs (Coulomb B. *et al.*, 1983). Enfin, il a été montré que les fibroblastes cultivés dans une matrice de collagène étaient plus sensibles à la toxicité induite par des expositions aux UVA (Coulomb B. *et al.*, 1996).

L'étape suivante de reconstruction de la peau *in vitro* consiste à recouvrir ce derme équivalent de kératinocytes pour former un épiderme. Le derme équivalent sert alors de substrat vivant pour la culture des kératinocytes (Bell E. *et al.*, 1983). Ce type de peau reconstituée est excessivement proche de la peau *in vivo* et permet d'étudier les interactions dermo-épidermiques. Ainsi, il a été montré que les fibroblastes avaient une influence sur la croissance des kératinocytes. En effet, la croissance de l'épiderme est augmentée si la matrice de collagène du derme a été préalablement réorganisée par des fibroblastes. La texture compacte de cette matrice favorise donc une meilleure croissance épidermique. Cet effet est encore plus marqué si des fibroblastes vivants sont toujours présents dans cette matrice (Coulomb B. *et al.*, 1989). De plus, on a remarqué que la croissance d'épidermes cultivés sur une matrice de collagène acellulaire ou contenant des fibroblastes morts était également augmentée si l'épiderme était mis en contact avec du milieu provenant de fibroblastes cultivés en monocouche (Coulomb B. *et al.*, 1989). Ceci suggère l'implication de facteurs diffusibles sécrétés par les fibroblastes qui stimuleraient également la croissance épidermique. Des études ont aussi révélé que les kératinocytes pouvaient également avoir une influence sur le comportement des fibroblastes. Ainsi, il a été observé que la présence de kératinocytes stimule l'expression de l'ARN-m du KGF (Keratinocyte Growth Factor) par les fibroblastes (Le Panse R. *et al.*, 1996). Ce système a également permis de démontrer que des fibroblastes issus de patients psoriatiques induisaient une hyperprolifération de l'épiderme (Saiag P. *et al.*, 1985). Il existe des variantes avec l'ajout ou non de mélanocytes afin de réaliser un épiderme pigmenté ou de cellules de Langerhans pour la reconstruction d'un épiderme immunosensible (Régner M. *et al.*, 1997). Les kératinocytes peuvent également être cultivés seuls afin de former des feuillets épidermiques (Rheinwald J.G. and Green H., 1975) ou être cultivés sur une matrice dermique ne contenant plus de fibroblastes (Yannas I.V. and Burke J.F., 1980).

L'étude de la SIPS induite par les UVB sur des fibroblastes de peau reconstruite pourrait donc apporter de précieuses informations quant à l'interaction de ceux-ci avec leur environnement, au niveau matriciel et au niveau cellulaire.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- Alcorta, D.A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D. and Barrett, J.C. (1996) Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13742-13747
- Angel, P., Szabowski, A. and Schorpp-Kistner, M. (2001) Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene* 20 (19), 2413-2423
- Attisano, L. and Wrana, J.L. (2000) Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol* 12 (2), 235-243
- Bayreuther, K., Rodemann, H.P., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M. and Francz, P.I. (1988) Human skin fibroblasts *in vitro* differentiate along a terminal cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5112-5116
- Bayreuther, K., Francz, P.I. and Rodemann, H.P. (1992) Fibroblasts in normal and pathological terminal differentiation, aging, apoptosis and transformation. *Arch. Gerontol. Geriatr. Suppl.* 3, 47-74
- Beausejour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P. and Campisi, J. (2003) Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo J* 22 (16), 4212-4222
- Beckman, K.B. and Ames, B.N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78 (2), 547-581
- Bell, E., Ivarsson, B., Merrill, C. (1979) Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 1274-1278
- Bell, E., Sher, S., Hull, B., Merrill, C., Rosen, S., Chamson, A., Asselineau, D., Dubertret, L., Coulomb, B., Lapiere, C., Nusgens, B. and Neveux, Y. (1983) The reconstitution of living skin. *J Invest Dermatol* 81 (1 Suppl), 2s-10s
- Berneburg, M., Grether-Beck, S., Kurten, V., Ruzicka, T., Briviba, K., Sies, H. and Krutmann, J. (1999) Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J Biol Chem* 274 (22), 15345-15349
- Bernstein, E.F., Chen, Y.Q., Tamai, K., Shepley, K.J., Resnik, K.S., Zhang, H., Tuan, R., Mauviel, A. and Uitto, J. (1994) Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. *J Invest Dermatol* 103 (2), 182-186
- Bernstein, E.F. and Uitto, J. (1996) The effect of photodamage on dermal extracellular matrix. *Clin Dermatol* 14 (2), 143-151
- Bertaux, B., Hornebeck, W., Eisen, A., Dubertret, L. (1991) Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Invest Dermatol* 97 (4), 679-685
- Birch-Machin, M.A., Tindall, M., Turner, R., Haldane, F. and Rees, J.L. (1998) Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo- rather than chronologic aging. *J Invest Dermatol* 110 (2), 149-152
- Blake, M.J., Fargnoli, J., Gershon, D. and Holbrook, N.J. (1991) Concomitant decline in heat-induced hyperthermia and Hsp70 mRNA expression in aged rats. *Am. J. Physiol.* 260, R663-R667
- Bonelli, M.A., Alfieri, R.R., Petronini, P.G., Brigotti, M., Campanini, C. and Borghetti, A.F. (1999) Attenuated expression of 70-kDa heat shock protein in WI-38 human fibroblasts during aging *in vitro*. *Exp Cell Res* 252 (1), 20-32
- Brack, C., Lithgow, G., Osiewicz, H. and Toussaint, O. (2000) EMBO WORKSHOP REPORT: Molecular and cellular gerontology Serpiano, Switzerland, September 18-22, 1999. *Embo J* 19 (9), 1929-1934.
- Braeckman, B.P., Houthoofd, K. and Vanfleteren, J.R. (2003) Energy metabolism, anti-oxydant defense and aging in *Caenorhabditis elegans*. In *Topics in Current Genetics* (Vol. 3) (Nyström, T. and Osiewicz, H., eds.), pp. 99-144, Springer-Verlag
- Brenneisen, P., Wenk, J., Klotz, L.O., Wlaschek, M., Briviba, K., Krieg, T., Sies, H. and Scharfetter-Kochanek, K. (1998) Central role of Ferrous/Ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloprotease (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 273 (9), 5279-5287
- Brunk, U., Ericsson, J.L., Ponten, J. and Westermarck, B. (1973) Residual bodies and "aging" in cultured human glia cells. Effect of entrance into phase 3 and prolonged periods of confluence. *Exp Eye Res* 79 (1), 1-14

- Brunmark, A., Collins, V.P., Thaw, H. and Brunk, U. (1986) Lipofuscin accumulation in cultured non-dividing cells as a function of time and oxygen tension. *Scan Electron Microsc* (Pt 1), 189-192
- 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
- Bryan, T.M. and Cech, T.R. (1999) Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol* 11 (3), 318-324
- Burkitt, H.G., Young, B. and Heath, J.W. (1993) *Histologie fonctionnelle wheater*, Arnette Blackwell
- Cao, Y., Ohwatari, N., Matsumoto, T., Kosaka, M., Ohtsuru, A., Yamashita, S. (1999) TGF- β 1 mediates 70-kDa heat shock protein induction due to ultraviolet irradiation in human skin fibroblasts. *Pflugers Arch.* 438(3), 239-244
- Cadet, J., Douki, T., Pouget, J.P. and Ravanat, J.L. (2000) Singlet oxygen DNA damage products: formation and measurement. *Methods Enzymol* 319, 143-153
- Campisi, J., Dimri, G. and Hara, E. (1996a) Control of replicative senescence. In *Handbook of the biology of aging*. (Schneider, E. and Rowe, J., eds.), pp. 121-149, Academic Press
- Campisi, J. (1998) The role of cellular senescence in skin aging. *J. Invest Dermatol. Symp. Proc.* 3, 1-5
- Campisi, J. (1999) Replicative senescence and immortalization. In *The molecular basis of cell cycle and growth control*. (Stein, G.S. Baserga, A. Giordano, A. and Denhardt, D.T., eds.), pp. 348-373, Wiley-Liss
- Chainiaux, F., Magalhaes, J.P., Eliaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002a) UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol* 34 (11), 1331-1339
- Chainiaux, F., Remacle, J., Toussaint, O. (2002b) Exposure of human skin diploid fibroblasts to repeated subcytotoxic doses of UVB induces the overexpression of TGF- β 1 mRNA. *ANN NY Acad Sci*, 973, 44-48
- Chang, B.D., Broude, E.V., Dokmanovic, M., Zhu, H., Ruth, A., Xuan, Y., Kandel, E.S., Lausch, E., Christov, K. and Roninson, I.B. (1999) A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res.* 59 (15), 3761-3767
- Chaussain-Miller, C., Godeau, G., Lebreton-DeCoster, C., Desmoulière, A., Pellat, B., Dubertret, L., Coulomb, B. (2003) Validation of a morphometric method for evaluating fibroblast numbers in normal and pathological tissues. *Exp Dermatol* 12, 403-411
- Chen, J., Brodsky, S.V., Goligorsky, D.M., Hampel, D.J., Li, H., Gross, S.S. and Goligorsky, M.S. (2002) Glycated collagen I induces premature senescence-like phenotypic changes in endothelial cells. *Circ. Res.* 90 (12), 1290-1298
- Chen, J.J. and Yu, B.P. (1994) Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med* 17 (5), 411-418
- 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.M., Bartholomew, J.C., Campisi, J., Acosta, M., Reagan, J.D. and Ames, B.N. (1998) Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem. J.* 332, 43-50
- Chen, Q.M., Prowse, K.R., Tu, V.C., Purdom, S. and Linskens, M.H. (2001) Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp Cell Res* 265 (2), 294-303
- Choi, J., Shendrik, I., Peacocke, M., Peehl, D., Buttyan, R., Ikeguchi, E.F., Katz, A.E. and Benson, M.C. (2000) Expression of senescence-associated beta-galactosidase in enlarged prostates from men with benign prostatic hyperplasia. *Urology* 56 (1), 160-166
- Cholody, W.M., Kosakowska-Cholody, T. and Michejda, C.J. (2001) Bisimidazoacridones induce a potent cytostatic effect in colon tumor cells that sensitizes them to killing by UCN-01. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 47 (3), 241-249
- Chung, K.Y., Agarwal, A., Uitto, J. and Mauviel, A. (1996) An AP-1 binding sequence is essential for regulation of the human alpha2(I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 271 (6), 3272-3278
- Collado, M., Medema, R.H., Garcia-Cao, I., Dubuisson, M.L., Barradas, M., Glassford, J., Rivas, C., Burgering, B.M., Serrano, M. and Lam, E.W. (2000) Inhibition of the

- phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J. Biol. Chem.* 275 (29), 21960-21968
- Corral-Debrinski, M., Horton, T., Lott, M.T., Shoffner, J.M., Beal, M.F. and Wallace, D.C. (1992) Mitochondrial DNA deletions in human brain : regional variability and increase with advanced age. *Nature Genet.* 2, 324-329
- Coulomb, B., Dubertret, L., Bell, E., Merrill, C., Fosse, M., Breton-Gorius, J., Prost, C. and Touraine, R. (1983) Endogenous peroxidases in normal human dermis: a marker of fibroblast differentiation. *J Invest Dermatol* 81 (1), 75-78
- Coulomb, B., Lebreton, C., Dubertret, L. (1989) Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization. *J Invest Dermatol* 92 (1), 122-125
- Coulomb, B., Lebreton, C., Mathieu, N., Morlière, P. (1996) UVA-induced oxidative damage in fibroblasts cultured in a 3-dimensional collagen matrix. *Exp Dermatol* 5(3), 161-167
- 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. and Pignolo, R.J. (1993) Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture. *Physiol. Rev.* 73, 617-638
- Cristofalo, V.J., Volker, C., Francis, M.K. and Tresini, M. (1998a) Age-dependent modifications of gene expression in human fibroblasts. *Critical reviews in euKaryotic gene expression* 8 (1), 43-80
- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D.R. and Yamada, K.M. (2001) Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 294 (5547), 1708-1712
- Dai, C.Y. and Enders, G.H. (2000) p16 INK4a can initiate an autonomous senescence program. *Oncogene* 19 (13), 1613-1622
- Damalas, A., Kahan, S., Shtutman, M., Ben-Ze'ev, A. and Oren, M. (2001) Deregulated beta-catenin induces a p53- and ARF-dependent growth arrest and cooperates with Ras in transformation. *Embo. J.* 20 (17), 4912-4922
- Datto, M.B., Li, Y., Panus, J.F., Howe, D.J., Xiong, Y. and Wang, X.F. (1995) Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (12), 5545-5549
- Daya-Grosjean, L., Dumaz, N. and Sarasin, A. (1995) The specificity of p53 mutation spectra in sunlight induced human cancers. *J Photochem Photobiol B* 28 (2), 115-124
- de Magalhaes, J.P., Chainiaux, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002) Stress-induced premature senescence in BJ and hTERT-BJ1 human foreskin fibroblasts. *FEBS Lett* 523 (1-3), 157-162
- Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K. and Wahl, G.M. (1994) DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 8 (21), 2540-2551
- Dierick, J.-F., Fripiat, C., Salmon, M., Chainiaux, F. and Toussaint, O. (2003) Stress, cells and tissue aging. In *Modulating aging and longevity* (Rattan, S.I.S., ed.), pp. 101-125, Kluwer Academic Publishers
- Dierick, J.F., Kalume, D.E., Wenders, F., Salmon, M., Dieu, M., Raes, M., Roepstorff, P. and Toussaint, O. (2002) Identification of 30 protein species involved in replicative senescence and stress-induced premature senescence. *FEBS Lett* 531 (3), 499-504
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-smith, O. and Peacocke, M. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9363-9367
- Dougherty, T.J. (1981) Photoradiation therapy for cutaneous and subcutaneous malignancies. *J Invest Dermatol* 77 (1), 122-124
- Dumont, P., Burton, M., Chen, Q.M., Gonos, E.S., Fripiat, C., Mazarati, J.B., Eliaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2000) Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med.* 28, 361-373
- Dumont, P., Royer, V., Pascal, T., Dierick, J.F., Chainiaux, F., Fripiat, C., de Magalhaes, J.P., Eliaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2001) Growth kinetics rather than stress accelerate telomere shortening in cultures of human diploid fibroblasts in oxidative stress-induced premature senescence. *FEBS Lett* 502 (3), 109-112
- 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 Chaperones* 7 (1), 23-35

- Enslin, H., Raingeaud, J. and Davis, R.J. (1998) Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem* 273 (3), 1741-1748
- Evans, C.H. and Georgescu, H.J. (1983) Observations on the senescence of cells derived from articular cartilage. *Mech. Ageing Dev.* 22, 179-191
- Eveno, E., Bourre, F., Quilliet, X., Chevallier-Lagente, O., Roza, L., Eker, A.P., Kleijer, W.J., Nikaido, O., Stefanini, M., Hoeijmakers, J.H. and et al. (1995) Different removal of ultraviolet photoproducts in genetically related xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy diseases. *Cancer Res* 55 (19), 4325-4332
- Fahn, H.J., Wang, L.S., Hsieh, 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. *Am J Respir Crit Care Med* 154 (4 Pt 1), 1141-1145
- Fenton, M., Barker, S., Kurz, D.J. and Erusalimsky, J.D. (2001) Cellular senescence after single and repeated balloon catheter denudations of rabbit carotid arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 (2), 220-226
- 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. Comm.* 233, 102-107
- Finkel, T. and Holbrook, N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408 (6809), 239-247
- Fisher, G.J., Datta, S.C., Talwar, H.S., Wang, Z.Q., Varani, J., Kang, S. and Voorhees, J.J. (1996) Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 379 (6563), 335-339
- Fisher, G.J., Wang, Z.Q., Datta, S.C., Varani, J., Kang, S. and Voorhees, J.J. (1997) Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 337 (20), 1419-1428
- Fisher, G.J., Talwar, H.S., Lin, J., Lin, P., McPhillips, F., Wang, Z., Li, X., Wan, Y., Kang, S. and Voorhees, J.J. (1998) Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo. *J Clin Invest* 101 (6), 1432-1440
- Fisher, G.J. and Voorhees, J.J. (1998) Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce Ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo. *J Invest Dermatol Symp Proc* 3 (1), 61-68
- Fornari, F.A., Jr., Jarvis, W.D., Grant, S., Orr, M.S., Randolph, J.K., White, F.K., Mumaw, V.R., Lovings, E.T., Freeman, R.H. and Gewirtz, D.A. (1994) Induction of differentiation and growth arrest associated with nascent (nonoligosomal) DNA fragmentation and reduced c-myc expression in MCF-7 human breast tumor cells after continuous exposure to a sublethal concentration of doxorubicin. *Cell. Growth. Differ.* 5 (7), 723-733
- Freinkel, R.K. and Woodley, D.T. (2001) *The Biology of the skin*, Parthenon Publishing Group, New-York.
- Frippiat, C., Chen, Q.M., Zdanov, S., Magalhaes, J.P., Remacle, J. and Toussaint, O. (2001) Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem* 276 (4), 2531-2537
- Frippiat, C., Dewelle, J., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002) Signal transduction in H₂O₂-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 33 (10), 1334-1346
- Frippiat, C., Remacle, J. and Toussaint, O. (2003) Down-regulation and decreased activity of cyclin-dependent kinase 2 in H₂O₂-induced premature senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 35 (2), 246-254
- Funk, S.E. and Sage, E.H. (1991) The Ca²⁺(+)-binding glycoprotein SPARC modulates cell cycle progression in bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (7), 2648-2652
- Geiszt, M., Kopp, J.B., Varnai, P. and Leto, T.L. (2000) Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (14), 8010-8014
- Gerland, L.M., Peyrol, S., Lallemand, C., Branche, R., Magaud, J.P. and Ffrench, M. (2003) Association of increased autophagic inclusions labeled for beta-galactosidase with fibroblastic aging. *Exp Gerontol* 38 (8), 887-895
- Gilchrest, B.A. (1983) In vitro assessment of keratinocyte aging. *J Invest Dermatol* 81 (1 Suppl), 184s-189s
- Ginsburg, I. and Kohen, R. (1995) Cell damage in inflammatory and infectious sites might involve a coordinated "cross-talk" among oxidants, microbial haemolysins and

- amphiphiles, cationic proteins, phospholipases, fatty acids, proteinases and cytokines (an overview). *Free Radic Res* 22 (6), 489-517
- Goeptar, A.R., Scheerens, H. and Vermeulen, N.P. (1995) Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol* 25 (1), 25-65
- Gonos, E.S., Deventzi, A., Kveiborg, M., Agiostratidou, G., Kassen, M., Clark, B.F.C., Jat, P.S. and Rattan, S.I.S. (1998) Cloning and identification of genes that are associated with mammalian replicative senescence. *Exp. Cell Res* 240, 66-74
- Gorbunova, V., Seluanov, A. and Pereira-Smith, O.M. (2002) Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *J Biol Chem* 277 (41), 38540-38549
- Grassilli, E., Bellesia, E., Salomoni, P., Croce, M.A., Sikora, E., Radziszewska, E., Tesco, G., Vergelli, M., Latorraca, S., Barbieri, D., Fagiolo, U., Santacaterina, S., Amaducci, L., Tiozzo, R., Sorbi, S. and Franceschi, C. (1996) c-fos/c-jun expression and AP-1 activation in skin fibroblasts from centenarians. *Biochem Biophys Res Commun* 226 (2), 517-523
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R. and Aebersold, R. (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19 (3), 1720-1730
- Halliwell, B.H. and Gutteridge, J.M.C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford Univ. Press
- Hanson, K.M. and Simon, J.D. (1998) Epidermal trans-urocanic acid and the UV-A-induced photoaging of the skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (18), 10576-10578
- 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 Villeponteau, B. (1995) Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 5 (2), 249-255
- Harman, D. (1956) Aging : a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298-300
- Hayakawa, M., Sugiyama, S., Hattori, K., Takasawa, M. and Ozawa, T. (1993) Age-associated damage in mitochondrial DNA in human hearts. *Mol. Cell Biochem.* 119, 95-103
- Hayflick, L. and Moorhead, P.S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585-621
- Helenius, M., Makelainen, L. and Salminen, A. (1999) Attenuation of NF-kappaB signaling response to UVB light during cellular senescence. *Exp Cell Res* 248 (1), 194-202
- Herrmann, G., Wlaschek, M., Bolsen, K., Prenzel, K., Goerz, G. and Scharffetter-Kochanek, K. (1996) Photosensitization of uroporphyrin augments the ultraviolet A-induced synthesis of matrix metalloproteinases in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 107 (3), 398-403
- Herrmann, G., Brenneisen, P., Wlaschek, M., Wenk, J., Faisst, K., Quel, G., Hommel, C., Goerz, G., Ruzicka, T., Krieg, T., Sies, H. and Scharffetter-Kochanek, K. (1998) Psoralen photoactivation promotes morphological and functional changes in fibroblasts in vitro reminiscent of cellular senescence. *J Cell Sci* 111 (Pt 6), 759-767
- Hocevar, B.A., Brown, T.L. and Howe, P.H. (1999) TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *Embo J* 18 (5), 1345-1356
- Honda, S. and Matsuo, M. (1983) Shortening of the in vitro lifespan of human diploid fibroblasts exposed to hyperbaric oxygen. *Exp. Gerontol.* 18 (5), 339-345
- Hornsby, P.J. (1978) Characterization of adult bovine adrenocortical cells their life span in tissue culture. *Endocrinology* 102, 926-936
- 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 (11), 6875-6881
- Ichihashi, M., Funasaka, Y., Ahmed, N.U., Chakraborty, A.K. and Ueda, M. (1998) Efficacy of antioxidant substances and prevention of UV damage. In *Interface of a living system* (Parrish, J.A. Tagami, H. and Ozawa, T., eds.), Elsevier
- Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyo, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K. and Horikawa, T. (2003) UV-induced skin damage. *Toxicology* 189 (1-2), 21-39
- Jacobson-Kram, D., Roe, J.L., Williams, J.R., Gange, R.W. and Parrish, J.A. (1982) Decreased in-vitro lifespan of fibroblasts derived from skin exposed to photochemotherapy in vivo. *Lancet* 2 (8312), 1399-1400
- Jenkins, G. (2002) Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech Ageing Dev* 123 (7), 801-810
- 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 constituent of rat testis fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7123-7127
- Jenne, D.E. and Tschopp, J. (1992) Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein. *Trends Biochem Sci* 17 (4), 154-159
- Jin, G. and Howe, P.H. (1999) Transforming growth factor beta regulates clusterin gene expression via modulation of transcription factor c-Fos. *Eur J Biochem* 263 (2), 534-542
- Johnson, T.E., Tedesco, P.M. and Lithgow, G.J. (1993) Comparing mutants, selective breeding, and transgenics in the dissection of aging processes of *Caenorhabditis elegans*. *Genetica* 91 (1-3), 65-77
- Jones, S.E. and Jomary, C. (2002) Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol* 34 (5), 427-431
- Joshi, P.C. and Pathak, M.A. (1984) The role of active oxygen (O₂ and O₂) induced by crude coal tar and its ingredients used in photochemotherapy of skin diseases. *J Invest Dermatol* 82 (1), 67-73
- Kanitakis, J. (1997) Structure histologique de la peau humaine. In *Biologie de la peau humaine* (Schmitt, D., ed.), INSERM
- Katakura, Y., Nakata, E., Miura, T. and Shirahata, S. (1999) Transforming growth factor beta triggers two independent-senescence programs in cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255 (1), 110-115
- Kawaguchi, Y., Tanaka, H., Okada, T., Konishi, H., Takahashi, M., Ito, M. and Asai, J. (1997) Effect of reactive oxygen species on the elastin mRNA expression in cultured human dermal fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 23 (1), 162-165
- 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
- Kligman, L.H. and Murphy, G.F. (1996) Ultraviolet B radiation increases hairless mouse mast cells in a dose-dependent manner and alters distribution of UV-induced mast cell growth factor. *Photochem Photobiol* 63 (1), 123-127
- Klotz, L.O., Pellieux, C., Briviba, K., Pierlot, C., Aubry, J.M. and Sies, H. (1999) Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA. *Eur J Biochem* 260 (3), 917-922
- Knebel, A., Rahmsdorf, H.J., Ullrich, A. and Herrlich, P. (1996) Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *Embo J* 15 (19), 5314-5325
- Kohen, R. and Gati, I. (2000) Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. *Toxicology* 148 (2-3), 149-157
- Kramer, D.L., Chang, B.D., Chen, Y., Diegelman, P., Alm, K., Black, A.R., Roninson, I.B. and Porter, C.W. (2001) Polyamine depletion in human melanoma cells leads to G1 arrest associated with induction of p21WAF1/CIP1/SDI1, changes in the expression of p21-regulated genes, and a senescence-like phenotype. *Cancer Res.* 61 (21), 7754-7762
- Krieg, T., Hein, R., Hatamochi, A. and Aumailley, M. (1988) Molecular and clinical aspects of connective tissue. *Eur J Clin Invest* 18 (2), 105-123
- Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.Y. and Campisi, J. (2001) Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (21), 12072-12077
- Ku, H.H., Brunk, U.T. and Sohal, R.S. (1993) Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radic Biol Med* 15 (6), 621-627
- 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 (2), 396-402
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y. and Erusalimsky, J.D. (2000) Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 113 (Pt 20), 3613-3622
- Labat-Robert, J., Fourtanier, A., Boyer-Lafargue, B. and Robert, L. (2000) Age dependent increase of elastase type protease activity in mouse skin. Effect of UV-irradiation. *J Photochem Photobiol B* 57 (2-3), 113-118
- Lavker, R.M. and Kligman, A.M. (1988) Chronic heliodermatitis: a morphologic evaluation of chronic actinic dermal damage with emphasis on the role of mast cells. *J Invest Dermatol* 90 (3), 325-330
- Leccia, M.T., Yaar, M., Allen, N., Gleason, M. and Gilchrist, B.A. (2001) Solar simulated irradiation modulates gene expression and activity of antioxidant enzymes in cultured human dermal fibroblasts. *Exp Dermatol* 10 (4), 272-279

- Lecka-Czernik, B., Moerman, E., Jones, R.A. and Goldstein, S. (1996) Identification of genes sequences overexpressed in senescent and Werner syndrome human fibroblasts. *Exp. Gerontol.* 31 (1), 159-174
- Lee, H.-C., Pang, C.-Y., Hsu, H.-S. and Wei, Y.-H. (1994) Differential accumulations of 4,977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing. *Biochem. et Biophys. Acta* 1226, 37-43
- Leevers, S.J., Paterson, H.F. and Marshall, C.J. (1994) Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* 369 (6479), 411-414
- Le Panse, R., Bouchard, B., Lebreton, C., Coulomb, B. (1996) Modulation of keratinocyte growth factor (KGF) mRNA expression in human dermal fibroblasts grown in monolayer or within a collagen matrix. *Exp Dermatol* 5, 108-114
- Li, D., Turi, T.G., Schuck, A., Freedberg, I.M., Khitrov, G. and Blumenberg, M. (2001) Rays and arrays: the transcriptional program in the response of human epidermal keratinocytes to UVB illumination. *FASEB J* 15 (13), 2533-2535
- Lin, Y.J., Seroude, L. and Benzer, S. (1998) Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant methuselah. *Science* 282 (5390), 943-946
- Ling, Y.H., Zou, Y. and Perez-Soler, R. (2000) Induction of senescence-like phenotype and loss of paclitaxel sensitivity after wild-type p53 gene transfection of p53-null human non-small cell lung cancer H358 cells. *Anticancer Res.* 20 (2A), 693-702
- Lithgow, G.J. and Walker, G.A. (2002) Stress resistance as a determinate of *C. elegans* lifespan. *Mech Ageing Dev* 123 (7), 765-771
- Liu, V.W., Zhang, C. and Nagley, P. (1998) Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing. *Nucleic Acids Res.* 26, 1268-1275
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. and Randall, R. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Ma, W., Wlaschek, M., Brenneisen, P., Schneider, L.A., Hommel, C., Hellweg, C., Sauer, H., Wartenberg, M., Herrmann, G., Meewes, C., Boukamp, P. and Scharffetter-Kochanek, K. (2002) Human dermal fibroblasts escape from the long-term phenocopy of senescence induced by psoralen photoactivation. *Exp. Cell. Res.* 274 (2), 299-309
- Masoro, E.J. (2000) Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol* 35 (3), 299-305
- Massague, J. (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753-791
- Matuoka, K. and Chen, K.Y. (2002) Telomerase positive human diploid fibroblasts are resistant to replicative senescence but not premature senescence induced by chemical reagents. *Biogerontology* 3 (6), 365-372
- Mauch, C., Hatamochi, A., Scharffetter, K., Krieg, T. (1988) Regulation of collagen synthesis in fibroblasts within a three-dimensional collagen gel. *Exp Cell Res* 178, 493-503
- Mauch, C., Adelman-Grill, B., Hatamochi, A., Krieg, T. (1989) Collagenase gene expression in fibroblasts is regulated by a three-dimensional contact with collagen. *FEBS Lett* 250, 301-305
- McCord, J.M. and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem* 244 (22), 6049-6055
- Medrano, E.E., Yang, F., Boissy, R., Farooqui, J., Shah, V., Matsumoto, K., Nordlund, J.J. and Park, H.Y. (1994) Terminal differentiation and senescence in the human melanocyte: repression of tyrosine-phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase 2 selectively defines the two phenotypes. *Mol Biol Cell* 5 (4), 497-509
- Medrano, E.E., Im, S., Yan, F. and Abdel-Malek, Z.A. (1995) Ultraviolet B light induces G1 arrest in human melanocytes by prolonged inhibition of retinoblastoma protein phosphorylation associated with long-term expression of the p21^{waf1/Cip-1} protein. *Cancer Res.* 55, 4047-4052
- Medvedev, Z.A. (1990) An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Physiol. Rev.* 65, 375-398
- 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., Phillips, T., Murphy, M., Menzoi, J.O. and Park, H.Y. (1998a) Fibroblasts cultured from distal lower extremities in patients with venous reflux display cellular characteristics of senescence. *J Vasc Surg* 28 (6), 1040-1050
- Mendez, M.V., Stanley, A., Park, H.Y., Shon, K., Phillips, T. and Menzoi, J.O. (1998b) Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence. *J. Vasc. Surg.* 28, 876-883
- Mendez, M.V., Raffetto, J.D., Phillips, T., Menzoi, J.O. and Park, H.Y. (1999) The proliferative capacity of neonatal skin fibroblasts is reduced after exposure to venous ulcer wound

- fluid : a potential mechanism for senescence in venous ulcers. *J. Vasc. Surg.* 1999, 734-743
- Michel, D., Chatelain, G., North, S. and Brun, G. (1997) Stress-induced transcription of the clusterin/apoJ gene. *Biochem. J.* 328, 45-50
- Michishita, E., Nakabayashi, K., Suzuki, T., Kaul, S.C., Ogino, H., Fujii, M., Mitsui, Y. and Ayusawa, D. (1999) 5-Bromodeoxyuridine induces senescence-like phenomena in mammalian cells regardless of cell type or species. *J. Biochem. (Tokyo)* 126 (6), 1052-1059
- Migliaccio, E., Giorgio, M., Mele, S., Pelicci, G., Reboldi, P., Pandolfi, P.P., Lanfranccone, L. and Pelicci, P.G. (1999) The p66^{shc} adaptator protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* 402, 309-313
- Millis, A.J., Hoyle, M., McCue, H.M. and Martini, H. (1992) Differential expression of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in aged human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 201, 373-379
- Minamino, T., Miyauchi, H., Yoshida, T., Ishida, Y., Yoshida, H. and Komuro, I. (2002) Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* 105 (13), 1541-1544
- Mishima, K., Handa, J.T., Aotaki-Keen, A., Luffy, G.A., Morse, L.S. and Hjelmeland, L.M. (1999) Senescence-associated beta-galactosidase histochemistry for the primate eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (7), 1590-1593
- Mitchell, D.L. (1988) The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. *Photochem Photobiol* 48 (1), 51-57
- Mitchell, J.R., Hoeijmakers, J.H. and Niedernhofer, L.J. (2003) Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing. *Curr Opin Cell Biol* 15 (2), 232-240
- Mockett, R.J., Sohal, R.S. and Orr, W.C. (1999) Overexpression of glutathione reductase extends survival in transgenic *Drosophila melanogaster* under hyperoxia but not normoxia. *Faseb J* 13 (13), 1733-1742
- Mueller, S.N., Rosen, E.M. and Levine, E.M. (1980) Cellular senescence in a cloned strain of bovine fetal aortic endothelial cells. *Science* 207, 889-891
- Murano, S., Tweatt, R., Reis, R.J., Jones, R.A., Moerman, E.J. and Goldstein, S. (1991) Diverse gene sequences are overexpressed in werner syndrome fibroblasts undergoing premature replicative senescence. *Mol. Cell Biol.* 11, 3905-3914
- Nusgens, B., Merrill, C., Lapière, C., Bell, E. (1984) Collagen biosynthesis by cells in a tissue equivalent matrix in vitro. *Coll Rel Res* 4, 351-364
- 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 (9), 5210-5218
- Oh, C.W., Bump, E.A., Kim, J.S., Janigro, D. and Mayberg, M.R. (2001) Induction of a senescence-like phenotype in bovine aortic endothelial cells by ionizing radiation. *Radiat. Res.* 156 (3), 232-240
- Orr, W.C. and Sohal, R.S. (1994) Extension of life-span by overexpression of superoxide 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.* (Rattan, S.I. and Toussaint, O., eds.), pp. 37-52, Plenum Press
- 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
- Paradis, V., Youssef, N., Dargere, D., Ba, N., Bonvoust, F., Deschatrette, J. and Bedossa, P. (2001) Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C, and hepatocellular carcinomas. *Hum Pathol* 32 (3), 327-332
- Pawson, T. and Scott, J.D. (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278 (5346), 2075-2080
- Pegg, A.E. and Byers, T.L. (1992) Repair of DNA containing O6-alkylguanine. *Faseb J* 6 (6), 2302-2310
- Petropoulou, C., Trougakos, I.P., Kolettas, E., Toussaint, O. and Gonos, E.S. (2001) Clusterin/apolipoprotein J is a novel biomarker of cellular senescence that does not affect the proliferative capacity of human diploid fibroblasts. *FEBS Lett* 509 (2), 287-297
- Poon, S., Treweek, T.M., Wilson, M.R., Easterbrook-Smith, S.B. and Carver, J.A. (2002) Clusterin is an extracellular chaperone that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their off-folding pathway. *FEBS Lett* 513 (2-3), 259-266

- Quan, T., He, T., Kang, S., Voorhees, J.J. and Fisher, G.J. (2002) Ultraviolet irradiation alters transforming growth factor beta/smad pathway in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 119 (2), 499-506
- 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 (4), 398-403
- Reeves, E.P., Lu, H., Jacobs, H.L., Messina, C.G., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E.O., Warley, A., Roes, J. and Segal, A.W. (2002) Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* 416 (6878), 291-297
- Regnier, M., Staquet, M.J., Schmitt, D. and Schmidt, R. (1997) Integration of Langerhans cells into a pigmented reconstructed human epidermis. *J Invest Dermatol* 109 (4), 510-512
- Reichelt, J. and Schachtschabel, D.O. (2001) Energetic stress induces premature aging of diploid human fibroblasts (Wi-38) in vitro. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 32 (3), 219-231
- Rheinwald, J.G. and Green, H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6, 331-343
- Rheinwald, J.G., Hahn, W.C., Ramsey, M.R., Wu, J.Y., Guo, Z., Tsao, H., De Luca, M., Catricala, C. and O'Toole, K.M. (2002) A two-stage, p16(INK4A)- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status. *Mol Cell Biol* 22 (14), 5157-5172
- Riddle, D.L. and Albert, P.S. (1997) In *C. elegans II* (Riddle, D.L. Blumenthal, T. Meyer, B.J. and Priess, J.R., eds.), pp. 739-768, Cold Spring Harbor Press
- Rittie, L. and Fisher, G.J. (2002) UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev* 1 (4), 705-720
- Robbins, E., Levine, E.M. and Eagle, H. (1970) Morphologic changes accompanying senescence of cultured human diploid cells. *J Exp Med* 131 (6), 1211-1222
- Robinson, J.M. and Badwey, J.A. (1994) Production of active oxygen species by phagocytic leukocytes. *Immunol Ser* 60, 159-178
- Robles, S.J. and Adami, G.R. (1998) Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 16 (9), 1113-1123
- Rodemann, H.P., Bayreuther, K., Francz, P.I., Dittmann, K. and Albiez, M. (1989) Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro. *Exp. Cell Res.* 180, 84-93
- Rosette, C. and Karin, M. (1996) Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* 274 (5290), 1194-1197
- Roth, G.S., Lane, M.A., Ingram, D.K., Mattison, J.A., Elahi, D., Tobin, J.D., Muller, D. and Metter, E.J. (2002) Biomarkers of caloric restriction may predict longevity in humans. *Science* 297 (5582), 811
- Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., Mbamalu, G., Pelicci, G., Daly, R., Li, W., Batzer, A., Thomas, S., Brugge, J. and Pelicci, P.G. (1992) Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* 360, 689-692
- Rubin, J.S., Osada, H., Finch, P.W., Taylor, W.G., Rudikoff, S., Aaronson, S.A. (1989) Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 802-806
- Saiag, P., Coulomb, B., Lebreton, C., Bell, E., Dubertret, L. Psoriatic fibroblasts induce hyperproliferation of normal keratinocytes in a skin equivalent model in vitro. *Science* 230, 669-672
- 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-beta signaling. *J Biol Chem* 274 (13), 8949-8957
- Sarber, R., Hull, B., Merrill, C., Soranno, T., Bell, E. (1981) Regulation of proliferation of fibroblasts of low and high population doubling levels grown in collagen lattices. *Mech Ageing Dev* 17, 107-117
- Saretzki, G., Feng, J., von Zglinicki, T. and Villeponteau, B. (1998) Similar gene expression pattern in senescent and hyperoxic-treated fibroblasts. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 53 (6), B438-B442
- Scharffetter-Kochanek, K., Wlasczek, M., Briviba, K. and Sies, H. (1993) Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. *FEBS Lett* 331 (3), 304-306

- Scharffetter-Kochanek, K., Brenneisen, P., Wenk, J., Herrmann, G., Ma, W., Kuhr, L., Meewes, C. and Wlaschek, M. (2000) Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol* 35 (3), 307-316
- Schneider, E.L. and Mitsui, Y. (1976) The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73 (10), 3584-3588
- Serrano, M. and Blasco, M.A. (2001) Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol* 13 (6), 748-753
- Sesto, A., Navarro, M., Burslem, F. and Jorcano, J.L. (2002) Analysis of the ultraviolet B response in primary human keratinocytes using oligonucleotide microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (5), 2965-2970
- Setlow, R.B. (2001) Human cancer: etiologic agents/dose responses/DNA repair/cellular and animal models. *Mutat Res* 477 (1-2), 1-6
- Shamblott, M.J., Axelman, J., Littlefield, J.W., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R., Cui, Y., Cheng, L. and Gearhart, J.D. (2001) Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (1), 113-118
- Shapiro, B.L., Lam, L.F. and Fast, L.H. (1979) Premature senescence in cultured skin fibroblasts from subjects with cystic fibrosis. *Science* 203 (4386), 1251-1253
- Shay, J.W. and Wright, W.E. (2000) Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1 (1), 72-76
- Shelton, D.N., Chang, E., Whittier, P.S., Choi, D. and Funk, W.D. (1999) Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol* 9 (17), 939-945
- Sherr, C.J. and Roberts, J.M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13 (12), 1501-1512
- 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 syntheses 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 (2), 194-205
- Shibanuma, M., Mochizuki, E., Maniwa, R., Mashimo, J., Nishiya, N., Imai, S., Takano, T., Oshimura, M. and Nose, K. (1997) Induction of senescence-like phenotypes by forced expression of hic-5, which encodes a novel LIM motif protein, in immortalized human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 17 (3), 1224-1235
- 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., Rajvanshi, P., Gorla, G.R., Sokhi, R.P., Saxena, R., Gebhard, D.R., Jr., Reid, L.M. and Gupta, S. (1999) Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *Am J Physiol* 276 (5 Pt 1), G1260-1272
- Siwik, D.A., Pagano, P.J. and Colucci, W.S. (2001) Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 280 (1), C53-C60
- Sohal, R.S. and Weindruch, R. (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273, 59-63
- Sun, P.D. and Davies, D.R. (1995) The cystine-knot growth-factor superfamily. *Annu Rev Biochem Biomol Struct* 24, 269-291
- Suzuki, T., Minagawa, S., Michishita, E., Ogino, H., Fujii, M., Mitsui, Y. and Ayusawa, D. (2001) Induction of senescence-associated genes by 5-bromodeoxyuridine in HeLa cells. *Exp. Gerontol.* 36 (3), 465-474
- Taub, J., Lau, J.F., Ma, C., Hahn, J.H., Hoque, R., Rothblatt, J. and Chalfie, M. (1999) A cytosolic catalase is needed to extend adult lifespan in *C. elegans* daf-C and clk-1 mutants. *Nature* 399 (6732), 162-166
- Terao, Y., Nishida, J., Horiuchi, S., Rong, F., Ueoka, Y., Matsuda, T., Kato, H., Furugen, Y., Yoshida, K., Kato, K. and Wake, N. (2001) Sodium butyrate induces growth arrest and senescence-like phenotypes in gynecologic cancer cells. *Int. J. Cancer* 94 (2), 257-267
- Tesco, G., Vergelli, M., Grassilli, E., Salomoni, P., Bellesia, E., Sikora, E., Radziszewska, E., Barbieri, D., Latorraca, S., Fagiolo, U., Santacaterina, S., Amaducci, L., Tiozzo, R., Franceschi, C. and Sorbi, S. (1998) Growth properties and growth factor responsiveness in skin fibroblasts from centenarians. *Biochem Biophys Res Commun* 244 (3), 912-916

- Tice, R.R., Schneider, E.L. and Kram, D. (1979) Cytokinetic analysis of impaired proliferative response of peripheral lymphocytes from aged humans to phytohemagglutinin. *J. Exp. Med.* 149, 1029-1041
- Toda, T., Kaji, K. and Kimura, N. (1998) TMIG-2DPAGE: a new concept of two-dimensional gel protein database for research on aging. *Electrophoresis* 19 (2), 344-348
- Toussaint, O., Houbion, A. and Remacle, J. (1992) Aging as multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages II. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture. *Mech. Ageing Dev.* 65, 65-83
- Toussaint, O., Michiels, C., Raes, M. and Remacle, J. (1995b) Cellular aging and the importance of energetic factors. *Exp. Gerontol.* 30, 1-22
- Toussaint, O., Lambert, D. and Remacle, J. (1996) Mathematical model of the survival curves and of the recovery times for mitosis of cell populations exposed to stresses. *In vitro toxicology* 9 (3), 251-259
- Toussaint, O., Dumont, P., Dierick, J.-F., Pascal, T., Fripiat, C., Chainiaux, F., Magalhaes, J.-P., Eliears, F. and Remacle, J. (2000a) Stress-induced premature senescence as alternative toxicological method for testing the long-term effects of molecules under development in the industry. *Biogerontology* 1 (2), 179-183
- Toussaint, O., Medrano, E.E. and von Zglinicki, T. (2000b) Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* 35 (8), 927-945
- Toussaint, O., Remacle, J., Dierick, J.F., Pascal, T., Fripiat, C., Zdanov, S., Magalhaes, J.P., Royer, V. and Chainiaux, F. (2002) From the Hayflick mosaic to the mosaics of ageing. Role of stress-induced premature senescence in human ageing. *Int J Biochem Cell Biol* 34 (11), 1415-1429
- Toussaint, O., Salmon, M., Royer, V., Dierick, J.F., de Magalhaes, J.P., Wenders, F., Zdanov, S., Chrétien, A., Borlon, C., Pascal, T. and Chainiaux, F. (2003) Role of subcytotoxic stress in tissue ageing. In *Topics in Current Genetics* (Vol. 3) (Nyström, T. and Osiewacz, H., eds.), Springer-Verlag
- Trautinger, F. (2001) Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clin Exp Dermatol* 26 (7), 573-577
- Tresini, M., Mawal-Dewan, M., Cristofalo, V.J. and Sell, C. (1998) A phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor induces a senescent-like growth arrest in human diploid fibroblasts. *Cancer Res.* 58 (1), 1-4
- Trielli, M.O., Andreassen, P.R., Lacroix, F.B. and Margolis, R.L. (1996) Differential Taxol-dependent arrest of transformed and nontransformed cells in the G1 phase of the cell cycle, and specific-related mortality of transformed cells. *J. Cell. Biol.* 135 (3), 689-700
- Trinei, M., Giorgio, M., Cicalese, A., Barozzi, S., Ventura, A., Migliaccio, E., Milia, E., Padura, I.M., Raker, V.A., Maccarana, M., Petronilli, V., Minucci, S., Bernardi, P., Lanfrancone, L. and Pelicci, P.G. (2002) A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene* 21 (24), 3872-3878
- Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L. and Wrana, J.L. (1998) SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95 (6), 779-791
- Uitto, J., Fazio, M.J. and Olsen, D.R. (1989) Molecular mechanisms of cutaneous aging. Age-associated connective tissue alterations in the dermis. *J Am Acad Dermatol* 21 (3 Pt 2), 614-622
- 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
- Volonte, D., Zhang, K., Lisanti, M.P. and Galbiati, F. (2002) Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. *Mol. Biol. Cell.* 13 (7), 2502-2517
- 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 ATF2 transcription factor by p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase alpha. Implications for signal/response profiles of MAP kinase pathways. *J Biol Chem* 276 (8), 5676-5684

- Wang, Y., Blandino, G. and Givol, D. (1999) Induced p21^{waf} expression in H1299 cell line promotes cell senescence and protects against cytotoxic effect of radiation and doxorubicin. *Oncogene* 18 (16), 2643-2649
- 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 (2), 475-483
- Weintraub, S.J., Prater, C.A. and Dean, D.C. (1992) Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* 358 (6383), 259-261
- Wenk, J., Brenneisen, P., Wlaschek, M., Poswig, A., Briviba, K., Oberley, T.D. and Scharffetter-Kochanek, K. (1999) Stable overexpression of manganese superoxide dismutase in mitochondria identifies hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1-mediated induction of matrix-degrading metalloprotease-1. *J Biol Chem* 274 (36), 25869-25876
- Werner, S., Peters, K.G., Lonaker, M.T., Fuller-Pace, F., Banda, M.J., Williams, L.T. (1992) Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 6896-6900
- Werner, S., Smola, H., Liao, X., Lonaker, M.T., Krieg, T., Hofschneider, P.H., Williams, L.T. (1994) The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelisation of wounds. *Science* 266, 819-822
- Wilson, H.M., Birnbaum, R.S., Poot, M., Quinn, L.S. and Swisshelm, K. (2002) Insulin-like Growth Factor Binding Protein-related Protein 1 Inhibits Proliferation of MCF-7 Breast Cancer Cells via a Senescence-like Mechanism. *Cell. Growth. Differ.* 13 (5), 205-213
- Wilson, M.R. and Easterbrook-Smith, S.B. (2000) Clusterin is a secreted mammalian chaperone. *Trends Biochem Sci* 25 (3), 95-98
- Wlaschek, M., Briviba, K., Stricklin, G.P., Sies, H. and Scharffetter-Kochanek, K. (1995) Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A-induced synthesis of interstitial collagenase. *J Invest Dermatol* 104 (2), 194-198
- Wlaschek, M., Tantcheva-Poor, I., Naderi, L., Ma, W., Schneider, L.A., Razi-Wolf, Z., Schuller, J. and Scharffetter-Kochanek, K. (2001) Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B* 63 (1-3), 41-51
- Wlaschek, M., Ma, W., Jansen-Durr, P. and Scharffetter-Kochanek, K. (2003) Photoaging as a consequence of natural and therapeutic ultraviolet irradiation--studies on PUVA-induced senescence-like growth arrest of human dermal fibroblasts. *Exp Gerontol* 38 (11-12), 1265-1270
- Wolf, F.I., Torsello, A., Covacci, V., Fasanella, S., Montanari, M., Boninsegna, A. and Cittadini, A. (2002) Oxidative DNA damage as a marker of aging in WI-38 human fibroblasts. *Exp. Gerontol.* 37 (5), 647-656
- Wong, A., Boutis, P. and Hekimi, S. (1995) Mutations in the *clk-1* gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics* 139 (3), 1247-1259
- Xu, D., Neville, R. and Finkel, T. (2000) Homocysteine accelerates endothelial cell senescence. *FEBS Lett* 470 (1), 20-24
- Xu, S. and Cobb, M.H. (1997) MEKK1 binds directly to the c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases. *J Biol Chem* 272 (51), 32056-32060
- Yannas, I.V. and Burke, J.F. (1980) Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res* 14 (1), 65-81
- 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. Commun.* 178, 124-131
- Yeo, E.J., Hwang, Y.C., Kang, C.M., Kim, I.H., Kim, D.I., Parka, J.S., Choy, H.E., Park, W.Y. and Park, S.C. (2000) Senescence-like changes induced by hydroxyurea in human diploid fibroblasts. *Exp. Gerontol.* 35 (5), 553-571
- Yoon, G., Kim, H.J., Yoon, Y.S., Cho, H., Lim, I.K. and Lee, J.H. (2002) Iron Chelation Induced Senescence-like Growth Arrest in Hepatocyte Cell lines: Association of TGF-beta1 Mediated p27^{superKip1} Expression. *Biochem. J.* 11
- Zhang, C., Lee, A., Liu, V.W., Pepe, S., Rosenfeldt, F. and Nagley, P. (1999) Mitochondrial DNA deletions in human cardiac tissue show a gross mosaic distribution. *Biochem Biophys Res Commun* 254 (1), 152-157