UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE DE LILLE

THESE

présentée pour l'obtention du grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

Sébastien MARTIEN

Rôle du stress oxydant dans la sénescence et l'initiation cancéreuse des cellules épithéliales

Soutenue publiquement le 28 Novembre 2008

Devant le jury composé de :

Président : Rapporteurs :

Examinateurs:

Directeur de thèse:

Pr. Xuefen LE BOURHIS Pr. Philippe BECUWE Pr. Eric GILSON Dr. Renata POLAKOWSKA Dr. Oliver BISCHOF Pr. Corinne ABBADIE

Remerciements

Tout d'abord j'aimerai remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail, d'apporter un œil critique sur mes travaux, ainsi que leur expertise : Les rapporteurs **Philippe Becuwe** et **Eric Gilson**, les examinateurs **Renata Polakowska** et **Oliver Bischof** et **Xuefen Le Bourhis** qui a accepté de présider mon Jury.

Je remercie très sincèrement :

Le Pr. **Yvan de Launoit**, directeur de l'UMR8161 (ex UMR 8117) qui m'a accueilli au sein de son laboratoire.

Corinne, ma directrice de thèse. Un grand merci pour ton encadrement sans faille durant ces 5 ans au laboratoire. Une bonne dose de conseils, de patience, et de persévérance, une dose d'autonomie, une dose de bonne humeur et de rires : voilà les ingrédients de mon encadrement pendant ces 4 années de thèse et probablement l'un des encadrements qui me correspondait le plus. Merci de m'avoir aidé à passer les différentes étapes de la thèse, surtout lors des moments les plus durs. Merci également d'avoir contribué à ma petite gymnastique quotidienne, le réflexe de Pavlov ça marche !! et de m'avoir bercé au son mélodieux et réconfortant du clavier (avec seulement 2 index s'il vous plait). Encore Merci !

Un grand merci à **Chantal**, avec qui j'ai fait mes premiers pas en culture cellulaire. Pour tes nombreux conseils avisés, ton aide, ta passion pour le chocolat (cela nous a permis de gouter à de bons gâteaux et de succulents chocolats). Merci également pour ton aide précieuse dans la dernière ligne droite de ma thèse !

Un grand merci à toutes ces personnes qui ont contribué à la réussite de cette thèse, ou tout simplement pour leur soutien. A mes amis, A mes collègues...

Dans l'ordre alphabétique pour ne pas faire de jaloux :

Albin, pour son sérieux et son aide précieuse pour les manips in vivo, même si il n'est pas toujours évident de rester concentré pour faire des jeux de lumières pour la prise de photos de « tits » de souris ! :-p ; Alessandro, oh bonne mère ! Je pensais que mon régime allait se porter mieux après ton départ, mais certains ont pris le relai... en pire ! Audrey, la plus dominesque des Dominas, au coup de fouet inimitable, et dont le cuir en a asservi plus d'un !; « Aux dames de la laverie » ; Béné et Fred, au poussin n^o2, alors on la monte cette crêperie discothèque ? Fred, premier sur la liste, donc premier à avoir la sentence ultime. Ce

fut un plaisir de partager ces années au labo avec vous deux au labo. Bon courge pour la suite !!; Bernard Vandenbunder; Caro, la petite rouginasse toujours partante pour un ptit tour à lkea jouer à un petit jeu à la période de God Jul au pizza Hut pour se faire un ptit plat à emporter sur place, suivi d'une balade au kiosk, pour accoucher d'une table basse après avoir nettoyé la voiture au Karcher ! J'espère encore partager de nombreuses conneries !; Catherine, ma petite Maman Sarah !! Je te hais, je te déteste, je te maudis ! Ca te dit un petit démontage de desserte à 1h du mat ? Je vois que ça aura servi à quelque chose que je t'accompagne aux 3 Brasseurs ! Merci de m'avoir poussé au cul quand il le fallait ! Cindy, poussin n°1, des talons dans la neige ca doit faire beaucoup moins de bruit non ? David Tulasne, Didier Deslee, toujours dispo pour régler les problèmes de microscope ou pour un conseil technique; Elisa; Emeric, merci pour tous ces kilos que j'ai pu prendre me fournissant une belle petite couche de graisse protectrice pour l'hiver! Pour ce vice permanent pour les choses grasses, sucrée mais tellement bonnes !! Tu mérite la sentence ultime F!; Fatima, à ce magnifique sourire qui nous a manqué pendant ces 3 ans ! Bon retour au labo !; Fazia, le bonjour à notre ami Brice ! C'est pas beau de dire des gros mots en sale culture ! Gilles, der martien ! T'es vilain ! la la la la la ! J't'ai à l'œil tu sais ! Rien de tel qu'une bonne tête de cul à la piscine de Ronchin, baignant dans une bonne eau bien chaude... et trouble... Tellement plus original !;-p ; Ghaffar, je t'avais pourtant dit que les mots « Thèse », « Soutenance », « Mémoire » et « Occolithophoridés » étaient interdits !; Jonathan, c'est l'histoire de trois nains qui vont dans la forêt; Julie Bertout, pour les manips de cyto, sa disponibilité; Julien, california dreaming.. lalalalala...; Justine, ma petite chatte adorée ! A cette jeunesse fougueuse rythmée au son de labush, du pulse et des périples en tout genre. Fini le temps du teint frais après une longue nuit blanche ! A nous la petite soupe du soir, le bide qui se relâche. Nunus forever ; Karo, ex voisine de bureau et co-équipière pour nos expéditions belges !; Laurent Heliot, pour les manips de confocal ; Majid, au plus scottish des méditerranéens avec son killing smile! oh mon dieu ! dis pas caaaaa !!; Marie-Christine et Nicole, les deux secrétaires de choc ! Pour leur efficacité, leur disponibilité, leur bonne humeur et leur sourire ; Nathalie Jouy, pour les manips de tri aux FACS ; Nicolas, t'as pas honte de draguer les petites italiennes ? Toi aussi tu mérites la sentence ultime F !: Pierre, avant-gardiste du porté de blouse à la mode exhib : Séverine, l'alcolo de service, l'experte en boules et en chaussures inadaptées ; Véronique Fafeur.

Enfin, je tiens à remercier plus que chaleureusement **mes parents, ma soeurette et mon frangin** toujours là pour leur grand garçon, leur grand frère. Oui Maman, oui Papa, mes bestioles (comprendre mes cellules) ont fini de m'embêter (donner enfin des résultats publiables).

Un clin d'œil à **mes grands-parents**... « non papy mon labo ne peut pas m'embaucher juste après ma thèse, comment te dire ? c'est un peu plus compliqué. » « Non mamie, je n'ai hélas pas trouvé de vaccins. Sur quoi je travaille ? Bon, sors ton petit carnet de note je vais t'expliquer!... »

Ce travail n'aurait été ce qu'il est sans l'aide précieuse apportée par les différentes collaborations:

Le Laboratoire de Cytogénétique de l'Hôpital Erasme à Bruxelles : au **Dr. Laurence Duprez**, et à **Magali** pour les expériences de cytogénétique.

Le Laboratoire de Radiologie et d'Oncologie, au CEA Fontenay-aux-Roses : au **Dr. Laure Sabatier**, **Géraldine Pottier**, et **Peter Oistoich** pour les expériences de FISH.

Le laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule à l'ENS Lyon : au **Pr. Eric Gilson** et **Sébastien Pinte** pour les expériences de TIFS. Oui **Seb**, les kératinocytes sont des petites cellules délicates et capricieuses ! Merci à **Ingrid**, ...

Comme le dirait Dora et notre cher ami babouche:

« C'est gagné, c'est gagné! Yes we did it»

RESUME

Après un certain nombre de divisions, les cellules primaires entrent en sénescence, un état caractérisé par des modifications morphologiques, biochimiques et un arrêt de croissance. Deux principaux mécanismes concourent à l'établissement de la sénescence : le raccourcissement des télomères et l'accumulation de dommages oxydants. La sénescence est généralement considérée comme une barrière au développement tumoral.

Nous montrons dans ce travail que la sénescence pourrait aussi contribuer à l'initiation cancéreuse. En effet, dans des cultures de kératinocytes sénescents nous observons l'émergence systématique de cellules transformées et tumorigènes. Ces cellules se forment à partir d'une fraction de cellules sénescentes, par un mécanisme de mitose atypique. La sénescence des kératinocytes s'accompagne d'une accumulation de dommages oxydants mutagènes (cassures simple brin, guanines oxydées et pontages moléculaires). Par ailleurs, les télomères ne sont que très peu érodés et les voies d'arrêt dans le cycle cellulaire induites par les cassures double-brin ne sont pas activées. Pour comparaison, dans les fibroblastes qui n'émergent jamais, on observe à la sénescence moins de dommages oxydants dans le noyau, des télomères devenus très courts et l'activation des voies d'arrêt dans le cycle. Ainsi, l'émergence résulterait de l'effet mutagène du stress oxydant associé à la sénescence et nécessiterait des télomères suffisamment longs.

En conclusion, nous mettons en évidence dans ces travaux un nouveau mécanisme potentiel de cancérisation des cellules épithéliales, dans lequel la sénescence constituerait l'étape initiale et le stress oxydant jouerait le rôle de carcinogène endogène.

Mots clés : Sénescence, stress oxydant, télomères, dommages à l'ADN, carcinogenèse

Cette thèse a été réalisée sous la direction du Professeur Corinne ABBADIE à l'UMR8161, Institut de Biologie de Lille / Equipe Initiation des Cancers Epithéliaux 1, rue du Pr. Calmette 59021 Lille Cedex

Involvement of oxidative stress in senescence and cancerous initiation of epithelial cells

After a finite number of divisions, primary cells enter senescence, a state characterized by morphological and biochemical modifications, and by cell cycle arrest. Two mains events promote the establishment of senescence: telomere shortening and cumulative oxidative stress. Senescence is generally considered as a barrier against tumorigenesis.

We show in this work that senescence could also contribute to the cancerous initiation. Indeed, in culture of senescent keratinocytes we observe the systematic emergence of transformed and tumorigenic cells. These cells arise from a fraction of the senescent cell population, by a mechanism of atypical mitosis. Keratinocyte senescence is accompanied by an accumulation of mutagenic oxidative damages (single-strand breaks, oxidized guanines, and cross-linkings). In addition, telomeres are weakly eroded and cell cycle arrest pathways induced by double-strand breaks are not activated. In comparison, in fibroblasts which never emerge, we observe less oxidative damages in nucleus, very short telomeres, and the activation of cell cycle arrest pathways. Hence, emergence would result from mutagenic oxidative stress and would require enough long telomeres.

In conclusion, we highlight in this work a new potential mechanism of epithelial cell carcinogenesis, wherein senescence would constitute the initial step and oxidative stress would act as an endogenous carcinogen.

Keywords: Senescence, oxidative stress, telomeres, DNA damage, carcinogenesis

TABLE DES MATIERES

TABLE DE	S ILLUSTRATIONS	•••••
ABBREVIA	TIONS	•••••
INTRODUC	TION	•••••
1. LA	SENESCENCE CELLULAIRE	
1.1.	Description de la sénescence	
1.2.	Rôle des télomères dans la sénescence	
a)	Structure des télomères	
b)	La maintenance des télomères	
c)	Le raccourcissement des télomères et la sénescence	
1.3.	Rôle du stress oxydant dans la sénescence	
a)	Qu'est-ce que le stress oxydant ?	
b)	Les sources de ROS	
c)	Réactivité des ROS	
d)	Les dommages engendrés par les ROS à la cellule	
e)	Les défenses contre le stress oxydant	
f)	Réparation des dommages oxydants	
g)	Stress oxydant et sénescence	
2. LA	SENESCENCE CELLULAIRE : UN MODELE IN VITRO D'ETUDE DU VIEILLISSEMENT	
2.1.	Les cellules sénescentes s'accumulent avec l'âge in vivo	
2.2.	La taille des télomères diminue avec l'âge	
2.3.	Les dommages oxydants s'accumulent avec l'âge	
2.4.	Apport des expériences de restriction calorique	
2.5.	Apport des syndromes de vieillissement prématuré	
2.6.	Apport des modèles de souris manipulées génétiquement	
3. Liei	N ENTRE SENESCENCE ET TUMORIGENESE	
3.1.	Rôle suppresseur de tumeur de la sénescence	•••••
3.2.	Rôle promoteur de tumeur de la sénescence	
RESULTA	۶	•••••••••••
1. M⊨	CANISMES DE SENESCENCE CELLUI AIRE	

	1.1.	Données préalables sur le rôle du stress oxydant dans la sénescence des kératinocytes 49
	1.2.	Rôle de l'activité COX-2 dans la sénescence normale ou induite des fibroblastes 50
	a)	Introduction
	b)	Résultats
	c) des f	Données complémentaires : Mécanismes d'action de la COX-2 dans le processus de sénescence ibroblastes
	d)	Conclusion et discussion
2.	LA M	ORT DES CELLULES SENESCENTES
	2.1.	Introduction
	2.2.	Résultats sur le mécanisme de mort des kératinocytes60
	2.3. sénesc	Données complémentaires sur le rôle du stress oxydant dans la mort des cellules centes par autophagie
	a) et au	Les kératinocytes sénescents et mourants présentent des dommages oxydants aux mitochondries noyau
	b)	La mort des kératinocytes par autophagie résulte de l'accumulation de dommages oxydants62
	c)	Conclusion et discussion
	2.4.	Données complémentaires sur la mort des fibroblastes sénescents
3. EF	Roli Pitheliai	E DU STRESS OXYDANT DANS LA SENESCENCE ET L'INITIATION TUMORALE DES CELLULES .ES
	3.1. de cell	Les dommages oxydants à l'ADN associés à la sénescence participent à la génération ules cancéreuses initiées
	a)	Introduction
	b)	Résultats
	c)	Conclusion et discussion70
	3.2. Ies fibr	Les kératinocytes accumulent plus de dommages oxydants à l'ADN à la sénescence que oblastes : rôle dans l'initiation cancéreuse71
	a)	Introduction
	b)	Résultats71
	c)	Conclusions
DISC	CUSSIO	N73
1. DI	Les FFERENT	FIBROBLASTES ET LES KERATINOCYTES DE PEAU PRESENTENT DES MECANISMES DE SENESCENCE 'S
	1.1. fibrobla	Importance relative des ROS dans la sénescence et la mort des kératinocytes et des astes
	1.2. kératin	Importance relative du raccourcissement des télomères dans la sénescence des ocytes et des fibroblastes
	1.3. fibrobla	Rôle de la COX-2, des prostaglandines et du glutathion dans la sénescence des astes
2. EF	Des PITHELIAI	CELLULES TRANSFORMEES ET TUMORIGENES SONT CAPABLES D'EMERGER DE CELLULES .ES SENESCENTES

	2.1. transfor	Les cellules qui émergent du plateau de sénescence des kératinocytes sont rmées et tumorigènes bien que non immortalisées	75
	2.2. bourge	Les cellules sénescentes donnent naissance aux cellules émergentes par onnement	76
3.	Lesi	DOMMAGES A L'ADN : UN ELEMENT CLE DU DEVENIR DES CELLULES SENESCENTES	.77
	3.1.	Les dommages oxydants à l'ADN : le moteur mutagénique de l'initiation cancéreuse	77
	3.2.	Les dommages télomériques: un frein à l'initiation cancéreuse ?	78
4.	LA SE	ENESCENCE : ETAPE INITIALE VERS LA CARCINOGENESE ?	.79
	4.1.	L'initiation cancéreuse passe par la sénescence, pas par son évitement	79
	4.2.	La sénescence, étape initiale de la tumorigenèse in vivo ?	80
	4.3.	La mort par autophagie : un processus suppresseur de tumeur ?	83
	4.4.	La sénescence : une arme à double tranchant ?	85

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures	10
Figure 1. La seriescence des libroblasies	10
Figure 2 : Structure des telomeres chez les mammilleres	13
Figure 3: Le raccourcissement des telomeres	14
Figure 4 : Elongation des telomeres par la telomerase	15
Figure 5 : Principaux sites de production d'anion superoxyde dans la chaine de transport des	20
Elections	20
Figure 6. Schema de la initiation et de propagation de l'oxydation des lipides	22
Figure 7. Principaux sites de production et de degradation des ROS	24
Figure 8: Cycle catalytique de la glutatriton peroxydase	21
Figure 9: Reactions enzymatiques du système thioredoxine	28
Figure 10 : Systeme antioxydant associe au glutathion	28
Figure 11 : Reparation des cassures simple brin induites par les ROS	31
Figure 12 : Reparation des cassures double brin (DSB) par HR et NHEJ	32
Figure 13 : Reparation par Excision de Base (BER)	34
Figure 14 : Reparation par Excision de nucleotides (NER)	35
Figure 15 : Mecanisme hypothetique de tumorigenese par echappement a la senescence	45
Figure 16 : Les antioxydants ne retardent pas la survenue de la senescence des fibroblastes	54
Figure 17: Expression des ARNm des recepteurs membranaires aux prostaglandines couples aux	
protéine-G	55
Figure 18 : Le PGE2 induit une sénescence prématurée via la voie para/autocrine	56
Figure 19 : Le PGE2 induit la sénescence prématurée via la voie intracrine.	57
Figure 20 : Le GSH inhibe la sénescence des fibroblastes induite par PGE ₂	58
Figure 21 : Le GSH retarde la sénescence normale des fibroblastes	59
Figure 22 : Les mitochondries et le noyau des cellules sénescentes et autophagiques souffrent de	
stress oxydant.	64
Figure 23 : L'induction d'un stress oxydant <i>via</i> la surexpression de la MnSOD induit une mort par	
autophagie	65
Figure 24 : L'inhibition de l'autophagie, et non de l'apoptose, retarde la mort des cellules induites en sénescence par H ₂ O ₂	66
Figure 25 : L'inhibition du niveau de stress oxydant retarde la mort des cellules par autophagie 6	67
Figure 26 : Proposition de modèle de cancérisation des cellules épithéliales	83

Tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des principaux syndromes progéroïdes et les protéines impliquées dans c	es
syndromes.	. 42
Tableau 2 : Récapitulatif des modèles de vieillissement prématuré chez la souris	. 43

ABBREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ALT	Alternative Lengthening of Telomeres
AP-1	Activator Protein 1
APB	ALT-associated PML bodies
ARN	Acide Ribonucléique
ATM	Ataxia Telangiectasia, Mutated
ATP	Adénosine Triphosphate
Bcl-2	B Cell Leukemia 2
BER	Base Excision Repair
BLM	Bloom
BRCA	Breast Cancer
CDK	cyclin-dependent kinase
CHK2	Checkpoint Kinase 2
COX-2	Cyclo-oxygénase-2
CuZnSOD	Cuivre Zinc Superoxyde Dismutase
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
DSB	Double Strand Break
EP (récepteur)	E-Prostanoïde (récepteur)
GPX	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion Réductase
GSH	Glutathion forme réduite
GSSH	Glutathion forme oxydée
HMEC	Human Mammary Epithelial Cell
HNE	4-hydro-2(E)-nonenal
HR	Homologous Recombinaison
HUVEC	Human umbilical Vein Endothelial Cell
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL-1	Interleukin-1
ImK	Immortal Keratinocyte
MDA	malondialdéhyde
MEF	Murine Embryonic Fibroblast
MnSOD	Manganèse Superoxyde Dismutase
MRE11	Meiotic Recombination 11
MTH1	Mut1 Homolog 1
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBS1	Nijmegen Breakage Syndrome 1
NER	Nucleotide Excision Repair
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B

NHEJ	Non Homologous End Joining
NHEK	Normal Human Epidermal Keratinocyte
NIH3T3	National Institute of Health 3T3
NtBHA	N-tert-butyl-hydroxylamine
p66 shc	p66 Sarc Homology Collagen
PARP1	Poly-adenosyl Ribonucleotidyl Phosphorylase-1
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PG	Prostaglandine
PGT	Prostaglandin Transporter
PHGPX	Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase
PML	Promyelocytic Leukemia Protein
POT-1	Protection Of Telomere-1
Prx	Peroxyrédoxine
PTEN	Phosphate and TENsin homolog
RAP1	Repressor / Activator Protein
Rb	RetinoBlastoma
Rif1	RAP1-Interacting Factor 1
ROS	Reactive Oxygen Species
RPA	Replication Protein A
RT-PCR	Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction
SA-β-gal	Senescence-Associated-beta-Galactosidase
SSB	Single Strand Break
TERT	Telomere Reverse Transcriptase
TGF-β1	Transforming Growth Factor β1
TIN2	TRF1-interacting nuclear factor 2
TNF	Tumor Necrosis Factor
TR ou TERC	Telomerase RNA (ou Telomerase RNA Component)
TRF	Telomere repeat factor
Trx	Thiorédoxine
U.V.	UltraViolet
WRN	Werner
XPA, C, F	Xeroderma Pigmentosum Complementation group A, C, F
XRCC	X-Ray Repair Cross Complementing
2-hydroxy-dATP	2-hydroxy-deoxyadenosine triphosphate
8-oxo-dATP	8-hydroxy-deoxyadenosine triphosphate
8-oxo-dG	8-hydroxy-deoxyguanosine
8-oxo-dGTP	8-hydroxy-deoxyguanosine triphosphate
53BP1	p 53 Binding Protein 1

INTRODUCTION

1. LA SENESCENCE CELLULAIRE

1.1. Description de la sénescence

Dans les années 60, Hayflick et Moorheard découvraient que les fibroblastes humains dérivés de tissus d'embryon ont une durée de vie limitée. En effet, au fur et à mesure du temps et des divisions, ces cellules perdent leur capacité proliférative (figure 1A). Après une phase de croissance, elles entrent dans un état non prolifératif appelé « sénescence réplicative » (ou stade de mortalité 1, M1) (Hayflick, 1965). Ce phénomène a été décrit par la suite dans divers types de cellules dont les cellules gliales, les kératinocytes, les cellules musculaires lisses, les cellules du cristallin, les cellules endothéliales et les lymphocytes, ainsi que dans différentes espèces (Cristofalo et al., 2004).

Lors de la sénescence, un certain nombre de changements morphologiques et moléculaires sont observés. Les cellules s'étalent sur le substrat et leur volume augmente, avec également une augmentation de la taille du noyau et des nucléoles (figure 1B) (Cristofalo, 1988; Macieira-Coelho, 1966). Elles accumulent des vacuoles dans le cytoplasme et développent une activité particulière SA- β -galactosidase à pH=6, due à l'augmentation de la masse lysosomiale (Kurz et al., 2000). Cette activité constitue un marqueur spécifique de la sénescence (Dimri et al., 1995). Certaines cellules sont polynucléées (Sherwood et al., 1988). Les cellules sénescentes présentent un niveau de dommages oxydants à l'ADN plus élevé que les cellules jeunes (Chen et al., 1995; Kaneko et al., 2001; Kang et al., 2005a; Wolf et al., 2002). Bien qu'apparemment inertes, les cellules sénescentes maintiennent une activité métabolique et peuvent rester dans cet état de longues semaines ou mois (Pignolo et al., 1994).



Figure 1 : La sénescence des fibroblastes

(a) Courbe de croissance des fibroblastes normaux de derme humain. (B) Morphologie des fibroblastes jeunes et sénescents (données personnelles non publiées)

La sénescence se caractérise par un arrêt irréversible dans le cycle cellulaire, c'est-à-dire non ré-inductible par apport de facteurs de croissance, le plus souvent mais pas exclusivement, à la transition G1/S (Cristofalo et al., 2004; Hayflick, 1965; Smith & Pereira-Smith, 1996). Les voies impliquées dans cet arrêt du cycle sont les voies classiques d'arrêt du cycle cellulaire p19/p53/p21^{Cip1/waf1} et p16^{INK4}/Rb (pour revue voir Ben-Porath & Weinberg, 2005; Bringold & Serrano, 2000). Lors de la sénescence, p53 et Rb sont activés. La protéine p53 est stabilisée, et elle active ses différentes cibles transcriptionelles dont p21^{cip1/waf1}, un inhibiteur de CDK (Kulju & Lehman, 1995). L'activation de p53 conduit également à l'activation de Rb. Rb est alors retrouvée sous sa forme hypophosphorylée, sous laquelle il se lie aux membres de la famille E2F pour réprimer leur activité transcriptionelle. La protéine p16^{INK4} est un inhibiteur du complexe cyclinD/Cdk4,6 impliqué dans la progression du cycle et son activité mène également à l'activation de Rb. P16 est induit lors de différents stress et est fortement exprimée dans les cellules sénescentes (Alcorta et al., 1996; Palmero et al., 1997). Ainsi, Rb peut être activée par l'une des voies p53/p21 ou p16, ou par les deux en parallèle. Selon le type cellulaire concerné, l'inhibition de l'une ou l'autre de ces voies retarde la survenue de la sénescence ou empêche son établissement et immortalise les cellules (Ben-Porath & Weinberg, 2005).

Plusieurs mécanismes concourent à l'établissement du phénotype sénescent : le raccourcissement des télomères, le stress oxydant d'origine endogène (Chen et al., 1998; Chen et al., 2000) ou induit par des sources externes comme les UV (Chainiaux et al., 2002; Debacq-Chainiaux et al., 2005), et la surexpression de certains oncogènes (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006; Mallette et al., 2007). Les données accumulées sur ces mécanismes de sénescence semblent montrer que leur médiateur commun est le dommage à l'ADN (Chen et al., 2007a; von Zglinicki et al., 2005).

1.2. Rôle des télomères dans la sénescence

a) Structure des télomères

Le terme « télomère », du grec telos « fin » et meros « partie », désigne l'extrémité des chromosomes chez les eucaryotes. Ces télomères sont des structures nucléo-proteiques complexes nécessaires à la viabilité de la cellule, la protection contre les fusions et la dégradation nucléolytique des extrémités chromosomiques, la localisation des chromosomes dans le noyau, la ségrégation des chromosomes lors de l'anaphase, la recombinaison de chromosomes homologues lors de la méïose, et la réparation des cassures double brin de l'ADN (Callen & Surralles, 2004).

La séquence télomérique longue de 10-15kb chez l'homme, riche en G, consiste en un ADN double brin dans lequel se répète une séquence non codante en tandem, -TTAGGG- chez l'homme, et dont l'extrémité 3' est protubérante (de Lange et al., 1990; Moyzis et al., 1988). Cette extrémité 3' protubérante, longue d'environ 200 nucléotides, se replie et va envahir l'ADN double brin télomérique,

les bases s'appariant avec le brin C et remplaçant le brin G. L'invasion de l'extrémité 3' se fait à une certaine distance de la fin physique des télomères et résulte en une large structure en lasso appelée Boucle T (T-loop) (Griffith et al., 1999). Cette structure en boucle, stabilisée par la fixation de protéines télomériques spécifiques, va ainsi empêcher la reconnaissance de l'extrémité des chromosomes comme une cassure (de Lange, 2002) (figure 2).

Les télomères sont également constitués de nombreuses protéines jouant de nombreuses fonctions. Les protéines télomériques, qui sont pour la plupart constitutivement exprimées, sont nécessaires à la protection, la stabilité, la réplication et/ou l'élongation des télomères (Blackburn, 2000). A nos jours, 6 principales protéines télomériques ont été identifiées chez l'homme: TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, POT1 et TPP1. Ces protéines télomériques forment un complexe de haut poids moléculaire appelé « Télosome » (ou Shelterin) qui protège les télomères et régule leur longueur (de Lange, 2005; Liu et al., 2004). Les protéines TRF1 et TRF2 (Telomere Repeat-binding Factor 1 and 2) sont directement associées à l'ADN double brin télomérique via leur domaine SANT/myb (Broccoli et al., 1997). Ces domaines SANT/myb se fixent sur la séquence 5'-YTAGGGTTR-3' au niveau de l'ADN double brin, et ont une faible tolérance pour des changements de base ponctuels (Bianchi et al., 1999; Court et al., 2005). La protéine POT1 (Protection Of Telomere 1) contient deux domaines OB fold (oligonucleotide/oligosaccharide/oligopeptide-binding fold) en son extrémité N-terminale qui se fixent avec une haute affinité sur des sites 5'-(T)TAGGGTTAG-3' au niveau de l'ADN simple brin télomérique, c'est-à-dire au niveau de l'extrémité 3' protubérante (Lei et al., 2004). TRF1 et TRF2 forment chacun des homodimères, et des oligomères d'ordre supérieur. TRF1 et TRF2 sont connectées à POT1 via TIN2, Rap1 et TPP1 (anciennement nommé PTOP/PIP1/TINT1) (O'Connor et al., 2006). TIN2 (TRF1-interacting nuclear factor 2) joue un rôle primordial dans l'assemblage du complexe TRF1-TRF2-POT1: elle permet le rapprochement de TPP1/POT1 de TRF1 et TRF2, mais elle connecte aussi TRF1 à TRF2, et cette connexion permet la stabilisation de TRF2 sur les télomères (Liu et al., 2004; Ye et al., 2004). L'absence de TIN2 mène à la disparition du lien entre les sous-complexes TRF1 et TRF2. La fixation de TIN2 peut se faire au niveau de TRF1 ou TRF2, les couples TIN2-TRF1 et TIN2-TRF2 peuvent, semble-t-il, exister dans des complexes séparés. TPP1, semble également jouer un rôle important dans l'association de ces complexes via son interaction avec TIN2, puisqu'il va stabiliser les interactions TIN2-TRF2 et TRF1-TIN2-TRF2 et ainsi favoriser l'assemblage du télosome (O'Connor et al., 2006).



Figure 2 : Structure des télomères chez les mammifères

(A) Les télomères contiennent une région de répétition d'ADN double brin TTAGGG (flèches vertes) de 10-15kb chez l'homme et 25-40kb chez la souris (B) Conformation de la boucle T des télomères. Le brin 3' protubérant qui envahit l'ADN télomérique double brin figure en rouge. (C) Composition des complexes TRF1 et TRF2. *Adaptée de (Blasco, 2005)*

b) La maintenance des télomères

1) L'allongement des télomères par la télomérase

Le mode de fonctionnement même de l'ADN polymérase alpha (pol α) ne permet pas la réplication des séquences les plus distales des chromosomes sur le brin retardé. En effet, alors que la synthèse du brin direct se réalise jusqu'à la fin du brin parental, la synthèse du brin retardé, lui, s'effectue *via* une multitude de fragments d'Okazaki initiés par de petits ARNs amorces, positionnés à une distance chacun d'environ 200pb. Après digestion des ARNs, l'espace entre les fragments d'Okazaki laissé par les ARN amorces est comblé par la synthèse d'ADN, puis les fragments sont ligaturés. Lorsque l'avant dernier fragment est initié à moins de 200 pb de l'extrémité 3', le dernier fragment ne peut être initié. Ceci laisse un brin 3' protubérant et entraine le raccourcissement du brin retardé à la réplication suivante, et donc le raccourcissement des télomères à chaque division (Shay & Wright, 2000) (figure 3).



Raccourcissement de la molécule d'ADN

Figure 3 : Le raccourcissement des télomères

La copie du brin retardé est incomplète car le dernier fragment d'Okazaki ne peut être initié. Ceci est dû au fait que les fragments sont synthétisés environ tous les 200pb. Si un fragment est synthétisé à moins de 200pb de l'extrémité 3', le dernier fragment ne peut être initié. La molécule fille se retrouve ainsi avec une extrémité 3' protubérante. Lorsqu'elle est répliquée, elle donne alors naissance à une molécule d'ADN raccourcie par rapport au brin initial. *Adaptée de Genomes, 2nd Edition, T.A. Brown. Garland Science.*

Le raccourcissement des télomères peut être compensé par l'activité d'une transcriptase inverse : la télomérase. La télomérase (telomere terminal transferase), décrite la première fois chez *Tetrahymena thermophila* (un protozoaire cilié) (Greider & Blackburn, 1985), n'a été identifiée qu'en 1989 chez l'homme (Morin, 1989). Cette enzyme est une ribonucléoprotéine composée de 2 sousunités : une sous unité catalytique à l'activité rétro-transcriptase de 127kDa (hTERT, chez l'homme) et une sous-unité ARN (hTR, chez l'homme) de 451 nucléotides. Ces deux sous-unités suffisent à reproduire une activité télomérase *in vitro* (Beattie et al., 1998; Weinrich et al., 1997). L'ARN contient une petite séquence complémentaire de la séquence télomérique permettant à la télomérase de se positionner à l'extrémité télomérique et servant de matrice à la sous unité catalytique qui va donc rallonger le télomère par son extrémité 3' (Feng et al., 1995; Nakamura & Cech, 1998) (figure 4). Le brin 5' complémentaire est quant à lui synthétisé ensuite par l'ADN polymérase alpha ; l'extrémité télomérique se retrouve ainsi rallongée.



Figure 4 : Elongation des télomères par la télomérase

Adaptée de http://www.genomeknowledge.org « Telomere extension by telomerase » de Blackburn EH et Seidel J.

La régulation transcriptionelle semble être le principal mécanisme de régulation de hTERT et hTR (Cairney & Keith, 2008; Meyerson et al., 1997; Nakamura et al., 1997). Même si les mécanismes du contrôle transcriptionnel de hTERT ne sont pas bien connus, il a été établi que son promoteur contient des régions consensus pour divers facteurs et voies de signalisation (Dong et al., 2005; Janknecht, 2004). L'activité télomérase est également dépendante de ses interactions avec les différentes protéines télomériques qui peuvent réguler l'accès de la hTERT aux télomères.

L'allongement alternatif des telomères (ALT = Alternative Lengthening of Telomeres)

La découverte de cet autre système de maintenance des télomères est venue de l'observation que certaines lignées cellulaires humaines immortalisées étaient capables de maintenir leur longueur télomérique, et ce malgré l'absence d'activité télomérase. Alors que dans les lignées qui expriment la télomérase les télomères ont une taille relativement homogène et inférieure à 10kb, l'une des caractéristiques des cellules présentant ce système ALT est la présence de télomères plus longs (20kb en moyenne) et très hétérogènes (de moins de 3kb à plus de 50kb) (Bryan et al., 1995). Ce système ALT est rencontré dans les cellules humaines immortalisées, les cellules tumorales humaines ou les tumeurs et lignées dérivées de souris nulle pour la télomérase (Chang et al., 2003; Henson et al., 2002), ainsi que lors du développement précoce (Liu et al., 2007). L'une des principales caractéristiques des cellules ALT est la présence de corps PML (promyelocytic leukemia protein) associés à de l'ADN télomérique et à des protéines spécifiques des télomères comme TRF1 et TRF2

(Yeager et al., 1999). Ces corps associés à des éléments télomériques sont retrouvés uniquement dans les cellules ALT et sont connus sous le nom d'APB (ALT-associated PML bodies).

Les mécanismes impliqués dans l'allongement alternatif des télomères sont encore mal connus, mais ils semblent être dépendants des recombinaisons homologues. Les cellules ALTpositives présentent une forte augmentation du nombre d'échanges inter-télomériques post-réplicatifs comparées à des cellules contrôles (Londono-Vallejo et al., 2004). Beaucoup de ces échanges télomériques paraissent inégaux, entrainant des gains ou des pertes réciproques de séquence télomérique au niveau des extrémités chromosomiques concernées. Cependant, aucune augmentation des recombinaisons homologues génomiques n'est observée dans les cellules ALTpositives comparées aux cellules contrôles, suggérant une dysfonction spécifique des télomères dans ces cellules plutôt qu'une augmentation générale des recombinaisons (Bechter et al., 2004; Bechter et al., 2003). Un certain nombre de protéines impliquées dans la réplication, la recombinaison ou la réparation de l'ADN (RAD51, RAD52, RPA, MRE11, RAD50, NBS1, BLM et WRN) est retrouvé au niveau des APB et semble jouer un rôle dans le système ALT (Johnson et al., 2001; Stavropoulos et al., 2002; Tarsounas et al., 2004; Wu et al., 2000; Yeager et al., 1999). Le système ALT semble être contrôlé par un ou plusieurs gènes capables de supprimer son activité. En effet, la fusion de cellules ALT avec des cellules normales résulte en des hydrides sénescents ayant perdu ALT (Perrem et al., 1999). Une étude récente a permis d'identifier un des suppresseurs du système ALT : Sp100, un constituant des corps PML. La protéine Sp100 inhibe le système ALT via la séquestration du complexe MRE11/RAD50/NBS1, un élément nécessaire à ALT (Jiang et al., 2005).

3) Rôle des protéines télosomiques dans la maintenance des télomères

L'efficacité des différents systèmes impliqués dans la maintenance télomérique dépend de leur recrutement au niveau des télomères. Ce recrutement dépend lui-même de l'accessibilité de l'ADN télomérique et des interactions moléculaires entre les protéines télosomiques et les protéines constituant les systèmes de maintenance. En plus de leur rôle structural, les protéines télosomiques ont donc un rôle dans la régulation de la maintenance des télomères. Ainsi, TRF1 s'avère être un régulateur négatif de la longueur des télomères. Sa surexpression provoque un raccourcissement des télomères et, à l'inverse, la surexpression d'un mutant dominant-négatif de TRF1 mène à une élongation des télomères (Smith et al., 1998; Smogorzewska et al., 2000; van Steensel & de Lange, 1997). TRF2 est également impliqué dans la régulation de la longueur des télomères (Richter et al., 2007). L'interaction entre TRF1 et TRF2 semble être essentielle au maintien des télomères. En effet, la diminution des niveaux de TRF1 résulte en une baisse de la localisation de TRF2 au télomère (lwano et al., 2004).

L'intégrité télomérique résulte du maintien de la longueur télomérique mais aussi du maintien de la structure télomérique, afin que l'extrémité télomérique reste protégée. Le rôle principal de TRF2 réside dans cette protection de l'extrémité télomérique. Des expériences menées par Griffith *et al.* ont montré que TRF2 suffit, à elle seule, à la mise en place de la boucle T *in vitro* (Griffith et al., 1999). L'expression de dominants négatifs de TRF2, ou la délétion de TRF2, entraine une déstabilisation de

la structure des télomères, conduisant à une réponse au dommage à l'ADN au niveau des télomères, et à une augmentation du taux de fusions entre les extrémités télomériques (Celli & de Lange, 2005; van Steensel et al., 1998).

POT1, comme TRF2, régule la longueur des télomères et protège l'extrémité chromosomique du dommage à l'ADN, de la dégradation rapide et des fusions télomériques (Churikov et al., 2006; Colgin et al., 2003; Wu et al., 2006). De plus, le complexe POT1-TPP1 est capable de recruter la télomérase et de stimuler son activité (Wang et al., 2007; Xin et al., 2007).

Un certain nombre de protéines impliquées dans différentes voies de réparation de l'ADN se localise au niveau des télomères, notamment en interagissant directement avec TRF2 ou via Rap1. Il s'agit notamment des protéines RAD50/MER11/NDS1, Ku86, et ERCC1/XPF (O'Connor et al., 2004; Zhu et al., 2000; Zhu et al., 2003). La surexpression de TRF2 dans des fibroblastes humains diminue la réparation des cassures simple brin au niveau des télomères et accélère leur raccourcissement (Richter et al., 2007). Cette diminution de la réparation des dommages aux télomères résulte probablement d'un accès des enzymes de réparation rendu plus difficile par la plus grande stabilisation par TRF2. Cela pourrait également s'expliquer par le fait que TRF2 pourrait inhiber la reconnaissance du dommage par ATM. En effet, il a été montré que TFR2 inhibe la phosphorylation d'ATM *in vitro*, ainsi que sa réponse générale aux dommages. (pour revue voir Blasco, 2005).

c) Le raccourcissement des télomères et la sénescence

1) Les télomères : l'horloge mitotique

Chez l'homme, l'activité télomérase est finement régulée tout au long du développement et selon le type cellulaire. L'activité télomérase présente dans l'embryon au cours du développement va persister seulement dans un petit nombre de cellules chez l'adulte, dont les cellules germinales (Zalenskaya & Zalensky, 2002), les cellules souches (Mason, 2003), et les lymphocytes activés (Buchkovich & Greider, 1996). L'activité télomérase est peu ou pas détectable dans la plupart des autres cellules somatiques post-embryonnaires. L'absence d'activité télomérase entraine le raccourcissement inéluctable des télomères à chaque division à une moyenne d'environ 50-100 paires de bases par doublement de population (Harley et al., 1990). Le raccourcissement télomérique constituerait donc une horloge mitotique.

Ce sont des expériences d'énucléation-fusion permettant l'échange de noyaux entre des cellules jeunes et sénescentes, qui ont permis à l'équipe de Hayflick de montrer que c'était au niveau du noyau que se jouait le contrôle du nombre de division maximal qu'une cellule peut effectuer (Muggleton-Harris & Hayflick, 1976; Wright & Hayflick, 1975). Des expériences de restauration de l'activité télomérase dans des fibroblastes diploïdes humains ont permis pour la première fois de mettre en évidence le rôle du raccourcissement des télomères dans la sénescence. En effet, l'introduction de hTERT dans ces cellules leur permet d'échapper à la sénescence. Cet échappement à la sénescence suite à la réactivation d'une activité télomérase a été décrit pour un certain nombre

de types cellulaires chez l'homme : les fibroblastes, les lymphocytes T, les cellules endothéliales, les ostéoblastes (Rufer et al., 2001; Yang et al., 1999; Yudoh et al., 2001). Dans les fibroblastes, les cellules échappant à la sénescence suite à la réintroduction de l'activité hTERT sont immortalisées et montrent un phénotype proche des cellules jeunes (Bodnar et al., 1998; Vaziri & Benchimol, 1998) ; cependant elles peuvent évoluer vers un phénotype pré-malin (Milyavsky et al., 2003).

2) Les télomères raccourcis ou déprotégés induisent une réponse de type dommage à l'ADN

En deçà d'une taille critique, l'ADN télomérique ne peut plus former de boucle T. L'extrémité télomérique, se retrouvant ainsi déprotégée, va être reconnue comme une cassure double brin et induire une réponse de type dommage à l'ADN. Ce mécanisme a été confirmé par l'observation d'un certain nombre de marqueurs liés à la réponse au dommage à l'ADN à l'extrémité télomérique de fibroblastes sénescents. En effet, dans les fibroblastes sénescents, connus pour avoir une sénescence induite par le raccourcissement de leurs télomères (Bodnar et al., 1998), on peut observer au niveau de l'extrémité des chromosomes déprotégées l'accumulation de facteurs impliqués dans la réponse au dommage à l'ADN tels 53BP1, H2AX phosphorylé (γ H2AX), le complexe NBS1/MRE11/RAD50, Rif1 et la forme phosphorylée d'ATM (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Takai et al., 2003). Comme pour l'induction de l'arrêt du cycle induit par des dommages à l'ADN, la sénescence induite par des télomères raccourcis est dépendante de la voie p53 (Gire & Wynford-Thomas, 1998).

La structure des télomères, bien plus que leur longueur, joue un rôle important dans l'induction d'une réponse de type dommage à l'ADN lors de la sénescence. Dans les cellules de mammifère, l'inhibition de TRF2, notamment par l'expression d'un dominant négatif, résulte en la déstabilisation et la dé-protection des extrémités télomériques. Dans les fibroblastes primaires humains, cette déstabilisation entraine une sénescence induite par les voies p53 et pRB (Smogorzewska et al., 2000; van Steensel et al., 1998), alors que dans d'autres types cellulaires ces voies mènent à une apoptose (Biroccio et al., 2006; Karlseder et al., 1999). On peut alors retrouver localisés au niveau des télomères déprotégés des facteurs impliqués dans la réponse au dommage à l'ADN et dans la réparation (ex : 53BP1, ATM activé, MRE11/NBS1/RAD50) (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Takai et al., 2003). Une déstabilisation des télomères peut être également mimée par l'exposition des cellules à des oligonucléotides homologues de la séquence TTAGGG du brin protubérant 3' des télomères (T-oligos). Ces T-oligos s'accumulent dans le noyau et miment une déprotection des télomères, ce qui induit une phosphorylation massive de H2AX, conduisant à une réponse au dommage à l'ADN et à une sénescence prématurée (Li et al., 2003; Li et al., 2004; von Zglinicki et al., 2005).

3) Certains types cellulaires présentent une sénescence indépendante des télomères

Alors que la seule surexpression de la télomérase suffit à éviter la survenue de la sénescence et à immortaliser certains types de cellules humaines comme les fibroblastes, cette surexpression ne permet pas l'immortalisation d'autres types cellulaires, en particulier les cellules épithéliales dont les kératinocytes (Dickson et al., 2000; Kiyono et al., 1998), les cellules épithéliales des voies respiratoires (Lundberg et al., 2002), les cellules épithéliales mammaires (Dimri et al., 2005) et les cellules épithéliales prostatiques (Berger et al., 2004). Il a été montré dans ces cellules que la sénescence était associée à l'expression et l'accumulation à des niveaux élevés de p16^{INK4A}. Ainsi, dans ces cellules, le potentiel réplicatif ne serait pas conditionné par le raccourcissement des télomères, mais plutôt par des mécanismes autres dépendant de la voie p16^{INK4A}. Chez la souris, malgré une activité télomérase et des télomères beaucoup plus longs que chez l'homme, les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) en culture entrent en sénescence après seulement quelques doublements (Todaro & Green, 1963). Comme pour les cellules épithéliales humaines, la sénescence de ces cellules s'accompagne d'une forte augmentation d'expression de p16^{INK4A} (Kim et al., 2002).

1.3. Rôle du stress oxydant dans la sénescence

a) Qu'est-ce que le stress oxydant ?

Le métabolisme de l'oxygène dans la cellule entraine la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS = Reactive Oxygen Species) incluant l'anion superoxide (O_2° -), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyl (°OH) pour les principales. Principalement consommé par le métabolisme respiratoire de la mitochondrie, la majorité de l'oxygène moléculaire (O_2) est réduit en eau (H_2O), mais 1-5% est converti en ROS (Klaunig & Kamendulis, 2004). Ces ROS participent à la signalisation intracellulaire, notamment en régulant l'activité de facteurs de transcription (Nordberg & Arner, 2001). Mais lorsqu'elles se retrouvent en forte concentration, ces ROS deviennent toxiques pour la cellule; elles peuvent engendrer l'oxydation de diverses molécules pouvant entraver le fonctionnement cellulaire (Djordjevic, 2004). La cellule possède un certain nombre de systèmes de défense contre ces ROS qui vont les dégrader, ainsi qu'un certain nombre de systèmes de réparation des dommages induits par ces ROS. Mais ces systèmes ne sont pas parfaits et lors de certaines situations, par exemple lors d'une augmentation anormale de ROS, ces systèmes peuvent être dépassés. Ces situations d'agression chronique ou aigüe par les ROS constituent ce que l'on appelle le stress oxydant.

b) Les sources de ROS

1) Les sources mitochondriales

La mitochondrie est considérée comme la source majeure de ROS. La majorité de l'oxygène utilisé par la cellule pour sa respiration subit une réduction tétravalente conduisant à la production d'eau (réaction 1).

$$O_2 + 4 e^- + 4 H^+ \rightarrow 2 H_2O$$
 (réaction 1)

Cette réaction utilise des électrons ayant transité par une chaine de transport d'électrons constituée par 4 complexes multiprotéiques localisés au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Il résulte de ce flux d'électrons la formation d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie, qui est utilisé par l'ATP-synthase pour la synthèse d'ATP (figure 6). La réduction de l'oxygène est catalysée par la cytochrome-c oxydase, au niveau du complexe IV de cette chaine de transport des électrons (Balaban et al., 2005).



Figure 5 : <u>Principaux sites de production d'anion superoxyde dans la chaine de transport des électrons</u> La chaine respiratoire des mitochondries est constituée de 4 complexes. Les principaux sites de production d'O₂°- sont les complexes I et III. Au niveau du complexe III, les anions superoxydes sont produits dans la matrice et l'espace intermembranaire mitochondrial. *Adaptée de (Balaban et al., 2005)*

Il est estimé que 1-5% de l'oxygène consommé par la mitochondrie n'est que partiellement réduit en O_2° -. Deux sites de la chaine respiratoire produisent l'essentiel du O_2° - : le complexe I et le complexe III (figure 5). Les mécanismes chimiques détaillés sont encore discutés mais impliquent probablement l'ubisemiquinone du complexe III et le composé flavine du complexe I. Au niveau du complexe I, le O_2° - est produit au niveau de la matrice mitochondriale, tandis qu'au niveau du complexe III O_2° - est relargué des deux cotés de la membrane interne mitochondriale (Jezek & Hlavata, 2005 ; Muller et al., 2004 ; Pervaiz & Clement, 2007). Plusieurs autres sources de ROS sont possibles dans la mitochondrie, par exemple au niveau du complexe II avec les déshydrogénases, de

la matrice avec les flavoprotéines, ou encore de la membrane externe avec la mono-amino-oxydase (Jezek & Hlavata, 2005).

2) Les sources extra-mitochondriales

Les ROS peuvent être engendrées dans différents sites cellulaires lors de réactions métaboliques, ou lors de différents stress comme la détoxification de xénobiotiques et drogues, l'inflammation, les U.V., les radiations ionisantes, etc... (Djordjevic, 2004). Les principales sources connues sont les peroxysomes qui sont le siège de nombreuses activités oxydases productrices de H_2O_2 , le réticulum endoplasmique lisse dont les enzymes associées au cytochrome p450 et celles de la famille b5 engendrent la production de O_2° -, la membrane nucléaire avec les cytochromes oxydases qui y sont associées, ou encore la membrane plasmique et les membranes intracellulaires avec leurs NADPH oxydases (pour revue voir Djordjevic, 2004; Thannickal & Fanburg, 2000).

c) Réactivité des ROS

Les anions superoxydes ne sont pas hautement réactifs et sont très instables. Leur charge ne leur permet pas de diffuser librement à travers les membranes, ils restent ainsi enfermés dans le compartiment où ils ont été produits. Deux molécules d' O_2° - se dismutent rapidement en H_2O_2 et en O_2 , cette réaction étant catalysée par les superoxyde dismutases (SOD). Le peroxyde d'hydrogène est plus stable qu' O_2° - mais sa réactivité est assez faible. Sa dangerosité repose sur deux de ses propriétés. D'une part, comme l'eau, il peut diffuser librement à travers les membranes grâce à son absence de charge, même si cette diffusion reste limitée (Bienert et al., 2006; Thannickal & Fanburg, 2000), ou emprunter des aquaporines spécifiques (Bienert et al., 2007; Bienert et al., 2006). Il peut ainsi réagir avec diverses molécules dans toute la cellule. D'autre part, il est à l'origine de la formation de radicaux hydroxyl (°OH) *via* la réaction avec des ions Fe²⁺ ou Cu²⁺ (réaction de Fenton). Les radicaux hydroxyl sont quant à eux hautement réactifs, et ainsi très dangereux (Valko et al., 2007). De plus, au contraire de O_2° - et H_2O_2 , aucune enzyme n'est connue pour dégrader ces radicaux hydroxyl.

d) Les dommages engendrés par les ROS à la cellule

Les ROS sont potentiellement toxiques pour la cellule ; elles peuvent altérer toutes les macromolécules dont les lipides, les protéines et l'ADN.

1) Dommages aux lipides

Les acides gras polyinsaturés localisés dans les membranes cellulaires et les organites intracellulaires sont, par leurs nombreuses doubles liaisons, des cibles préférentielles pour des attaques radicalaires. L'oxydation des acides gras insaturés par les radicaux libres est à différencier des oxydations enzymatiques qui génèrent des produits d'importance biologique comme les prostaglandines, les tromboxanes, les prostacyclines et les leucotriènes. La peroxydation des lipides génère une variété complexe de produits, dont la plupart sont des électrophiles réactifs comme les époxydes et les aldéhydes (Janero, 1990). Parmi les produits les plus connus, nous avons le malondialdehyde (MDA), et le 4-hydro-2(E)-nonenal (HNE). L'oxydation des lipides peut se propager entre molécules lipidiques *via* une réaction en chaine qui se déroule en 2 étapes : l'initiation et la propagation (figure 6). La peroxydation est initiée par la réaction d'un radical libre (O₂°- ou OH°) avec un lipide (LH) ; un atome d'hydrogène est alors transféré du lipide au radical pour donner un radical lipidique (L°). Lors de la phase de propagation, le radical lipidique réagit avec O₂ pour former un radical lipidique peroxyl (LOO°). Ce radical peroxyl peut extraire un atome hydrogène d'une autre molécule lipidique pour former un hydroperoxyde lipidique (LOOH) et un autre radical hydroxyl hautement réactif qui propage la réaction en chaine (Kelly et al., 1998).





La peroxydation des lipides, en induisant la présence d'hydroperoxydes lipidiques dans la membrane, modifie les caractéristiques physiques des membranes. En effet, il a été montré que l'incorporation d'hydroperoxydes lipidiques dans une membrane diminue sa fluidité et augmente sa perméabilité (Kelly et al., 1998).

Certains des produits issus de la peroxydation des lipides, dont MDA et HNE, peuvent modifier les protéines et l'ADN, résultant en des dommages toxiques et mutagènes. Le MDA est très réactif, il peut réagir avec l'ADN pour former des adduits aux désoxyguanosine, désoxycytosine et désoxyadénosine. L'un des principaux adduits à l'ADN engendré est une pyrimidopurine appelé M1G, connue pour être mutagène (Marnett, 1999). Il peut également réagir avec des résidus arginine, lysine, ou les terminaisons amines des protéines (Chio & Tappel, 1969; Requena et al., 1997; Slatter et al., 1998) et former des ponts entre les protéines, comme par exemple les ponts 1-amino-3-iminopropènes (ponts AIP) en réagissant avec deux résidus lysine (Sayre et al., 2001). De la même manière, HNE peut réagir avec les cystéines, histidines et lysines (Siems et al., 1992; Zarkovic, 2003). Ces réactions avec des produits de la peroxidation lipidique engendrent la formation d'agrégats désignés sous le terme de lipofuschine (Jolly et al., 2002). Ces agrégats sont résistants aux

dégradations protéolytiques (Voss & Siems, 2006), et s'accumulent dans le cytoplasme ou les lysosomes, entravant ainsi le fonctionnement de la cellule.

2) Dommages aux protéines

Tous les acides aminés sont sujets aux oxydations par les radicaux libres, mais la cystéine et la méthionine, de par la présence d'un atome de soufre, sont les plus sensibles (Schaur, 2003). L'oxydation du résidu cystéine engendre la formation de ponts disulfures, de disulfures mixtes, d'acides cystéine sulfénique, sulfinique ou encore sulfonique. La méthionine est oxydée en méthionine sulfoxyde, ce qui s'accompagne par des modifications de son hydrophobicité et de sa flexibilité. L'oxydation des autres acides aminés génère en grande partie des groupes hydroxyl et carbonyl. Généralement, les protéines oxydées sont fonctionnellement altérées et plus thermosensibles que leur forme native (Mary et al., 2004).

3) Dommages à l'ADN

Le stress oxydant peut engendrer différents dommages à l'ADN au niveau des bases ou du squelette sucre-phosphate (Slupphaug et al., 2003). Des cassures simple-brin peuvent résulter d'une attaque directe du squelette sucre-phosphate par les ROS ou être créées indirectement via la formation d'un site abasique, suite à certains dommages aux bases (Imlay & Linn, 1988). Une cassure simple-brin, si elle n'est pas réparée, peut entrainer la formation d'une cassure double-brin lors de la réplication (Slupphaug et al., 2003). Les cassures double-brin peuvent être aussi directement induites par les ROS, mais à une fréquence moins élevée que les cassures simple brin (Prise et al., 1989). Les cassures double-brin sont létales si elles ne sont pas réparées (Pfeiffer et al., 2000), alors que des dommages aux bases peuvent être mutagènes, cytotoxiques ou les deux. Les bases constituent une cible importante des attaques radicalaires. Il a été estimé qu'environ 20 000 bases sont endommagées dans l'ADN par jour par les ROS dans chaque cellule humaine (Beckman & Ames, 1997). Plusieurs formes radicalaires sont capables d'oxyder les bases, et plus particulièrement le radical hydroxyl (Marnett, 2000). Plus de 20 types différents de dommages oxydants aux bases puriques et pyrimidiques ont été identifiés (Gajewski et al., 1990), mais il est fort probable que l'éventail des lésions oxydatives de l'ADN chez les mammifères dépasse 100 types différents. La lésion la plus abondante est une modification des résidus guanine : la 8-hydroxy-deoxyguanosine (8oxo-dG). La 8-oxo-dG joue probablement un rôle critique dans la mutagenèse et la carcinogenèse. En effet, cette modification ne bloque pas la réplication de l'ADN et peut induire des mutations ponctuelles en se mésappariant avec un résidu adénine (Cheng et al., 1992; Sekiguchi & Tsuzuki, 2002). Les nucléotides libres sont aussi sujets à ces oxydations. La forme oxydée des dGTP du pool de nucléotides libres, le 8-oxo-dGTP, peut s'incorporer lors de la synthèse de l'ADN en s'appariant avec une cytosine ou une adénine. L'oxydation des guanines libres ou dans l'ADN peut donc entrainer des transversions A : T en C : G et G : C en T : A. (Chen et al., 1995; Sekiguchi & Tsuzuki, 2002).

e) Les défenses contre le stress oxydant

Pour se protéger contre les effets délétères des ROS, la cellule eucaryote dispose d'une batterie de systèmes de défenses anti-oxydantes. En première ligne, nous avons les enzymes anti-oxydantes dont le rôle est de dégrader ces ROS. Les principales enzymes anti-oxydantes, leur substrat et leur localisation intracellulaire sont récapitulés dans la figure 7.



Figure 7 : Principaux sites de production et de dégradation des ROS

1) Dégradation des anions superoxydes par les superoxyde dismutases (SOD)

La dégradation des anions superoxydes est assurée en grande partie par une classe d'oxydoréductases appelées superoxyde dismutases (SOD) qui catalysent la dismutation des anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène. Dans la réaction catalysée par ces SODs, deux molécules d'anions superoxydes vont former une molécule de peroxyde d'hydrogène et une molécule d'oxygène moléculaire (réaction 2).

$$2 O_2^{\bullet} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2 \text{ (réaction 2)}$$

Les superoxyde dismutases sont des métalloenzymes, c'est-à-dire qu'elles comprennent un ion métal. On dénombre 3 types de dismutases. La première, la SOD1 (ou CuZnSOD) est composée de deux sous-unités identiques comportant chacune un ion Cu²⁺ et un ion Zn²⁺. L'ion Cu²⁺ participe à l'activité catalytique, tandis que le Zn²⁺ stabilise la conformation de l'enzyme (Rotilio et al., 1972). La CuZnSOD est localisée essentiellement dans le cytosol et dans les peroxysomes (Crapo et al., 1992). La SOD2 (MnSOD) est un homotétramère chez les eucaryotes, chaque sous-unité comportant un ion Manganèse Mn³⁺. Elle est retrouvée uniquement dans la mitochondrie au niveau de la matrice (Weisiger & Fridovich, 1973). Enfin, la SOD3 (ou extracellular SOD, EC-SOD) est quant à elle sécrétée dans l'espace intercellulaire (Marklund, 1980). Chez les mammifères, cette EC-SOD correspond à une CuZnSOD homotetramérique glycosylée.

La MnSOD étant la seule de ces enzymes anti-oxydantes localisée au niveau des mitochondries, source principale d'anions superoxydes, elle joue un rôle majeur dans la défense contre les ROS. Alors que des souris knock-out pour la CuZnSOD apparaissent normales (Ohlemiller et al., 1999; Reaume et al., 1996), les souris knock-out pour la MnSOD meurent peu de temps après la naissance ou présentent une sévère neurodégénération (Li et al., 1995). Alors que la CuZnSOD est exprimée constitutivement, la MnSOD peut être induite par un certain nombre de cytokines (ex : IL-1, TNF) (Djordjevic, 2004), les facteurs de transcription Rel/NF-κB (Bernard et al., 2002), et par les ROS (Yoshioka et al., 1994).

2) Dégradation du peroxyde d'hydrogène

Bien que ce ne soit pas un radical, le peroxyde d'hydrogène est loin d'être inoffensif. En effet, il a la capacité de diffuser à travers toutes les membranes et surtout de jouer un rôle d'intermédiaire dans la formation de radicaux hydroxyl. Plusieurs enzymes antioxydantes contribuent à sa dégradation.

La catalase

Chez les eucaryotes, la catalase consiste en un homo-tétramère, chaque monomère contenant un hème. La catalase est l'un des catalyseurs naturels les plus actifs, il décompose H_2O_2 à une vitesse extrêmement rapide (Scandalios, 2005). Cette enzyme est tellement efficace qu'elle ne peut être saturée par aucune concentration de H_2O_2 . La catalase possède une double fonction, dépendante de la concentration en H_2O_2 (Nordberg & Arner, 2001). A faible concentration, elle permet la détoxification de différents substrats donneurs d'hydrogène (phénols et alcools) en couplant la réaction avec la réduction de H_2O_2 (réaction 3).

$$RH_2 + H_2O_2 \rightarrow R + 2H_2O$$
 (réaction 3)

Pour des fortes concentrations en H_2O_2 , la catalase va dismuter ce dernier en utilisant une réaction catalytique dans laquelle deux molécules de H_2O_2 vont jouer le rôle d'accepteur et de donneur d'hydrogène (réaction 4).

$$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2 H_2O$$
 (réaction 4)

La catalase est essentiellement localisée au niveau des peroxysomes, où résident de nombreuses oxydases dont l'activité engendre la production de H₂O₂, mais aussi au niveau de la mitochondrie, sous forme soluble ou ancrée à la membrane (Djordjevic, 2004).

Les peroxyrédoxines (Prx)

Les peroxyrédoxines, ou thiorédoxine peroxydases, découvertes récemment (Chae et al., 1994a; Chae et al., 1994b), sont des enzymes capables de réduire directement les peroxydes (H₂O₂, et différents alkyl hydroperoxydes). Elles sont divisées en 3 sous-classes majeures : les Prxs 2-Cys typiques (Prx I-IV), les 2-Cys atypiques (Prx V), et les 1-Cys (PrxVI). Ce sont des protéines très abondantes : dans les érythrocytes par exemple, ce sont les 2^{ème} ou 3^{ème} protéines les plus abondantes (Moore et al., 1991), et elles composent 0,1 à 0,8% des protéines solubles dans les autres cellules des mammifères (Chae et al., 1999b). Bien que localisées principalement dans le cytosol, les Prxs sont présentes dans tous les compartiments cellulaires, mais les différentes sous-classes ont des localisations cellulaires particulières. Les Prxs I et II sont localisées dans le cytosol. La Prx III, qui contient une séquence signal de localisation mitochondriale, est exclusivement mitochondriale. La Prx IV contient une séquence signal en N-terminal permettant sa sécrétion ; elle est aussi retrouvée dans le réticulum endoplasmique. La Prx V est exprimée sous une forme longue et une forme courte retrouvées respectivement dans la mitochondrie et les peroxysomes. La Prx VI est retrouvée dans le cytosol. Enfin, seules les Prxs I et V peuvent se localiser au niveau nucléaire (pour revue voir Wood et al., 2003).

Les glutathion peroxydases (GPx)

Chez l'homme, sept glutathion peroxydases (GPx) sont connues, dont cinq sont des sélénoenzymes (elles contiennent une séléno-cystéine à la place d'une cystéine dans leur site actif). Les membres de cette famille d'enzyme comprennent : la GPx1 ubiquitaire, localisée dans le cytosol (Flohe et al., 1973) et la mitochondrie (Esworthy et al., 1997; Utsunomiya et al., 1991), la GPx2 gastro-intestinale (Wingler & Brigelius-Flohe, 1999), la GPx3 qui est sécrétée dans le plasma (Takahashi et al., 1990), la PHGPx (phospholipid hydroperoxide GPx ou GPx4) qui réduit les lipides oxydés en alcool (Thomas & Girotti, 1988) et enfin dernièrement découverte, la GPx6, localisée dans les tissus embryonnaires et l'épithélium olfactif (Kryukov et al., 2003). Les formes sans sélénocystéine incluent la GPx5 dont l'expression est réduite à l'épididyme (Vernet et al., 1996), et la GPx7, une PHGPx ubiquitaire (Utomo et al., 2004). Toutes ces enzymes utilisent le glutathion (GSH) comme co-facteur pour réduire une variété d'hydroperoxydes (ROOH et H₂O₂) (réaction 5). La PHGPx peut réduire en alcool d'autres peroxydes comme les lipides peroxydés dans les membranes cellulaires.

$$2 \text{ GSH} + \text{ROOH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O} + \text{ROH}$$
 (réaction 5)

Le mécanisme catalytique des GPx implique une oxydation du site sélénolate (Se-) actif en acide sélénénique (SeOH). Après l'ajout d'une molécule de GSH, l'acide sélénénique est transformé en sélénosulfide avec le glutathion en adduit (Se-SG), qui peut être régénéré en sélénolate actif et GSH par l'addition d'une seconde molécule de GSH (figure 8). La réaction entraine ainsi l'oxydation de deux molécules de GSH en GSSG qui peut être réduit ensuite par la glutathion réductase utilisant le NADPH comme donneur d'électron (Papp et al., 2007).





3) Autres systèmes anti-oxydants

La thiorédoxine (Trx)

La thiorédoxine est une protéine ubiquitaire, conservée depuis les procaryotes jusqu'aux mammifères; elle possède une activité oxydoréductase. Chez les mammifères, deux thiorédoxines ont été identifiées : la thioredoxine-1 cytosolique (Trx1) (Taniguchi et al., 1996) et la thiorédoxine-2 mitochondriale (Trx2) (Spyrou et al., 1997). Ces enzymes contiennent un site actif conservé –Gly-Cys-SeCys-Gly, nécessaire pour l'oxydoréduction des protéines disulfides (Holmgren, 1989). Les cibles spécifiques de ces thiorédoxines sont la ribonucléotide réductase, la protéine disulfide isomérase, et différents facteurs de transcription dont AP-1 et Rel/NF-κB (Nordberg & Arner, 2001). Elles jouent également un rôle de donneur d'électron pour la régénération de plusieurs peroxyrédoxines (Chae et al., 1999a; Chae et al., 1999b). La thioredoxine oxydée est réduite par des thioredoxines réductases (TrxR) au nombre de trois chez les mammifères : la TrxR1 cytosolique, la TrxR2 mitochondriale et la thioredoxine/glutathion réductase (TGR) exprimée dans les testicules. Les TrxR réduisent également

d'autres protéines oxydées et différents peroxydes dont les lipides hydroperoxydes et H_2O_2 (figure 9) (Nordberg & Arner, 2001). L'expression des thiorédoxines est induite par le stress oxydant (Nakamura et al., 1994; Taniguchi et al., 1996), cette induction impliquant fort probablement l'élément de réponse antioxydante situé dans le promoteur de la thioredoxine (Kim et al., 2001).



Figure 9 : Réactions enzymatiques du système thiorédoxine

TrxR = Thiorédoxine Réductase ; $Trx-(SH_2)$ = Thiorédoxine réduite ; $Trx-S_2$ = Thioredoxine oxydée ; Protéine- S_2 = Protéine oxydée ; Protéine- (SH_2) = Protéine réduite. *Adaptée de (Nordberg & Arner, 2001)*.

Le glutathion

Le glutathion (glutathion réduit ou GSH) est un tri-peptide linéaire de L-glutamine, L-Cystéine et glycine (γ-L-Glutamyl-L-cystéinylglycine), relativement ubiquitaire dans les cellules aérobies, contenant un groupe sulfhydryl. Le GSH est très abondant dans le cytosol (1-11mM), le noyau (3-15mM) et la mitochondrie (5-11mM), et il est le principal antioxydant soluble dans ces différents compartiments cellulaires (Valko et al., 2007). Le cycle du glutathion comprend une forme réduite GSH, et une forme oxydée GSSG dans laquelle deux tri-peptides sont liés par un pont disulfure. Le glutathion oxydé (GSSG) est réduit par une flavoenzyme NADPH dépendante : la glutathion réductase (GR) (Nordberg & Arner, 2001) (figure 10). La forme GSSG peut être également réduite par les thiorédoxines. Le glutathion joue un rôle prédominant dans la protection antioxydante de la cellule puisqu'il va remplir le rôle de tampon sulfhydryl empêchant la formation de ponts disulfures. Les glutathion peroxydases utilisent le GSH comme cofacteur pour réduire leur substrat. Le GSH peut aussi avoir une activité de détoxification de différents composés *via* des réactions de conjugaison catalysées par la glutathion S-transférase (Armstrong, 1997; van Bladeren, 2000).



Figure 10 : Système antioxydant associé au glutathion

GR = glutathion réductase ; GSH = glutathion réduit ; GSSH = glutathion oxydé ; GPx = Glutathion Peroxydase ; GST = Glutathion S-transférase. Adaptée de (Nordberg & Arner, 2001).

Molécules anti-oxydantes à faible poids moléculaire

De nombreux composants de faible poids moléculaire sont considérés comme des antioxydants d'importance biologique dont les vitamines C et E, le β-carotène, la mélatonine, l'acide lipoïque, et le Co-Enzyme Q10. Le pouvoir antioxydant de ces composés réside principalement en leur capacité à chélater les radicaux libres (Fischer et al., 2008; Holmquist et al., 2007; Sies & Stahl, 1995; Slominski et al., 2008; Traber & Atkinson, 2007). Le co-enzyme Q10 a cette particularité d'être le seul antioxydant liposoluble synthétisé par l'organisme (Appelkvist et al., 1994; Genova et al., 2003).

f) Réparation des dommages oxydants

Les systèmes de défense anti-oxydante n'étant pas infaillibles, la cellule est soumise en permanence à un stress oxydant chronique. De plus, de nombreuses situations physiologiques ou pathologiques peuvent résulter en une surproduction de ROS ou en une diminution des systèmes antioxydants, ce qui génère un état de stress oxydant aigu. Les ROS peuvent alors engendrer des dommages aux macromolécules qui vont être, pour certains, réparables.

1) Réparation des protéines oxydées

La plupart des dommages oxydants aux protéines sont irréversibles, et le seul moyen pour la cellule de réparer ses protéines oxydées est de les dégrader puis de les néosynthétiser. Cependant, les dommages à la cystéine et la méthionine sont réparables. La méthionine oxydée (méthionine sulfoxyde) est réparée par la méthionine sulfoxyde réductase (MSR) qui utilise la thiorédoxine comme co-facteur (Bokov et al., 2004; Nordberg & Arner, 2001). Les disulfides quant à eux sont convertis en résidu cystéine *via* des réactions d'échange thiol-disulfide. Ces réactions sont le fait des glutathion transférases qui catalysent la réaction entre le glutathion et la thiorédoxine afin de régénérer les groupes sulfhydryl de la protéine. Le pont disulfide qui se forme entre la protéine et le glutathion est alors réduit par la glutaredoxine en groupe sulfhydryl (Mary et al., 2004).

2) Réparation des lipides oxydés

Les lipides peroxydés sont éliminés de la membrane *via* deux systèmes distincts : l'action combinée de la phospholipase A2 avec la GPx (Maiorino et al., 1991), et la phospholipide hydroperoxyde GPx (PHGPx) (Ursini et al., 1985). La phospholipase A2 est activée par la peroxidation des lipides ; elle a une spécificité pour les phospholipides peroxydés des membranes et catalyse l'hydrolyse des lipides peroxydés en acides gras hydroperoxydes. Ces hydroperoxydes sont ensuite pris en charge par la GPx pour former des produits hydroxy réduits. La PHGPX, quant à elle, agit directement sur le lipide peroxydé pour le réduire en phospholipide hydroxyde. Ces deux systèmes

permettent d'arrêter la propagation de la peroxydation lipidique (Kelly et al., 1998). Cette propagation de la peroxydation lipidique peut également être empêchée par la vitamine E (ou α -tocophérol), qui séquestre les radicaux peroxyl lipidiques, un des éléments de propagation de la peroxydation lipidique (Niki et al., 2005).

3) Réparation de l'ADN et des nucléotides libres oxydés

Quelques 130 gènes de réparation de l'ADN chez l'homme ont été identifiés et leur nombre réel est probablement bien supérieur (Wood et al., 2001). Chaque type de dommage est réparé par un mécanisme particulier.

Réparation des cassures simple-brin (SSB)

La réparation des cassures simple-brin (SSB = single-strand break) se fait en plusieurs étapes. Elle commence par la reconnaissance de la cassure par la poly-(ADP-ribose)-polymérase 1 (PARP1) (D'Amours et al., 1999). L'une des nombreuses fonctions de cette PARP est de recruter la protéine XRCC1 qui elle-même accumule, recrute et/ou stabilise diverses enzymes impliquées dans le processus de réparation des cassures simple-brin. La plupart des extrémités au niveau des cassures induites par les ROS sont des 3'-phosphate, des 3'-phosphoglycolate et des 5'-désoxyribose phosphate (dRP) ; les dRP peuvent en plus être oxydés. Le processus de réparation commence donc par la restauration de ces extrémités anormales en 3'-hydroxyl et 5'-phosphate. Cette étape implique une grande diversité d'enzymes, dont la polynucléotide kinase 3'-phosphatase (PNKP) qui a pour substrat les 3'-phosphate, l'apurique/apyrimidique endonucléase 1 (APE1) qui a pour substrat les 3'phosphoglycolate, et la polymérase beta (pol β) qui utilise son activité lyase pour restaurer les 5'-dRP. Une fois la restauration des extrémités réalisée, l'espace peut-être comblé. Deux situations sont possibles. Dans la plupart des cas, un seul nucléotide doit être repositionné ; ce processus met en jeu l'activité polymérase des ADN polymérases pol λ et pol τ . Quand les extrémités 5'-dRP sont oxydées, la polβ ne peut les restaurer. Dans ce cas, la flap endonucléase 1 (FEN1) déplace et clive un fragment simple brin, puis les pol β , pol ϵ et pol δ assurent l'incorporation des nucléotides manquant en collaboration avec le facteur de réplication C (RFC). L'étape finale consiste en la ligation par les ligases LIG1 ou LIG3 α (pour revue des mécanismes détaillés voir Caldecott, 2008; Fortini & Dogliotti, 2007; Wilson & Bohr, 2007) (figure11).



Figure 11 : <u>Réparation des cassures</u> simple brin induites par les ROS

La réparation des cassures simple-brin se déroule en différentes étapes que sont la détection du dommage, la restauration des extrémités des brins au niveau de la cassure, la synthèse des nucléotides et enfin la ligation.

Adaptée de (Caldecott, 2008).

Réparation des cassures double-brin (DSB)

La cellule possède une série de voies de signalisation pour la reconnaissance et la réparation des cassures double-brin (DSB = double-strand break). Comme pour les cassures simple-brin, il y a reconnaissance du dommage par différents senseurs, dont γ -H2AX et 53BP1. Ces protéines permettent le recrutement de la protéine kinase ATM. Cette kinase est un composant essentiel de la cascade de signalisation des DSB chez les mammifères : elle assure l'activation *via* leur phosphorylation de diverses protéines impliquées dans la réparation ou la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose dont p53, CHK2, BRCA1, et NBS1 (Jackson, 2002). Les cassures double-brin sont réparées par deux mécanismes (Lieber et al., 2003) : la recombinaison homologue (HR = Homologous Recombination) et la jonction non homologue des extrémités (NHEJ = Non Homologous End Joining).

La réparation par HR repose sur le fait que chaque segment d'ADN est présent sur deux chromosomes. La réparation se déroule en 3 étapes : invasion d'un brin cassé dans la double hélice d'ADN homologue intact, néosynthèse d'ADN en utilisant l'ADN homologue comme matrice, puis

ligations et formation de jonction « Holliday » générant au final des molécules d'ADN recombinées. Différentes protéines interviennent dans ces étapes : les protéines du groupe RAD50 (Wood et al., 2001), BRCA1 et BRCA2. L'invasion du brin et la synthèse de l'ADN sont initiés par RAD51 chez les eucaryotes (Sung, 1994). Le complexe NBS1/MRE11/RAD50 permet le découpage des extrémités avant l'initiation par RAD51 (Sancar et al., 2004).

Contrairement à la recombinaison homologue, la NHEJ ne repose pas sur l'utilisation d'homologie de séquences entre chromosomes homologues, mais sur l'existence aléatoire de petites séquences homologues sur 1à 10 nucléotides aux deux extrémités cassées. La cassure double brin est reconnue par des protéines de la famille Ku qui recrutent une DNA-PKcs. L'ensemble permet le déroulement de la double hélice et l'appariement des microséquences d'homologie (Gottlieb & Jackson, 1993). Les fragments d'ADN non appariés sont délétés puis l'héterodimère ligase-XRCC4 assure la ligation finale (Nick McElhinny et al., 2000; Ramsden & Gellert, 1998). Le complexe NBS1/MRE11/RAD50 participe également à NHEJ (Maser et al., 1997). Ce mécanisme est donc générateur de microdélétions. La recombinaison homologue au contraire limite les erreurs en utilisant de longues séquences d'homologie d'ADN non endommagé. Cependant chez les mammifères la réparation des cassures double brin est préférentiellement réalisée par NHEJ (Chu, 1997) (figure 12).



Figure 12 <u>: Réparation des cassures double brin (DSB) par HR et NHEJ</u> Adaptée de (Sancar et al., 2004).

Réparation des bases oxydées

Chez les mammifères, la réparation des dommages oxydants aux bases se fait par deux mécanismes : l'excision de la base (BER : Base Excision Repair) ou l'excision du nucléotide (NER : Nucleotide Excision Repair) (Lindahl, 1993; Satoh et al., 1993).

La réparation par excision des bases (BER) est probablement responsable de la réparation de la majorité des dommages à l'ADN. Cette réparation est initiée par une perte non-enzymatique de base ou par une ADN glycosylase. Les ADN glycosylases appartiennent à une classe d'enzyme qui reconnait un certain nombre de bases modifiées comme la 8-oxo-dG ou la thymineglycol (TG). Chaque glycosylase est spécifique d'un nombre limité de bases modifiées (Krokan et al., 2000; Krokan et al., 1997; Lindahl & Wood, 1999). Chez l'homme, la 8-oxo-dG est prise en charge par la glycosylase hOgg1 et les pyrimidines oxydées comme TG par la hNTH1. Ces glycosylases coupent la liaison N-glycosidique entre le sucre et la base modifiée. Pas moins de 12 ADN glycosylases différentes ont été identifiées chez l'homme ; elles sont classées en deux catégories : les glycosylases simples qui catalysent l'excision de la base pour former un site apurinique ou apyrimidique (site AP) et les enzymes glycosylase/AP lyases (ou glycosylases bi-fonctionnelles) qui possèdent une activité lyase et qui clivent ainsi la liaison N-glycosidique et le squelette phosphate de l'ADN. Après la réaction lyase, le résidu sucre en 3' est généralement enlevé par une endonucléase incisant le coté 5' du sucre abasique pour former un espace qui va être comblé par l'ADN polymérase puisligaturé. Dans le cas où la glycosylase ne possède pas d'activité lyase, cette activité est accomplie par APE-1 ; le sucre abasique est quant à lui enlevé par l'activité déxoxyribose phosphate lyase (dRP lyase) de la polβ. La libération du site abasique laisse une cassure simple-brin, qui va être réparée comme exposé précédemment (pour voir Fortini & Dogliotti, 2007; Ide & Kotera, 2004; Sancar et al., 2004; Wilson & Bohr, 2007) (figure 13).

Bien que le rôle premier du système NER ne soit pas la réparation des dommages oxydants à l'ADN, il contribue néanmoins à ce processus. Ce système implique un ensemble complexe de protéines dont les activités hélicases et nucléases vont permettre une excision de part et d'autre du nucléotide endommagé, sur une large zone (24-32nt chez les eucaryotes). Chez l'homme, la réparation par excision de nucléotide est prise en charge par 6 facteurs (RPA, XPA, XPC, TFIIH, XPG, et XPF-ERCC1) (Mu et al., 1996) dont le défaut entraine des syndromes rares : xeroderma pigmentosum (XP), le syndrome de Cockayne (CS) et la trichothiodystrophie (TTD) (de Boer & Hoeijmakers, 2000). Les protéines de reconnaissance pour NER sont RPA, XPA et un complexe TFIIH-XPB-XPC-XPD (Mu et al., 1997). L'activité hélicase de ce complexe permet de dérouler l'ADN flanquant le nucléotide endommagé. Enfin, XPF-ERCC1 est recruté, ce qui permet d'exciser le brin endommagé. L'oligomère résultant est relargué et l'espace manquant comblé par les polymérases δ/ϵ avec l'aide des protéines PCNA et RFC (Sancar et al., 2004) (figure 14).


Figure 13 : <u>Réparation par Excision de Base (BER)</u> Adaptée de (Ide & Kotera, 2004).



Figure 14 : Réparation par Excision de nucléotides (NER) Adaptée de (Sancar et al., 2004).

Réparation des nucléotides libres oxydés

Les nucléotides libres peuvent également être la cible des dommages oxydants. Ils peuvent alors être intégrés à l'ADN par la polymérase lors de la réplication et devenir ainsi mutagènes. L'une des premières défenses consiste en l'élimination de ces nucléotides libres oxydés par une hydrolase, hMTH1, qui dégrade le 8-oxo-dGTP, le 8-oxo-dATP ainsi que le 2-hydroxy-dATP en leur équivalent monophosphatés (Fujikawa et al., 2001; Sakai et al., 2002). Cette enzyme hMTH1 est localisée dans le noyau, le cytosol et la mitochondrie (Kang et al., 1995). Les nucléotides oxydés qui sont malgré tout intégrés par la polymérase pourront être éliminés par les systèmes BER ou NER exposés précédemment.

g) Stress oxydant et sénescence

1) La sénescence s'accompagne d'une accumulation de dommages oxydants

Tout au long de sa vie aérobie, la cellule eucaryote génère inévitablement des ROS via le processus de respiration, ce qui génère une attaque oxydante régulière aux macromolécules. Comme développé précédemment, la cellule possède un panel de défenses anti-oxydantes et de systèmes de réparation permettant de contrecarrer les effets délétères de ces ROS. Cependant, lors d'un surplus de production de ROS ou d'une diminution des mécanismes de résistance, l'équilibre peut être rompu, et les ROS peuvent s'accumuler et engendrer des dommages oxydants. La sénescence est l'une des situations physiologiques caractérisée par une augmentation du stress oxydant. Il a été montré que les cellules sénescentes ont un niveau intracellulaire de ROS plus important que les cellules jeunes (Kang et al., 2005a; Lee et al., 2002). La sénescence s'accompagne d'une accumulation de protéines oxydées, qui résulte en partie d'un défaut de maintenance des protéines (Friguet, 2006; Friguet et al., 2000), et d'une accumulation de dommages aux lipides qui perturbent la biologie des membranes (Kelly et al., 1998). En réagissant avec les protéines oxydées, les dérivés de lipides peroxydés contribuent à la formation de lipofuschine dans les cellules sénescentes et entravent leur fonctionnement (Brunk & Terman, 2002). La sénescence se caractérise également par une augmentation des dommages oxydants à l'ADN, dont la 8-oxo-dG (Chen et al., 1995; Kaneko et al., 2001; Wolf et al., 2002). Une diminution de l'activité de réparation des 8-oxo-dG est décrite dans les fibroblastes de peau et les kératinocytes oraux humains (Kang et al., 2005a). Certaines études rapportent également une diminution de l'efficacité des systèmes de réparation NHEJ et l'augmentation des erreurs de réparation NHEJ à la sénescence (Kang et al., 2005b).

2) Le stress oxydant contribue à la sénescence cellulaire

Ces dommages oxydants qui s'accumulent au cours de la sénescence participent, au moins en partie, à l'établissement de cette dernière. Les fibroblastes de souris constituent l'un des meilleurs exemples pour illustrer le rôle du stress oxydant dans la sénescence. Les souris ont cette particularité par rapport à l'homme de maintenir une activité télomérase dans la plupart de leurs tissus à l'âge adulte (Prowse & Greider, 1995). De plus, ces animaux possèdent des télomères beaucoup plus longs que l'homme, de l'ordre de 40-60kb contre 5-15kb chez l'homme (Itahana et al., 2004). Les fibroblastes embryonnaires de souris, qui conservent une activité télomérase, ne sont donc pas soumis au raccourcissement des télomères. Cependant, dans des conditions standards de culture, ces cellules entrent rapidement en sénescence, puis s'immortalisent et s'établissent en lignée (Todaro & Green, 1963). Des études menées par l'équipe de J. Campisi ont montré que la réduction de la pression d'oxygène du milieu de culture, de 20% à 3%, empêche la survenue de la sénescence de ces cellules ; elles continuent alors de proliférer sans jamais entrer en sénescence (Parrinello et al., 2003). Il a été également montré que la fréquence de mutation observée dans les fibroblastes de souris était supérieure dans des conditions de pression en oxygène de 20% par rapport aux cellules cultivées avec 3% d'oxygène (Busuttil et al., 2003). Le même type d'expériences menées sur des fibroblastes humains ont montré que la réduction de la pression d'oxygène à 3% augmente de 50% le nombre maximum de doublements (Chen et al., 1995). A l'inverse, l'élévation du niveau de ROS, soit par l'augmentation de la pression partielle en oxygène (von Zglinicki et al., 1995), ou en traitant les cellules avec H_2O_2 (Chen & Ames, 1994), peut induire une sénescence prématurée des fibroblastes humains. L'induction d'un stress oxydant, notamment en traitant des cellules avec des concentrations sub-toxiques de H_2O_2 , entraine un arrêt du cycle, l'apparition de l'activité SA- β -galactosidase, et d'autres caractéristiques de cellules sénescentes (Chen et al., 1998; Chen et al., 2000). Ces traitements engendrent des dommages massifs à l'ADN, induisant les acteurs des voies d'arrêt du cycle p53 et p21 (Chen et al., 2005; Chen et al., 2004).

Il est possible de limiter le stress oxydant et ses dommages en cultivant les cellules en présence de molécules anti-oxydantes ou d'enzymes dégradant les ROS. Différentes études menées sur plusieurs types cellulaires ont montré que la culture en présence de molécules ou d'enzymes anti-oxydantes retarde la survenue de la sénescence (Atamna et al., 2000; Atamna et al., 2001; Bernard et al., 2004; Haendeler et al., 2004; McFarland & Holliday, 1994; Serra et al., 2003).

3) Le stress oxydant accélère le raccourcissement des télomères

Le stress oxydant peut jouer un rôle également dans le raccourcissement des télomères. En effet, il a été montré qu'un stress oxydant chronique sur des fibroblastes humains provoque une augmentation de la vitesse de raccourcissement des télomères et une sénescence prématurée (von Zglinicki et al., 1995). Cette augmentation de la vitesse de raccourcissement peut s'expliquer par les modifications engendrées par les dommages oxydants au niveau des télomères. Comme il a été décrit dans le paragraphe concernant le télosome, TRF1 et TRF2 ont une tolérance très faible pour des changements ponctuels de base dans leur séquence de fixation à l'ADN télomérique. On peut alors vite comprendre, et cela a été démontré par l'équipe de Bohr (Opresko et al., 2005), que des modifications de base causées par le stress oxydant peuvent engendrer des défauts de fixation de ces protéines sur les télomères, et perturber ainsi la maintenance télomérique, De plus, des études menées sur des fibroblastes humains ont montré qu'une exposition à un stress oxydant chronique induit une accumulation de cassures simple brin au niveau des télomères, provoquant un raccourcissement accéléré de ces derniers. A l'inverse, une réduction du stress oxydant ralentit le raccourcissement télomérique et prolonge la vie des cellules (von Zglinicki et al., 2000).

4) Les ROS participent à la sénescence induite par les oncogènes

La surexpression ou l'activation d'oncogènes, comme RAS par exemple, entraine une sénescence prématurée (Lin et al., 1998; Serrano et al., 1997; Zhu et al., 1998). Il s'avère que le stress oxydant joue un rôle important dans l'induction de la sénescence induite par l'activation d'un

oncogène. En effet, l'activation de RAS induit une élévation du niveau de ROS dans la cellule (Irani et al., 1997; Sundaresan et al., 1996), ce qui résulterait en l'accumulation de dommages oxydants à l'ADN. Ces dommages à l'ADN conduiraient ainsi à l'induction de p53 et p21 et à l'établissement de la sénescence. Au laboratoire, il a été montré que l'activation des facteurs Rel/NF- κ B induisaient l'expression de la MnSOD ce qui induit une surproduction de H₂O₂ et entraine la sénescence (Bernard et al., 2004; Bernard et al., 2001a).

2. LA SENESCENCE CELLULAIRE : UN MODELE IN VITRO D'ETUDE DU VIEILLISSEMENT

Le phénomène de sénescence *in vitro* a été proposé par Hayflick comme étant un modèle d'étude des mécanismes de vieillissement (Hayflick, 1965). Depuis, de nombreuses études ont tenté d'établir un lien entre la sénescence cellulaire et le vieillissement, et de déterminer si la sénescence cellulaire était la cause ou le résultat du vieillissement. Il est en fait difficile d'établir formellement un lien entre la sénescence cellulaire et le vieillissement, mais un certain nombre d'arguments semble montrer que ce phénomène de sénescence intervient bien *in vivo*, et contribuerait au vieillissement de l'organisme. L'une des caractéristiques de la sénescence cellulaire est la perte progressive de la capacité proliférative jusqu'à atteindre un arrêt du cycle. *In vivo*, dans certains tissus, le taux de prolifération diminue avec l'âge, suggérant un parallèle entre la régulation de la prolifération *in vivo* et *in vitro* (Cristofalo et al., 2004). De plus, il semblerait que les mécanismes moléculaires de la sénescence décrits *in vitro* soient retrouvés *in vivo*, et que les télomères et le stress oxydant jouent également un rôle dans le processus de vieillissement.

2.1. Les cellules sénescentes s'accumulent avec l'âge in vivo

Une des premières études qui montra la présence de cellules sénescentes *in vivo* fut menée par Dimri en 1995. Il démontra la présence du marqueur SA-β-gal dans des biopsies de peau humaine, mais également que cette activité était présente de manière plus importante dans les fibroblastes de derme issus de donneurs âgés de 70-90 ans que dans ceux issus de donneurs âgés de 20-39 ans (Dimri et al., 1995). Un certain nombre d'études ont par la suite mis en évidence la présence et l'accumulation avec l'âge de cellules sénescentes dans différents tissus et espèces, notamment dans la peau de primates et d'homme (Herbig et al., 2006; Jeyapalan et al., 2007; Ressler et al., 2006), dans le tissu vasculaire humain (Minamino et al., 2004), et dans les reins chez l'homme et les rongeurs (Krishnamurthy et al., 2004; Melk et al., 2003; Melk et al., 2004). Des cellules sénescentes sont également retrouvées au niveau d'organes atteints de pathologies liées à l'âge comme l'hyperplasie bénigne de prostate (Choi et al., 2000) ou les lésions d'athérosclérose (Vasile et

al., 2001). L'expression du gène suppresseur p16^{INK4}, l'un des marqueurs associés à la sénescence *in vitro*, augmente dans les tissus chez les rongeurs et l'homme lors du vieillissement (Krishnamurthy et al., 2004). Chez des babouins très âgés, plus de 15% des fibroblastes de derme présentent un phénotype sénescent, avec des télomères endommagés, une activation de la kinase ATM et l'augmentation d'expression de p16^{INK4} (Herbig et al., 2006; Jeyapalan et al., 2007).

2.2. La taille des télomères diminue avec l'âge

Comme nous l'avons vu en introduction, les télomères se raccourcissent au fur et à mesure des divisions et leur déprotection contribue à l'établissement de la sénescence. Plusieurs études mettent en évidence une diminution faible mais significative de la taille des télomères avec le vieillissement dans des tissus en prolifération ou non prolifératifs (Aikata et al., 2000; Guan et al., 2007; Kang et al., 2002; Kveiborg et al., 1999). Une étude menée sur une population japonaise indique que la proportion des télomères les plus longs diminue avec l'âge, alors que celle des télomères les plus petits augmente rapidement avec l'âge (Guan et al., 2007). Cette faible diminution de la taille des télomères avec l'âge explique probablement le fait qu'aucune étude n'ait permis d'établir clairement une corrélation inverse entre la capacité réplicative des cellules et l'âge du donneur dont elles sont issues. Les résultats des différentes études effectuées sur des individus sains sont très variables et aucune association statistiquement significative de l'âge avec la capacité proliférative de fibroblastes humains en culture ne ressort clairement (Cristofalo et al., 1998a; Cristofalo et al., 1998b).

2.3. Les dommages oxydants s'accumulent avec l'âge

La théorie des radicaux libres dans le processus du vieillissement a été proposée en 1956 par D. Harman (Harman, 1956). Cette théorie postule que le processus de vieillissement serait causé par les radicaux libres produits lors de réactions métaboliques aérobies, dont la grande réactivité pourrait entrainer la détérioration progressive des systèmes biologiques. Cette théorie fut complétée en 1972 : il fut suggéré que la plupart des radicaux libres sont produits dans la mitochondrie, et ce de manière croissante avec l'âge, et que l'espérance de vie est corrélée au taux de dommages oxydants à la mitochondrie (Harman, 1972). Depuis, de nombreuses données ont été accumulées qui appuient cette hypothèse. Plusieurs études ont montré une augmentation de la production de ROS par la mitochondrie au cours du vieillissement (Sohal et al., 1990; Sohal & Dubey, 1994; Sohal & Sohal, 1991). Source principale des ROS, la mitochondrie est donc aussi l'une des premières cibles de ces ROS. Son ADN, non protégé par les histones, et à proximité des chaines respiratoires, souffre plus des attaques radicalaires que l'ADN nucléaire (Mecocci et al., 1993). Au cours du vieillissement, les mitochondries accumulent des dommages à l'ADN, dont une délétion de 4977 paires de base (Wei & Lee, 2002). Ces dommages à l'ADN mitochondrial sont fort probablement responsables du déclin des fonctions mitochondriales observé lors du vieillissement et ne font qu'amplifier la surproduction de

ROS (Linnane et al., 1989; Sastre et al., 2003; Wei, 1992). Cette augmentation du niveau de stress oxydant lors du vieillissement s'accompagne de l'accumulation d'autres dommages oxydants aux lipides, aux protéines, et à l'ADN (Bokov et al., 2004). L'une des manifestations visibles est l'apparition des fameuses « tâches de vieillesse » au niveau de la peau qui résultent de l'accumulation de lipofuschine (Yin, 1996). Le niveau de 8-oxo-dG augmente également de manière significative dans les tissus âgés (Bokov et al., 2004; Hamilton et al., 2001; Sohal, 2002). D'autres études mettent en évidence une activation permanente des voies de réponse aux cassures double-brin dans des souris âgées, et ce, dans les cellules germinales et somatiques (Sedelnikova et al., 2004). Cette accumulation de dommages à l'ADN au cours du vieillissement est probablement liée en partie au déclin des systèmes de réparation BER, NER, ou NHEJ avec l'âge (Goukassian et al., 2000; Lombard et al., 2005; Moriwaki et al., 1996; Rao, 2007; Vyjayanti & Rao, 2006). Une étude menée sur *Caenorhabditis elegans* a ainsi mis en évidence une diminution de 30-50% des activités de réparation à l'ADN au cours du vieillissement (Meyer et al., 2007).

A l'appui de ces différentes données attribuant un rôle au stress oxydant dans le processus de vieillissement, il existe différents modèles de souris qui présentent une résistance au stress oxydant et une durée de vie allongée. C'est le cas des souris naines Ames qui présentent une augmentation des niveaux de catalase et superoxyde dismutases (Brown-Borg & Rakoczy, 2000; Hauck & Bartke, 2000; Romanick et al., 2004). C'est aussi le cas des souris invalidées pour p66shc-/- et lgf1r+/-. Ces dernières accumulent moins de dommages oxydants que leur congénères sauvages et les cellules dérivées de ces souris présentent une résistance accrue au stress oxydant entre autres, et une production de ROS diminuée (Holzenberger et al., 2003; Murakami et al., 2003; Trinei et al., 2002).

2.4. Apport des expériences de restriction calorique

La restriction calorique est, à l'échelle de l'organisme, l'intervention expérimentale la plus probante d'allongement de la durée de vie (Gredilla & Barja, 2005; Weindruch, 1989). Les mécanismes par lesquels procède la restriction calorique pour retarder le vieillissement ne sont pas encore complètement connus mais ils semblent impliquer les mitochondries et la production de ROS. En effet, il a été montré qu'à long terme la restriction calorique diminue la production de ROS au niveau des mitochondries, ainsi que l'accumulation d'un certain nombre de dommages oxydants aux lipides, aux protéines et à l'ADN (Gredilla et al., 2001; Hamilton et al., 2001; Kang et al., 1998; Lass et al., 1998; Melov et al., 1997; Youngman et al., 1992). La restriction calorique atténue l'augmentation d'expression de p16^{INK4} dans le rein, l'ovaire et le cœur chez la souris, et ceci est corrélé à la diminution de l'activité SA-β-gal (Krishnamurthy et al., 2004). Enfin, la restriction calorique empêche le déclin des systèmes de réparation BER observé lors du vieillissement (Cabelof et al., 2003; Stuart et al., 2004). Ces expériences de restriction calorique viennent ainsi appuyer le rôle du stress oxydant dans le vieillissement. Elles montrent également que le ralentissement du vieillissement est associé à une diminution de marqueurs de sénescence cellulaire, ce qui suggère que la sénescence contribuerait au vieillissement.

2.5. Apport des syndromes de vieillissement prématuré

L'une des façons d'étudier les mécanismes du vieillissement chez l'homme est tout simplement de s'intéresser directement aux maladies génétiques de vieillissement prématuré. Ces maladies sont regroupées sous le terme de syndromes progéroïdes, et se manifestent par l'apparition prématurée de certains signes ou pathologies associés au vieillissement. La majorité de ces maladies sont monogéniques et résultent d'un défaut de réparation de l'ADN dont Ataxia telangiectasia (AT), le syndrome de Nimègue (Nijmegen breakage syndrome = NBS), le syndrome de Cockayne (CS), Xeroderma pigmentosum (XP), l'anémie de Fanconi (FA), le syndrome de Bloom (BS), la trichotiodystrophie (TTD), la dyskératose congénitale (DC) et le syndrome de Werner. A ceux-ci vient s'ajouter un syndrome n'impliquant pas des gènes de réparation de l'ADN: Hutchinson-Gilford (HGP) (tableau 1). Ces maladies récessives sont toutes caractérisées par un vieillissement prématuré des patients, souvent associé avec une incidence accrue des cancers (Kyng & Bohr, 2005; Puzianowska-Kuznicka & Kuznicki, 2005). Les cellules dérivées de ces patients subissent un raccourcissement accéléré des télomères, une instabilité génétique, des défauts de progression dans le cycle avec notamment l'induction d'une sénescence prématurée (Callen & Surralles, 2004). La plupart de ces syndromes est également associée à des dysfonctions au niveau de la maintenance télomérique. Les gènes concernés par la mutation dans la plupart de ces syndromes codent pour des protéines de réparation de l'ADN qui peuvent s'associer au complexe TRF2 des télomères : DKC1 (dyskératose congénitale), WRN (syndrome de Werner), BLM (Syndrome de Bloom), ERCC1 (xeroderma pigmentosum), MRE11/NBS1/RAD50 (le syndrome de Nimègue et ataxia telangiectasia). Parmi ces syndromes, deux sont causés par la mutation d'un gène codant une hélicase de la famille RecQ : WRN (RECQL2) dans le syndrome de Werner, et BLM (RECQL3) dans celui de Bloom. Ce dysfonctionnement du maintien des télomères se retrouve également dans le syndrome de Hutchinson-Gilford. Ce syndrome est associé à un défaut de la lamine A, ce qui entraine, entre autres, une altération des interactions entre la matrice nucléaire et les télomères ce qui provoque une accélération du raccourcissement des télomères (Huang et al., 2008). Les télomères des fibroblastes issus de ces patients sont plus courts que ceux issus d'individus sains (Allsopp et al., 1992).

En marge de ces syndromes monogéniques, nous avons le syndrome de DOWN (ou trisomie 21). Les patients atteint de ce syndrome montrent de nombreuses anomalies dont un retard mental, des maladies cardiaques congénitales, des déficits immunitaires, un vieillissement prématuré (Alzheimer, cataracte, maladies auto-immunes) et un risque de cancer augmenté (Anisimov, 2001). La trisomie du chromosome 21 entraine, entre autres, la surexpression de la Cu/ZnSOD qui catalyse la dégradation d' O_2° - en H₂O₂. La surexpression de cette enzyme n'étant pas associée à une induction des systèmes de dégradation de H₂O₂, il en résulte une déstabilisation de l'équilibre redox de la cellule avec l'accumulation de H₂O₂. Ceci explique probablement le stress oxydant chronique et l'accumulation de dommages oxydants dans les tissus de ces patients, contribuant ainsi à leur vieillissement prématuré (Busciglio & Yankner, 1995; Pallardo et al., 2006; Pratico et al., 2000).

Ces maladies de vieillissement prématuré soulignent le rôle important des dommages à l'ADN, de la maintenance télomèrique et du stress oxydant dans le processus de vieillissement,

suggérant que les processus à l'origine de la sénescence cellulaire sont aussi à l'origine du vieillissement.

Syndrome	Protéine	Fonction	
Werner	WRN (ADN hélicase)	Réparation de l'ADN, recombinaison, réplication de l'ADN, régulation des télomères	
Bloom	BLM (ADN hélicase)	Réparation de l'ADN, recombinaison, réplication de l'ADN, régulation des télomères	
Rothmund-Thomson	RECQL4 (ADN hélicase)	Réparation de l'ADN, recombinaison, réplication de l'ADN	
Cockayne	CSA (protéine à répétition tryptophane-aspartate) CSB (ADN hélicase) XPB (ADN hélicase) XPD (ADN hélicase) XPG (exonucléase)	Réparation ADN couplée à la transcription, transcription	
Ataxia telangiectasia	ATM	Réponse au dommage à l'ADN, régulation des télomères	
Xeroderma pigmentosum	ERCC1/XPF	Réparation par excision de nucléotide (NER), régulation des télomères	
Anémie de Fanconi	Gènes FANC	Réparation de l'ADN, recombinaison	
Syndrome de Nimègue	MRE11/NBS1/RAD50	Maintenance des télomères, réparation de l'ADN	
Trichothiodystrophie	TTD groupe A	Réparation par excision de nucléotide (NER)	
Dyskératose congénitale	DKC1 TERC	Maintenance des télomères	
Hutchinson-Gilford	LMNA (Lamine A)	Structure du noyau	
Down	CuZnSOD (SOD1)	Dégradation des anions superoxydes	

Tableau 1 : Récapitulatif des principaux syndromes progéroïdes et les protéines impliquées dans ces syndromes.

2.6. Apport des modèles de souris manipulées génétiquement

Un certain nombre de manipulations génétiques ciblant pour la plupart des gènes de réparation de l'ADN ou de maintenance des télomères entrainent chez la souris l'apparition prématurée de signes de vieillissement (Lombard et al., 2005) (tableau 2), ce qui pointe une fois de plus l'importance de la maintenance du génome dans les processus de vieillissement. Dans la plupart des cas ou cela a été examiné, les fibroblastes issus de ces souris manipulées génétiquement entrent en sénescence prématurément in vitro (tableau 2), ce qui argue en faveur d'un rôle de la sénescence dans le processus de vieillissement.

Modèle de vieillissement prématuré chez la souris	Fonction modifiée	Sénescence accélérée des fibroblastes ?	Reférences
Mutant ATM	Réponse au dommage à l'ADN (DSB)	oui	(Ito et al., 2004)
Mutant BRCA ^{Δ11/Δ11} / p53 ^{+/-}	Réparation des DSB	oui	(Cao et al., 2003)
Mutant DNA-PKcs	Réparation NHEJ	non	(Espejel et al., 2004)
Mutant Ercc1, XPF	Réparation NER	oui (Ercc1)	(McWhir et al., 1993; Tian et al., 2004; Weeda et al., 1997)
Mutant Ku80 ^{-/-}	Réparation NHEJ	oui	(Vogel et al., 1999)
Mutant p53 dysfonctionnel (p53 ^{m/+})	Réponse au dommage à l'ADN	ND	(Tyner et al., 2002)
Mutant p53 dysfonctionnel (p44 Tg)	Réponse au dommage à l'ADN	oui	(Maier et al., 2004)
Mutant p63*/-	Morphogenèse épithéliale	oui	(Keyes & Mills, 2006; Keyes et al., 2005)
Mutant Rad50 ^{s/s}	Réparation des DSB	non	(Bender et al., 2002)
Mutant Terc	Maintenance des télomères	oui	(Espejel et al., 2004)
Mutant Terc/ATM	Maintenance des télomères / réponse au dommage à l'ADN (DSB)	oui	(Wong et al., 2003)
Mutant Terc/Wrn	Maintenance des télomères / réparation de l'ADN	oui	(Chang et al., 2004)
Mutant Terc/Wrn/Blm	Maintenance des télomères / réparation de l'ADN	oui	(Du et al., 2004)
Surexpression de TRF2	Maintenance des télomères	oui	(Munoz et al., 2005)
Mutant Wrn	Réparation de l'ADN	oui	(Lebel & Leder, 1998; Lombard et al., 2000)
Mutant XPA/CSB	Réparation NER, transcription	ND	(Murai et al., 2001)
Mutant Xpd ^{TTD}	Réparation NER, transcription	ND	(de Boer et al., 2002)
Mutant Xpd ^{TTD} /XPA	Réparation NER, transcription	ND	(de Boer et al., 2002)
Mutant Zmpste24 ^{-/-}	Maturation de la Lamine A	oui	(Varela et al., 2005)

Tableau 2 : Récapitulatif des modèles de vieillissement prématuré chez la souris.

Complété et adapté de (Lombard et al., 2005).

3. LIEN ENTRE SENESCENCE ET TUMORIGENESE

3.1. Rôle suppresseur de tumeur de la sénescence

La sénescence peut être induite par divers stimuli qui constituent autant d'événements contribuant à l'instabilité génétique de la cellule. Le raccourcissement des télomères mène à leur déprotection qui mime un dommage de type cassure double-brin entrainant un arrêt du cycle ; lors de défaut de point de contrôle, ces télomères raccourcis peuvent conduire à une instabilité génétique via l'enclenchement du cycle de fusion-cassure-fusion. Les espèces réactives de l'oxygène, produites tout au long de la vie de la cellule, engendrent des dommages aux macromolécules, notamment à l'ADN. Ces dommages oxydants à l'ADN contribuent, avec des télomères raccourcis à l'arrêt du cycle de la cellule et à l'instabilité génétique. Deux voies principales d'arrêt du cycle participent à l'induction de la sénescence, les voies p16^{ink4a} et p53. *In vitro*, l'inactivation de p16^{ink4a} et/ou p53 permet d'outrepasser la sénescence (figure 15). Les cellules continuent alors de proliférer et les télomères à s'éroder au fur et à mesure des divisions, jusqu'à ce qu'elles atteignent un état appelé de « crise » (ou stade M2) caractérisé par des dysfonctionnements télomériques, une grande instabilité chromosomique et une mort cellulaire (Wei & Sedivy, 1999). Des cellules peuvent échapper à cette crise si elles réacquièrent la capacité de maintenir une longueur stable de leurs télomères via la réactivation de l'activité télomérase, ou par le mécanisme de maintenance des télomères ALT. Ces cellules qui émergent de la crise sont alors immortalisées (Counter et al., 1992; Counter et al., 1994). L'instabilité génétique qui caractérise les cellules en crise est également retrouvée dans les cellules tumorales. L'activité télomérase est bien souvent réactivée dans les cancers: 80 à 90% des échantillons cancéreux montrent une telle activité (Harley et al., 1994). Les 10-20% restant sont complètement dépourvus d'activité télomérase, mais maintiennent cependant une longueur télomérique stable grâce au système ALT (Reddel et al., 1997; Tsutsui et al., 2003). Ce type de résultats pourrait suggérer que l'échappement à la sénescence via l'inactivation de p53 et/ou Rb, et le maintien des télomères, via l'expression de la télomérase ou le système ALT, constitueraient les étapes primaires de la tumorigenèse.



Figure 15 : Mécanisme hypothétique de tumorigenèse par échappement à la sénescence

Dans les cellules somatiques, au fur et à mesure des divisions, les télomères se raccourcissent jusqu'à atteindre une taille critique induisant un premier arrêt de prolifération : la sénescence (M1). L'évitement de la sénescence nécessite la perte des voies des suppresseurs de tumeur p53 et Rb. Après l'inactivation de ces voies, la cellule continue à proliférer et les télomères à se raccourcir jusqu'à un nouvel arrêt de prolifération : la crise (M2). Les rares cellules capables d'émerger à partir de la crise maintiennent leur longueur télomérique par l'activation de la télomérase ou par le système ALT. Les cellules germinales maintiennent leur longueur télomérique via l'activité télomérase. *Adaptée de (Nittis et al., 2008)*.

Chez la souris, l'invalidation du locus ARF codant pour p16^{ink4a} et p19ARF (souris INK4a-/-) augmente l'incidence des sarcomes et des lymphomes (Serrano et al., 1996). De même, des souris ayant subi un knock-out de p53 développent des cancers à un âge précoce. Les MEFs dérivées de ces souris et mis en culture n'entrent pas en sénescence (Ghebranious & Donehower, 1998). A l'inverse, des souris qui expriment un allèle constitutivement actif de p53 (par invalidation des 6 premiers exons d'un des allèles du gène p53) subissent un vieillissement prématuré et ne développent pas de tumeur (Tyner et al., 2002). L'invalidation de la télomérase chez la souris entraine un raccourcissement des télomères, l'accumulation d'aberrations chromosomiques au fur et à mesure des générations successives et l'apparition de signes de vieillissement (Blasco et al., 1997). De plus, ces souris sont fortement résistantes au développement tumoral : en effet le raccourcissement des télomères induit dans ces souris l'activation de p53 entrainant une sénescence cellulaire (Cosme-Blanco et al., 2007). Le croisement de ces souris knock-out pour la télomérase avec des souris invalidées pour p53 favorise la tumorigenèse (Chin et al., 1999).

Chez l'homme, les mutations qui mènent à une inhibition de la réponse aux stimuli induisant la sénescence mènent généralement à une incidence accrue des cancers. C'est le cas par exemple du syndrome de Li-Fraumeni, une maladie héréditaire caractérisée par une incidence des cancers élevée causée par la mutation de TP53 ; les fibroblastes issus de ces patients s'immortalisent à une fréquence bien plus élevée que des fibroblastes normaux dont la fréquence d'immortalisation est très basse (Tsutsui et al., 1997).

La sénescence peut être induite par des signaux mitogéniques intenses résultants de la surexpression du facteur de transcription E2F1 (Dimri et al., 2000), ou de l'activation d'oncogènes

comme Ras (Serrano et al., 1997), Raf (Zhu et al., 1998), BRAF (Michaloglou et al., 2005) ou MEK (Lin et al., 1998). Elle peut être également induite par l'altération de la structure de la chromatine qui induit une perte du silencing de certains gènes perturbant la différenciation normale, ce qui constitue une caractéristique des cellules tumorales (Campisi, 2000; Young & Smith, 2001). Ce phénomène d'induction de la sénescence suite à des signaux oncogéniques pourrait participer à l'inhibition de la tumorigenèse in vivo. Chez l'homme par exemple, il semblerait que la croissance des mélanomes soit inhibée par l'induction de la sénescence. Les naevi, des tumeurs bénignes des mélanocytes cutanés, présentent fréquemment des mutations activatrices de l'oncogène BRAF. On peut retrouver dans ces tumeurs bénignes la présence de cellules sénescentes. L'évolution maligne vers un mélanome est associée à la perte des marqueurs de sénescence comme la protéine p16^{ink4a} (Michaloglou et al., 2005). Il en est de même avec l'oncogène Ras. La surexpression de l'oncogène K-rasV12 dans les poumons ou le foie chez la souris induit l'apparition d'adénomes, des lésions bénignes, dans lesquels il peut être observé la présence de cellules sénescentes exprimant fortement p16 (Collado et al., 2005). L'évolution maligne vers un adénocarcinome s'accompagne comme pour les mélanomes d'une perte des marqueurs de sénescence. Enfin, dans des souris transgéniques sur-exprimant TGF- β 1, les cellules épithéliales mammaires souches entrent en sénescence prématurée, ce qui réprime le développement de cancer mammaire chez la jeune souris exposée au MMTV (virus de tumeur mammaire murin) (Boulanger & Smith, 2001).

Ce genre de données qui suggèrent que la sénescence pourrait être suppresseur de tumeur a trouvé ces dix dernières années un fort retentissement en cancérologie. Ce concept a été particulièrement mis en exergue par Judith Campisi. Elle postule que l'ensemble des dommages à l'ADN que subit une cellule au cours de sa vie étant mutagènes et générateurs d'instabilité chromosomique, la sénescence serait la réponse mise en place pour inhiber la prolifération de ces cellules devenues potentiellement tumorigènes (Campisi, 2001).

3.2. Rôle promoteur de tumeur de la sénescence

La sénescence est donc généralement considérée comme une barrière à la tumorigenèse, cependant un certain nombre de données épidémiologiques et expérimentales semble aller à l'encontre de cette hypothèse et établir un lien positif entre le vieillissement et la tumorigenèse. Tout d'abord, l'incidence des cancers est directement liée à l'âge : l'incidence des carcinomes est 2 à 3 fois plus élevée chez les hommes et les femmes dans la tranche d'âge 60-79ans que dans celle de 40-59 ans (Statistiques du National Cancer Institute pour l'année 2000 aux USA). Le cancer est la cause de mortalité la plus fréquente chez les patients souffrant de syndromes progéroïdes tels les syndromes de Werner, Bloom ou Rothmund-Thomson (Kyng & Bohr, 2005; Puzianowska-Kuznicka & Kuznicki, 2005). La restriction calorique, qui réduit la production de ROS et l'accumulation de dommages oxydants, allonge la durée de vie à l'échelle de l'organisme et réduit l'apparition des maladies liées au vieillissement, dont le cancer (Hart & Turturro, 1997). De même, les souris Ames, caractérisées par

une meilleure résistance au stress oxydant, présentent une durée de vie allongée et une apparition de tumeurs diminuée (Ikeno et al., 2003).

Chez la souris, l'invalidation de BRCA1 induit une sénescence prématurée dans des MEF en culture. Les souris mutantes BRCA^{11Δ/11Δ} p53^{+/-} subissent un vieillissement prématurée et ont une tumorigenèse augmentée (Cao et al., 2003). Il en est de même avec la protéine p63, une protéine homologue à p53. Son invalidation induit une sénescence prématurée dans les cellules *in vitro* et un vieillissement prématurée ainsi qu'une prédisposition aux tumeurs chez la souris adulte (Flores et al., 2005). Ce lien positif entre sénescence et tumorigenèse est également illustré par un certain nombre de modèles murins : les souris DNA-PKc ^{-/-} (Espejel et al., 2004), les souris ATM ^{-/-} (Ito et al., 2004) ou encore les souris de la souche SAMP (Takeda et al., 1997). Ces souris subissent un vieillissement prématuré qui s'accompagne d'une élévation de l'incidence des tumeurs.

Comme cité dans le paragraphe précédent, des télomères raccourcis peuvent inhiber la croissance des tumeurs en induisant une sénescence prématurée des cellules tumorales. Cependant, il semblerait que des télomères courts peuvent également promouvoir le vieillissement et la tumorigenèse. Des souris invalidées pour la télomérase montrent des signes de vieillissement prématuré et une augmentation des cancers spontanés (Rudolph et al., 1999). Cette incidence accrue des cancers est probablement lié à une augmentation du nombre de cellules présentant des fusions des extrémités chromosomiques. Dans des souris transgéniques sur-exprimant TRF2, les télomères se raccourcissent rapidement, et on observe un vieillissement prématuré ainsi qu'une augmentation des cancers (Munoz et al., 2006).

Les mécanismes moléculaires de la sénescence ont été principalement établis à partir d'expérimentations menées sur des cultures de fibroblastes humains. Ces cellules, après être entrées en sénescence, sont capables de rester dans cet état pendant de longues périodes allant jusque plusieurs années sans réellement se diviser, mourir, s'immortaliser ou se transformer. Le comportement de ces cellules est donc en adéquation avec l'hypothèse selon laquelle la sénescence est un phénomène suppresseur de tumeur. Cependant tous les types cellulaires ne se comportent pas de la même façon. Les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) entrent en sénescence après une petite dizaine de doublements et émergent spontanément et s'établissent en lignée, immortalisée mais non transformée ni tumorigénique (les célèbres NIH3T3) (Todaro & Green, 1963). Un phénomène similaire a été décrit avec les cellules épithéliales mammaires humaines (HMEC) par le groupe de Tlsty (Romanov et al., 2001), et les kératinocytes d'épiderme humain (NHEK) au sein de notre laboratoire avec l'émergence dans ce cas de cellules non immortalisées mais présentant des caractères transformés et tumorigènes (voir article n°4 de la présente thèse).

Les deux principaux mécanismes impliqués dans l'établissement de la sénescence, le raccourcissement des télomères et l'accumulation de dommages oxydants, contribuent à l'instabilité génétique de la cellule. Du fait des différents dommages à l'ADN qui conduisent à la sénescence,

cette dernière est considérée comme un mécanisme d'arrêt de prolifération de cellules génétiquement altérées et donc potentiellement cancéreuses. Cependant, les altérations génétiques associées à la sénescence peuvent, en théorie, affecter un cocktail d'oncogènes et de suppresseurs de tumeur dans certaines cellules favorisant une évolution vers la transformation ou l'immortalisation. En d'autres termes, les télomères raccourcis et le stress oxydant pourraient également favoriser l'émergence de cellules tumorales dans des tissus âgés. Nous avons développé les données et les arguments supportant cette hypothèse dans un article de revue publié sur invitation dans Annals of the New York Academy of Sciences, présenté ci-après (Article 1).

Le but général de ma thèse a été d'étudier les relations entre la sénescence et la tumorigenèse et le rôle du stress oxydant dans ces deux événements. Ce travail se repose principalement sur l'étude d'un modèle cellulaire *in vitro* qui pourrait mimer les étapes précoce de la carcinogenèse : les kératinocytes d'épiderme humain. En effet, dans les cultures de kératinocytes, nous pouvons observer systématiquement l'émergence d'un petit nombre de cellules présentant des caractéristiques de cellules transformées et capables d'évoluer vers un phénotype pleinement malin. Mon travail a consisté à caractériser les cellules émergentes et étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans leur genèse. Nous avons approfondi notre compréhension des mécanismes d'initiation tumorale par une étude comparative des mécanismes de sénescence des kératinocytes et fibroblastes de peau, en nous intéressant plus particulièrement à l'accumulation des dommages oxydants.

Article 1: « Acquisition of oxidative DNA damage during senescence: the first step toward carcinogenesis? ».

Acquisition of Oxidative DNA Damage during Senescence

The First Step toward Carcinogenesis?

SÉBASTIEN MARTIEN AND CORINNE ABBADIE

UMR 8161 CNRS/Université Lille 1/Université Lille 2/Institut Pasteur de Lille, Institut de Biologie de Lille, Lille Cedex, France

ABSTRACT: As a result of time and cumulative divisions in vitro and in vivo, normal cells enter an irreversible nonproliferative state termed replicative or cellular senescence that is thought to contribute to organism aging. Both telomere shortening and cumulative oxidative damage were shown to contribute to senescence, probably acting at different degrees according to proliferation index, cell type, or environment. Because of its associated cohort of damages and irreversible cell-cycle arrest induced by shortened telomeres, senescence is commonly considered as a tumor-suppressor mechanism that stops the proliferation of genetically altered cells (i.e., potentially cancerous). However, the incidence of the most frequent cancers in humans, carcinomas, exponentially increases with age; the phenotypes of progeroid syndromes are often associated with an increase in tumor incidence, and inversely when aging is delayed by caloric restriction, the cancer incidence decreases. How can this positive link between aging and tumorigenesis be explained if senescence is a tumor-suppressor mechanism? The present article considers data and arguments supporting a protumoral role of senescence. We focus on the importance of the oxidative damage that targets DNA during senescence. Indeed, because of its mutagenic effects, oxidative damage could affect oncogenes and/or tumor-suppressor genes in some senescent cells, hence promoting their evolution toward initiated cancer cells. This mechanism could be particularly relevant for age-associated carcinomas because senescence in epithelial cells is driven more by oxidative stress than by telomere shortening.

KEYWORDS: senescence; ROS; telomeres; DNA damage; carcinogenesis

Ann. N.Y. Acad. Sci. 1119: 51–63 (2007). © 2007 New York Academy of Sciences. doi: 10.1196/annals.1404.010

Address for correspondence: Corinne Abbadie, UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Pr. Calmette, BP447, 59021 Lille Cedex, France. Voice: +3 33 20 87 11 02; fax: +3 33 20 87 11 11. corinne.abbadie@ibl.fr

WHAT IS SENESCENCE AND WHAT LINK WITH CANCER?

When explanted from tissues into *in vitro* culture, normal cells can undergo only a finite number of divisions, and thereafter enter a growth stationary phase termed *replicative* or *cellular senescence*.^{1–3} Senescent cells display a characteristic enlarged and spread morphology. They highly express the lysosomal enzyme β -galactosidase, the well-known SA- β -gal marker, and they accumulate lipofuscin.^{4–12} Senescent cells are irreversibly cell-cycle arrested, preferentially but not exclusively at the G1-S boundary, and display various chromosomal abnormalities, including polyploidy and polynucleation.^{9,13} Surprisingly for cells destined to die, senescent cells are apoptosis resistant.^{14–18} Senescent cells were shown to accumulate *in vivo* with advancing age, in human and primates.^{12,19,20}

Based on genetics as well as on transcriptome/proteome studies, it is now clear that senescence occurs in correlation with the establishment of a special genetic program that modifies different cell functions, including proliferation, apoptosis, resistance to stress, genome surveillance, energetic metabolism, and inflammation and immunity.^{2,21} Two main events were shown to promote senescence: telomere erosion and cumulative oxidative damage.²² Telomeres shorten because of the so-called end-replication problem. This shortening deprotects the chromosome ends that hence mimic DNA breaks; this sends a signal for cell-cycle arrest,²³ and, in the case of deficient checkpoints control, can lead to some misrepairings that result in genetic instability.^{24,25} Reactive oxygen species (ROS), produced throughout the life of the cell, constantly attack macromolecules. Because most of the oxidized lipids and proteins are poorly degradable, they accumulate in the form of large aggregates of lipofuscin that congest the cell and alter its functioning.²⁶ The oxidative damage affecting DNA, along with telomere shortening, contributes to cell-cycle arrest and to genetic instability.^{11,27–29} Numerous data show that oxidative damage. similar to that observed in senescent cells, also accumulates in tissues with advancing age.³⁰⁻³⁴ In contrast, only a small, although significant, decrease in telomere length was described in proliferating and nonproliferating tissues with age.^{35–37} In other respects, the relative importance of cumulative oxidative damage and telomere shortening in the establishment of the senescent state may vary according to proliferation index, cell type, or environmental conditions. Roughly, the senescence of fibroblasts seems mainly driven by telomere shortening,³⁸ whereas that of epithelial cells could be telomere independent³⁹⁻⁴¹ and principally resulting from oxidative stress.⁴²

Because of its associated cohort of damages and irreversible cell-cycle arrest, senescence can be viewed as a response to stop the proliferation of genetically altered cells (i.e., potentially cancerous). For this reason, senescence has been proposed as a tumor-suppressor mechanism.⁴³ However, since senescence-associated DNA damages should be, in principle, stochastic, they could statistically affect, in some cells, a cocktail of oncogenes and tumor-suppressor

genes favoring an evolution toward transformation or immortalization. In other terms, ROS and telomere shortening could behave as endogenous carcinogens that would especially accumulate at senescence, hence increasing the probability of developing a cancer at an advanced age. The present article aims to review data and arguments supporting this hypothesis.

SENESCENCE IS NOT ALWAYS A BARRIER AGAINST TRANSFORMATION OR IMMORTALIZATION

The molecular mechanisms of senescence, as briefly reported in the above paragraph, were mainly established using *in vitro* cultures of primary human fibroblasts. These cells have the ability to slowly divide in vitro, making about 60 population doublings in 5 months, before entering the senescent growth plateau. At this plateau, they display shorten telomeres and produce high quantities of ROS.^{44,45} The surprising fact is that they remain in this stage for a very long period, up to several years, without really dividing or dying. This behavior fits neatly with the view that senescence is a tumor-suppressor phenomenon. However, not all cell types or species behave this way in vitro. Mouse embryonic fibroblasts undergo senescence after approximately 10 population doublings, and thereafter spontaneously emerge and develop into established lines, immortalized but not transformed and non-tumorigenic (e.g., the wellknown NIH3T3).⁴⁶ Similar emergence phenomena were also described with human mammary epithelial cells (HMEC) by the group at Tlsty⁴⁷ and normal human epidermal keratinocytes (NHEK) in our laboratory (our unpublished data). These two types of epithelial cells, issued from healthy donors, spontaneously and systematically overcome senescence at a frequency ranging from 10^{-5} to 10^{-2} (i.e., a frequency much higher than that of spontaneous mutations, which have a frequency of 10^{-9}). Emerging cells appear in clusters, are refractile, and lose SA-B-gal activity. They have a prolonged life span and display some markers of transformation, at least in the case of NHEK (our unpublished data). However, they are not immortalized and not tumorigenic when injected in *nude* mice (our unpublished data). Moreover, they do not display shortened telomeres or karvotypic aberrations before reaching the second growth plateau⁴⁷ (and our unpublished data). Since cells of early breast lesions display relatively few karyotypic abnormalities,⁴⁸⁻⁵⁰ we think that the emerging cells obtained in vitro could represent initiated cancer cells. It is to be kept in mind that mammary or dermal fibroblasts, isogenic with HMEC or NHEK and managed in the same studies, never spontaneously overcome senescence⁴⁷ (and our unpublished data). Thus, the potential for initiated cancer cells to spontaneously emerge from cultures at senescence could be restricted to epithelial cells in human. Interestingly, this correlates well with epidemiologic data of human cancers, where carcinomas appear as the more frequent cancers with an incidence clearly linked to age, whereas the incidence of sarcomas is

very low and similar across age groups. Hence, in the case of epithelial tissues, the senescing state does not appear to be a barrier against tumor development and could, in fact, promote the generation of initiated cancer cells.

CANCER CELLS COULD ORIGINATE FROM SENESCENT CELLS

The fact that transformed or immortalized cells can emerge from a population of senescent cells in vitro suggests that, in vivo, the initial cancer cells could similarly be generated from senescent cells; if this is true, one should find markers of their passage through the senescent stage. And indeed, there are several markers of this type. First, it is well established that cells from most tumors, as well as transformed cell lines, are in a state of chronic oxidative stress.^{51–53} For example, several human tumor cell lines, as different as carcinomas, melanomas, and neuroblastomas, were shown to produce amounts of hydrogen peroxide in 4 h similar to amounts produced by neutrophils during a burst of activation.⁵⁴ Reflecting the deleterious nature of ROS and their main place of production, the mitochondria, mutations in mitochondrial DNA have been found in various types of human cancer, including a 4977-bp deletion⁵⁵ that is also found in various tissues of aged individuals.^{56,57} A common product of DNA oxidative damage in senescent cells, 8-oxoguanine (80x0G),^{27,34,58} is also found in cancer cells, with levels directly correlated with the tumor grade.⁵⁹ The second striking similarity between senescent and cancer cells is the presence of shortened telomeres. More than 80% of cancers were shown to display shortened telomeres but had length stabilization as a result of telomerase reactivation.^{60–63} Those data suggest that cancer cells have passed through the senescent stage before becoming transformed, but raise the question as to why shortened telomeres signal cell cycle arrest in senescent cells but not in cancer cells. A third similarity between senescent and cancer cells, and one that has high importance for the outcome of anticancer treatments, is their common apoptosis resistance.^{16,64} Finally, one can notice that the constitutive NF- κ B activity frequently observed in tumor cells⁶⁵ has been shown to participate in the establishment of the senescent growth plateau.⁴² All these similarities between senescent and cancer cells suggest a putative filiation of cancer cells with senescent cells.

SENESCENCE-ASSOCIATED OXIDATIVE DAMAGE IS MUTAGENIC AND POSSIBLY TUMORIGENIC

In order for cancer cells to be generated from senescent cells, there must be some mutagenic events that occur during senescence. The importance of a high rate of mutations associated with senescence in the development of tumors is highlighted by many progeria syndromes. These syndromes are monogenic diseases, generally affecting an enzyme involved in genome maintenance, such as the WRN DNA helicase in Werner syndrome or the BLM DNA helicase in Bloom syndrome.⁶⁶ Deficiencies in these helicases result in a high rate of chromosome rearrangements, increased spontaneous mutations, increased recombination, and defective DNA replication and repair, leading to a marked genomic instability. Patients suffering from these syndromes not only undergo premature aging but also have a high incidence of developing different kinds of tumors. Hence, aging and tumorigenesis seem to be driven by the same cause, accumulation of DNA alterations. The question is whether this positive link between aging and tumorigenesis is transposable to normal situations (i.e., whether during normal senescence some mutagenic events occur that could favor tumorigenesis as well). Oxidative damage could be one of them.

Oxidative damage is due to an overdose of ROS as a result of an imbalance between ROS production and degradation by antioxidant systems. Among ROS targets, DNA appears the most important for tumor biology because of its mutation-prone characteristics. Several types of DNA damage can be caused by ROS: breaks, oxidation of bases, adducts, and cross-linkings.⁶⁷ DNA breaks induced by ROS are mainly single-strand ones.^{68,69} They can result in point mutations, probably due to occasional mis-incorporations during the following replication. In addition, if they are not repaired, single-strand breaks can lead to double-strand breaks that are potential generators of genomic instability if repaired improperly⁷⁰ and potential generators of microdeletions when repaired by nonhomologous end-joining.^{71,72} During senescence and aging, it was shown not only that DNA double-strand breaks accumulate⁷³ but also that the efficiency of their repair decreases⁷⁴ and the frequency of end-joining errors increases.⁵⁸ The level of 80xoG, one of the most common oxidative base damage in cells, is significantly increased in senescent cells compared to their young counterpart.^{27,58,75,76} and a decline in hOGG1, the specific repair enzyme of 80x0G, was described during senescence of human skin fibroblasts and human oral keratinocytes.^{58,76} 80xoG is a mutagenic damage. Indeed, this oxidized purine can pair with both cytosine and adenine during DNA synthesis, leading to G:C to T:A transversions.77,78

The ability of oxidative DNA damage accumulated with senescence to favor tumorigenesis was experimentally demonstrated in caloric restriction (CR) experiments. CR is the best experimental intervention that extends life span at the organism level. It also reduces the occurrence of age-associated diseases, including cancer.⁷⁹ Mechanisms by which CR proceeds are not completely understood, but a growing body of evidence suggests involvement of mitochondria and the production of ROS. Long-term CR decreases the rate of mitochondria H₂O₂ production⁸⁰ and mitochondrial and nuclear accumulation of 80xoG,³⁴ as well as mitochondrial DNA deletions and rearrangements.^{81,82} Spontaneous- and induced-mutation frequencies are also reduced.^{83,84} In addition, CR completely reverses the age-related decline in base excision repair capacity.^{85,86} In brief, CR delays aging, decreases the level of oxidative stress, and decreases cancer incidence; this is the exact inverse of progeria syndromes where aging occurs prematurely and is associated with numerous DNA alterations and mutations and increased cancer incidence. These data strongly suggest that aging-associated oxidative DNA damage could favor the initial steps of cancer initiation. In support of this initiator role, multiple studies have shown the presence of oxidative DNA damage in early lesions at levels lower,^{59,87} similar,⁸⁸ or even greater⁸⁹ than levels in high-grade progressing tumors. However, it is clear that the high level of oxidative stress maintained in cancer cells should also contribute to cancer progression.

TELOMERE SHORTENING COULD BE INVOLVED MORE IN CANCER PROGRESSION THAN IN CANCER INITIATION

Senescence is associated with telomeres shortening and uncapping. Uncapped chromosome ends are sensed as double-strand breaks, and as such, can induce a repair pathway generating chromosome end-to-end fusions. The dicentric fused chromosomes then lead to a series of so-called Breakage–Fusion– Bridge cycles, hence generating chromosomal instability and genome-wide mutations.⁹⁰ Therefore, telomere shortening could also contribute, with oxidative DNA damage, to cancer genesis. In support of this view is the fact that most cancers display shortened telomeres and several markers of telomeric fusions, such as anaphasic bridges and dicentric chromosomes.⁹¹ In addition, telomerase-null mice display a premature-aging phenotype and a fourfold to sixfold increase in the incidence of spontaneous tumors at old age; this is associated with a threefold to 18-fold increase in the number of chromosomal fusions.⁹²

Shortened and uncapped telomeres are known to function as DNA breaks that signal for irreversible cell cycle arrest, and therefore these telomeres should not favor tumorigenesis. This is the case for human fibroblasts in vitro that have reached the senescence growth plateau, since they remain in this stage without ever generating any transformed or immortalized cells. In that situation, telomere shortening appears as a perfect tumor-suppressor mechanism. Avoiding telomere shortening in these cells, by expressing the catalytic unit of telomerase (hTERT), for example, leads to immortalization but does not confer a cancerous status.^{93,94} Actually, cells with shortened telomeres that have generated end-to-end fusions can become resistant to cell-cycle arrest because end-to-end fusions act as an expedient for masking chromosome ends, and can also sustain genetic instability via breakage-fusion-bridge cycles. Therefore, one can assume that telomere shortening can become tumorigenic in that situation only. The question is when and how can this situation occur? One can hypothesize that mutations or epigenetic events must occur prior to telomere shortening to enable cells to escape the first cell-cycle arrest

induced by telomere shortening; to stabilize their chromosomes to a nonlethal length by activating the alternative lengthening of telomere system or by re-expressing the telomerase; and to avoid the death pathways induced by an unstable genome. These mutations or epigenetic events could be the result of senescence-associated oxidative stress. In that view, telomere shortening would not be involved in the initial steps of tumorigenesis, which should occur before telomere shortening. In support of this notion, human naevi, which are benign tumors of melanocytes, frequently harbor mutations in the *BRAF* oncogene but do not display telomeres shorter than those of the surrounding stromal cells.⁹⁵ Similarly, in benign prostatic hyperplasia as well as hyperplastic lung tissue, telomere lengths are not significantly different from those of the corresponding normal epithelial tissues.^{61,96} However, telomere shortening and end-to-end fusions could be essential for cancer progression, together with ongoing oxidative stress, by inducing genome-wide mutations.

HOW TO INTERPRET THE PRESENCE OF SENESCENT CELLS IN BENIGN TUMORS?

The initiating events in tumorigenesis may occur in the oxidative-injury context of senescing cells. And indeed, a few studies have shown the presence of senescent cells in premalignant lesions. In benign prostate hyperplasia, a SA-B-gal activity was detected only in epithelial cells, and was strongly correlated with prostate weight, a marker of the advancement of the hyperplasia.⁹⁷ Human congenital naevi display melanocytes also with senescence markers: stable growth arrest, heterogeneous induction of p16, and SA-B-gal activity.⁹⁵ K-rasV12-expressing mice develop multiple lung or pancreatic adenomas (premalignant tumors) and a few lung or pancreatic adenocarcinomas (malignant tumors). A large number of cells in adenomas is positive for senescence markers (p16, SA-B-gal, Dec1, HP1- γ , weak proliferative index), whereas adenocarcinomas are weakly positive or negative for these markers.⁹⁸ This presence of senescent cells in benign tumors was proposed to be the result of stress induced by the activation of initial oncogenes, BRAF in naevi and K-rasV12 in the mouse model of lung and pancreas tumorigenesis. In addition, it was proposed that this premature oncogene-induced senescence restricted further tumoral progression, explaining why these tumors were only benign.^{95,98} However, this proposal is in contradiction to the fact that these benign lesions have a high risk of developing in an invasive tumor. We propose that the presence of senescent cells in benign tumors reflects a local increase in oxidative stress as a result of a special hormonal environment (as in prostate), an inherited oncogene activation (as in congenital naevi), or diverse chronic infections or injuries for sporadic cases. These premature-senescent cells could then be at the origin of the generation of initiated cancer cells that have a weak increased life span and a weak level of transformation but enough to make the benign tumor more susceptible than normal cells to further transform and immortalize.

CONCLUSION

The relationships between senescence and tumorigenesis might be diametrically opposed when considering fibroblasts or epithelial cells. First, sarcomas in humans are rare and their incidence is not linked to age, whereas carcinomas are much more frequent and their incidence strictly linked to advanced age. Second, senescence in fibroblasts seems to be driven mainly by telomere shortening, whereas senescent epithelial cells keep relatively long telomeres and seem affected mainly by oxidative stress. Third, fibroblasts seem less sensitive to ROS insults than epithelial cells. Hence, fibroblasts at senescence have reached their telomere limit, which persistently activates their cell-cycle arrest pathways, and have a poorly damaged genome. As a result, fibroblasts would stay in this state without evolving further toward immortalization or transformation. Fibroblasts might even be poorly responsive to exogenous mutagens because of their state of irreversible arrest. The senescent state for these cells might indeed be tumor suppressant. In contrast, epithelial cells at senescence, arrested because of general oxidative damage, still have rather long telomeres, enabling them to eventually undergo further divisions, and have accumulated discrete mutations resulting from oxidative DNA damage. These mutations could statistically affect a set of oncogenes and/or suppressor genes favorable to transformation and/or reproliferation. Hence, some senescent cells could evolve toward cancer-initiated cells (i.e., cells already partially transformed and hence highly prone to further tumoral development upon exposure to exogenous carcinogens). Therefore, in the case of epithelial cells, senescence is not a state of irreversible arrest but a state of pro-oxidant arrest potentially reversible and favoring the accumulation of mutations; as such, senescence is a tumor-promoter state. Finally, whatever the cell type, senescence as a tumorsuppressor should be less efficient than apoptosis because it is primarily a state of arrest that runs toward cell death, but only after a long delay during which numerous events, including tumor-prone ones, could occur.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université Lille 1, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Ligue contre le Cancer (Comités du Nord et de l'Aisne), the Institut Pasteur de Lille, the Conseil Régional Nord/Pas-de-Calais, and the European Regional Development Fund.

REFERENCES

- 1. HAYFLICK, L. 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. **37:** 614–636.
- 2. JAZWINSKI, S.M. 1996. Longevity, genes, and aging. Science 273: 54-59.

MARTIEN & ABBADIE

- 3. SMITH, J.R. & O.M. PEREIRA-SMITH. 1996. Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression. Science **273**: 63–67.
- PIGNOLO, R.J., M.O. ROTENBERG & V.J. CRISTOFALO. 1994. Alterations in contact and density-dependent arrest state in senescent WI-38 cells. In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 30A: 471–476.
- ANGELLO, J.C. *et al.* 1989. Cell enlargement: one possible mechanism underlying cellular senescence. J. Cell Physiol. 140: 288–294.
- NORSGAARD, H., B.F. CLARK & S.I. RATTAN. 1996. Distinction between differentiation and senescence and the absence of increased apoptosis in human keratinocytes undergoing cellular aging in vitro. Exp. Gerontol. 31: 563–570.
- 7. GUHE, C. & W. FOLLMANN. 1994. Growth and characterization of porcine urinary bladder epithelial cells in vitro. Am. J. Physiol. **266:** F298–308.
- LIMA, L. & A. MACIEIRA-COELHO. 1972. Parameters of aging in chicken embryo fibroblasts cultivated in vitro. Exp. Cell Res. 70: 279–284.
- 9. SHERWOOD, S.W. *et al.* 1988. Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 9086–9090.
- BRUNK, U.T., C.B. JONES & R.S. SOHAL. 1992. A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. Mutat. Res. 275: 395–403.
- SITTE, N. *et al.* 2000. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II—aging of nondividing cells. Faseb J. 14: 2503– 2510.
- 12. DIMRI, G.P. *et al.* 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92:** 9363–9367.
- GOLDSTEIN, S. 1990. Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. Science 249: 1129–1133.
- SELUANOV, A. *et al.* 2001. Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. Mol. Cell Biol. 21: 1552–1564.
- BERNARD, D. *et al.* 2002. The c-Rel transcription factor can both induce and inhibit apoptosis in the same cells via the upregulation of MnSOD. Oncogene 21: 4392– 4402.
- 16. WANG, E. 1995. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. Cancer Res. **55**: 2284–2292.
- 17. SPAULDING, C., W. GUO & R.B. EFFROS. 1999. Resistance to apoptosis in human CD8+ T cells that reach replicative senescence after multiple rounds of antigen-specific proliferation. Exp. Gerontol. **34:** 633–644.
- CHATURVEDI, V. *et al.* 1999. Apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes. J. Biol. Chem. 274: 23358–23367.
- 19. RESSLER, S. *et al.* 2006. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. Aging Cell. **5:** 379–389.
- JEYAPALAN, J.C. *et al.* 2007. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. Mech Ageing Dev. **128**: 36–44.
- JAZWINSKI, S.M. 2000. Aging and longevity genes. Acta Biochim. Pol. 47: 269– 279.
- 22. LUNDBERG, A.S. *et al.* 2000. Genes involved in senescence and immortalization. Curr. Opin. Cell Biol. **12:** 705–709.
- VAZIRI, H. & S. BENCHIMOL. 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.

- BLASCO, M.A. *et al.* 1997. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. Cell 91: 25–34.
- ARTANDI, S.E. *et al.* 2000. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. Nature 406: 641–645.
- BRUNK, U.T. & A. TERMAN. 2002. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. Eur. J. Biochem. 269: 1996–2002.
- CHEN, Q. et al. 1995. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4337–4341.
- TOUSSAINT, O., E.E. MEDRANO & T. VON ZGLINICKI. 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. Exp. Gerontol. 35: 927–945.
- 29. HARMAN, D. 1998. Extending functional life span. Exp. Gerontol. 33: 95–112.
- HARMAN, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J. Gerontol. 11: 298–300.
- BOKOV, A., A. CHAUDHURI & A. RICHARDSON. 2004. The role of oxidative damage and stress in aging. Mech. Ageing Dev. 125: 811–826.
- 32. BERNARD, D. *et al.* 2001. Involvement of rel/nf-B transcription factors in cellular senescence. ScientificWorldJournal 1: 67.
- 33. SOHAL, R.S. 2002. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. Free Radic. Biol. Med. **33**: 37–44.
- HAMILTON, M.L. *et al.* 2001. Does oxidative damage to DNA increase with age? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 10469–10474.
- 35. KANG, M.K. *et al.* 2002. The telomeric length and heterogeneity decrease with age in normal human oral keratinocytes. Mech. Ageing Dev. **123**: 585–592.
- KVEIBORG, M. *et al.* 1999. Telomere shortening during aging of human osteoblasts in vitro and leukocytes in vivo: lack of excessive telomere loss in osteoporotic patients. Mech. Ageing Dev. **106**: 261–271.
- 37. AIKATA, H. *et al.* 2000. Telomere reduction in human liver tissues with age and chronic inflammation. Exp. Cell Res. **256**: 578–582.
- 38. BODNAR, A.G. *et al.* 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. Science **279**: 349–352.
- JARRARD, D.F. *et al.* 1999. p16/pRb pathway alterations are required for bypassing senescence in human prostate epithelial cells. Cancer Res. 59: 2957–2964.
- DICKSON, M.A. *et al.* 2000. Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. Mol. Cell Biol. 20: 1436–1447.
- 41. KIYONO, T. *et al.* 1998. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. Nature **396**: 84–88.
- GOSSELIN, K. & C. ABBADIE. 2003. Involvement of Rel/NF-kappa B transcription factors in senescence. Exp. Gerontol. 38: 1271–1283.
- CAMPISI, J. 2001. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. Trends Cell Biol. 11: S27–31.
- 44. HUTTER, E. *et al.* 2002. Replicative senescence of human fibroblasts: the role of Ras-dependent signaling and oxidative stress. Exp. Gerontol. **37:** 1165–1174.
- LEE, H.C. *et al.* 2002. Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence. J. Biomed. Sci. 9: 517– 526.

- TODARO, G.J. & H. GREEN. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. J. Cell Biol. 17: 299–313.
- ROMANOV, S.R. *et al.* 2001. Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. Nature 409: 633–637.
- BURBANO, R.R. *et al.* 2000. Cytogenetics of epithelial hyperplasias of the human breast. Cancer Genet. Cytogenet. **119**: 62–66.
- 49. BERNARD, D. *et al.* 2004. Involvement of Rel/nuclear factor-kappaB transcription factors in keratinocyte senescence. Cancer Res. **64:** 472–481.
- ELLSWORTH, R.E. *et al.* 2005. Timing of critical genetic changes in human breast disease. Ann. Surg. Oncol. **12:** 1054–1060.
- 51. TOYOKUNI, S. *et al.* 1995. Persistent oxidative stress in cancer. FEBS Lett. **358**: 1–3.
- 52. PELICANO, H., D. CARNEY & P. HUANG. 2004. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. Drug Resist. Updat. 7: 97–110.
- 53. HALLIWELL, B. 2007. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? Biochem. J. **401:** 1–11.
- SZATROWSKI, T.P. & C.F. NATHAN. 1991. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. Cancer Res. 51: 794–798.
- 55. CAREW, J.S. & P. HUANG. 2002. Mitochondrial defects in cancer. Mol. Cancer 1: 9.
- 56. PAK, J.W. *et al.* 2003. Mitochondrial DNA mutations as a fundamental mechanism in physiological declines associated with aging. Aging Cell **2:** 1–7.
- WEI, Y.H. & H.C. LEE. 2002. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. Exp. Biol. Med. (Maywood) 227: 671–682.
- KANG, M.K. *et al.* 2005. Senescence-associated decline in the intranuclear accumulation of hOGG1-alpha and impaired 8-oxo-dG repair activity in senescing normal human oral keratinocytes in vivo. Exp. Cell Res. **310**: 186–195.
- KARIHTALA, P. et al. 2006. Increasing oxidative damage and loss of mismatch repair enzymes during breast carcinogenesis. Eur. J. Cancer 42: 2653–2659.
- 60. KIM, N.W. *et al.* 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science **266**: 2011–2015.
- 61. SOMMERFELD, H.J. *et al.* 1996. Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. Cancer Res. **56**: 218–222.
- 62. MEEKER, A.K. & P. ARGANI. 2004. Telomere shortening occurs early during breast tumorigenesis: a cause of chromosome destabilization underlying malignant transformation? J. Mammary Gland Biol. Neoplasia **9:** 285–296.
- ENGELHARDT, M. *et al.* 1997. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. Clin. Cancer Res. 3: 1931–1941.
- 64. GREEN, D.R. & G.I. EVAN. 2002. A matter of life and death. Cancer Cell 1: 19–30.
- 65. RAYET, B. & C. GELINAS. 1999. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. Oncogene 18: 6938–6947.
- PUZIANOWSKA-KUZNICKA, M. & J. KUZNICKI. 2005. Genetic alterations in accelerated ageing syndromes. Do they play a role in natural ageing? Int. J. Biochem. Cell Biol. 37: 947–960.
- 67. KLAUNIG, J.E. & L.M. KAMENDULIS. 2004. The role of oxidative stress in carcinogenesis. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **44:** 239–267.

- CUNNINGHAM, M.L., J.G. PEAK & M.J. PEAK. 1987. Single-strand DNA breaks in rodent and human cells produced by superoxide anion or its reduction products. Mutat. Res. 184: 217–222.
- BAKER, M.A. & S.Q. HE. 1991. Elaboration of cellular DNA breaks by hydroperoxides. Free Radic. Biol. Med. 11: 563–572.
- CALDECOTT, K.W. 2003. Protein-protein interactions during mammalian DNA single-strand break repair. Biochem. Soc. Trans. 31: 247–251.
- LIEBER, M.R. *et al.* 1997. Tying loose ends: roles of Ku and DNA-dependent protein kinase in the repair of double-strand breaks. Curr. Opin. Genet. Dev. 7: 99–104.
- 72. CHU, G. 1997. Double strand break repair. J. Biol. Chem. 272: 24097-24100.
- SEDELNIKOVA, O.A. *et al.* 2004. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. Nat. Cell Biol. 6: 168–170.
- SELUANOV, A. *et al.* 2004. DNA end joining becomes less efficient and more errorprone during cellular senescence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 7624–7629.
- 75. WOLF, F.I. *et al.* 2002. Oxidative DNA damage as a marker of aging in WI-38 human fibroblasts. Exp. Gerontol. **37:** 647–656.
- KANEKO, T. *et al.* 2001. Accumulation of oxidative DNA damage, 8-oxo-2'deoxyguanosine, and change of repair systems during in vitro cellular aging of cultured human skin fibroblasts. Mutat. Res. 487: 19–30.
- CHENG, K.C. *et al.* 1992. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G—T and A—C substitutions. J. Biol. Chem. 267: 166–172.
- SEKIGUCHI, M. & T. TSUZUKI. 2002. Oxidative nucleotide damage: consequences and prevention. Oncogene 21: 8895–8904.
- HART, R.W. & A. TURTURRO. 1997. Dietary restrictions and cancer. Environ. Health Perspect. 105(Suppl 4): 989–992.
- 80. GREDILLA, R. *et al.* 2001. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. Faseb J. **15**: 1589–1591.
- KANG, C.M., B.S. KRISTAL & B.P. YU. 1998. Age-related mitochondrial DNA deletions: effect of dietary restriction. Free Radic. Biol. Med. 24: 148–154.
- MELOV, S. *et al.* 1997. Multi-organ characterization of mitochondrial genomic rearrangements in ad libitum and caloric restricted mice show striking somatic mitochondrial DNA rearrangements with age. Nucleic Acids Res. 25: 974–982.
- 83. CASCIANO, D.A. *et al.* 1996. Calorie restriction modulates chemically induced in vivo somatic mutation frequency. Environ. Mol. Mutagen. **27:** 162–164.
- DEMPSEY, J.L., M. PFEIFFER & A.A. MORLEY. 1993. Effect of dietary restriction on in vivo somatic mutation in mice. Mutat. Res. 291: 141–145.
- CABELOF, D.C. *et al.* 2003. Caloric restriction promotes genomic stability by induction of base excision repair and reversal of its age-related decline. DNA Repair (Amst) 2: 295–307.
- STUART, J.A. *et al.* 2004. Mitochondrial and nuclear DNA base excision repair are affected differently by caloric restriction. Faseb J. 18: 595–597.
- ZANNONI, G.F. *et al.* 2006. Expression of the CDK inhibitor p27kip1 and oxidative DNA damage in non-neoplastic and neoplastic vulvar epithelial lesions. Mod. Pathol. **19:** 504–513.
- TSURUDOME, Y. *et al.* 2001. Age-associated increase of 8-hydroxydeoxyguanosine in human colorectal tissue DNA. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. 56: B483– 485.
- MATSUI, A. *et al.* 2000. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. Cancer Lett. 151: 87–95.

MARTIEN & ABBADIE

- Lo, A.W. *et al.* 2002. DNA amplification by breakage/fusion/bridge cycles initiated by spontaneous telomere loss in a human cancer cell line. Neoplasia 4: 531–538.
- 91. GISSELSSON, D. *et al.* 2001. Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability. Am. J. Pathol. **158**: 199–206.
- 92. RUDOLPH, K.L. *et al.* 1999. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. Cell **96**: 701–712.
- JIANG, X.R. *et al.* 1999. Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. Nat. Genet. 21: 111– 114.
- MORALES, C.P. *et al.* 1999. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. Nat. Genet. 21: 115–118.
- 95. MICHALOGLOU, C. *et al.* 2005. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. Nature **436**: 720–724.
- LANTUEJOUL, S. *et al.* 2005. Telomere shortening and telomerase reverse transcriptase expression in preinvasive bronchial lesions. Clin. Cancer Res. 11: 2074– 2082.
- 97. CHOI, J. *et al.* 2000. Expression of senescence-associated beta-galactosidase in enlarged prostates from men with benign prostatic hyperplasia. Urology **56**: 160–166.
- 98. COLLADO, M. *et al.* 2005. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. Nature **436**: 642.

RESULTATS

1. MECANISMES DE SENESCENCE CELLULAIRE

1.1. Données préalables sur le rôle du stress oxydant dans la sénescence des kératinocytes

Au laboratoire, les études sur l'implication du stress oxydant dans la sénescence ont débuté à la suite de travaux sur les rôles pro-/anti-apoptotique et pro-/anti-prolifératif des facteurs de transcription de la famille Rel/NF- κ B. L'équipe avait montré que la surexpression de c-Rel, l'un des membres de la famille Rel/NF- κ B, dans des cellules Hela induisait un arrêt du cycle cellulaire, une résistance à l'apoptose et l'apparition d'un phénotype ressemblant à la sénescence avec étalement des cellules, augmentation du nombre de polyploïdies, et accumulation de vacuoles. Ces effets ont été attribués à l'induction d'un des gènes cibles des facteurs Rel/NF- κ B : la MnSOD. En effet, la surexpression de c-Rel dans les cellules Hela provoque une induction de l'expression de la MnSOD, qui dismute les anions O₂°- en H₂O₂. L'induction de la MnSOD n'étant pas accompagnée d'une co-induction d'expression des principales enzymes dégradant H₂O₂, la catalase et la glutathion peroxydase, celle-ci entraine une accumulation de H₂O₂ dans la cellule qui contribue à l'établissement du phénotype sénescent (Bernard et al., 2001a).

L'étude du rôle potentiel des facteurs Rel/NF- κ B dans la sénescence a ensuite été poursuivie dans un modèle mieux adapté de cellule primaire, non transformée, ni immortalisée : les kératinocytes d'épiderme humain normaux. Lorsqu'elles sont mises en culture, ces cellules effectuent 15-20 doublements de population avant d'atteindre un plateau de sénescence. Il a été montré au laboratoire que la sénescence de ces cellules s'accompagne d'une augmentation de l'activité des facteurs Rel/NF- κ B, induisant l'expression de la MnSOD. Cette induction de la MnSOD, comme pour les expériences de surexpression de c-Rel dans les cellules Hela, n'est pas accompagnée de l'induction de la catalase ou la glutathion peroxydase, ce qui entraine l'accumulation de H₂O₂ conduisant à l'établissement du phénotype sénescent. La culture des kératinocytes en présence de catalase permet de contrecarrer, au moins en partie, l'accumulation de H₂O₂, et retarde la survenue de la sénescence. A l'inverse, l'induction d'un stress oxydant avec des doses sub-toxiques de H₂O₂ induit une sénescence prématurée des cellules (Bernard et al., 2004). Des résultats similaires ont également été obtenus au laboratoire dans les cellules épithéliales mammaires humaines (données non publiées). Ces travaux montrent le rôle important du stress oxydant dans la sénescence des cellules épithéliales.

1.2. Rôle de l'activité COX-2 dans la sénescence normale ou induite des fibroblastes

a) Introduction

A mon arrivée au laboratoire, j'ai participé à la poursuite de travaux qui avaient pour objectif d'étudier le rôle des facteurs Rel/NF-κB dans la sénescence d'un autre modèle cellulaire très largement utilisé dans l'étude de la sénescence : les fibroblastes humains normaux. Il s'avère que dans les fibroblastes de derme humain, la sénescence n'est pas accompagnée d'une augmentation de l'activité Rel/NF-κB (donnée non publiée). Cette observation est en accord avec différentes études menées sur des fibroblastes issus de différents tissus (Aggarwal et al., 1995; Dimri & Campisi, 1994; Helenius et al., 1996; Helenius et al., 1999). Cependant, la surexpression de c-Rel, ou l'induction d'un stress oxydant par des traitements H_2O_2 induisent une sénescence prématurée des fibroblastes. Au cours de cette étude, la recherche de gènes cibles de NF-κB potentiellement impliqués dans la sénescence avait été étendue à la COX-2, dont l'activité est connue pour induire du stress oxydant. La COX-2 est une enzyme inductible de la voie de biosynthèse des prostaglandines. Elle est impliquée dans plusieurs réponses au stress, et son activité peut produire du stress oxydant. En effet, les cyclo-oxygénases ont deux activités : une activité cyclo-oxygénase qui va oxygéner l'acide arachidonique en PGG₂ et une activité hydroperoxydase permettant de réduire PGG₂ en PGH₂. Ce PGH₂ est ensuite converti par les PG synthases pour produire les différentes prostaglandines (Sampey et al., 2005). C'est lors de la conversion de PGG₂ en PGH₂ que sont cogénénérés des radicaux OH° et des anions O2°- qui induisent la co-oxydation de différents substrats (Kontos et al., 1980; Marnett et al., 1975).

b) Résultats

Nous montrons que la COX-2 est induite lors de la sénescence prématurée provoquée par la surexpression de c-Rel, lors de la sénescence prématurée provoquée par un stress oxydant (SIPS, stress-induced premature senescence), mais aussi lors de la sénescence normale des fibroblastes. Cette induction s'accompagne d'une augmentation de la production de PGE₂, la prostaglandine majoritaire. La stimulation de l'activité COX-2 dans des fibroblastes jeunes par ajout dans le milieu de culture d'acide arachidonique accélère la survenue des principaux marqueurs de sénescence : la morphologie étalée, l'activité SA- β -Gal, et l'arrêt de croissance. A l'inverse, l'inhibition de l'activité endogène de l'activité COX-2 par un inhibiteur spécifique, le NS398, retarde l'apparition de ces marqueurs de sénescence. De manière similaire, la sénescence induite par Rel/NF- κ B ou H₂O₂ est partiellement inhibée par l'utilisation du NS398 ou d'un ARNsi ciblant spécifiquement COX-2.

Ces résultats sont présentés dans l'article qui suit, publié dans Experimental Cell Research, en 2007 :

Article 2: « Normal or stress-induced fibroblast senescence involves COX-2 activity »



Research Article

Normal or stress-induced fibroblast senescence involves COX-2 activity

Stéphanie Zdanov^a, David Bernard^b, Florence Debacq-Chainiaux^a, Sébastien Martien^b, Karo Gosselin^b, Chantal Vercamer^b, Fazia Chelli^b, Olivier Toussaint^a, Corinne Abbadie^{b,*}

^aResearch Unit on Cellular Biology (URBC), University of Namur (FUNDP), rue de Bruxelles, 61 B-5000 Namur, Belgium ^bUMR 8161 CNRS/Université Lille 1/Université Lille 2/Institut Pasteur de Lille, Institut de Biologie de Lille, 1 rue Calmette, 59021 Lille Cedex, France

ARTICLEINFORMATION

Article Chronology: Received 19 February 2007 Revised version received 23 April 2007 Accepted 27 April 2007 Available online 22 May 2007

Keywords: Cyclooxygenase Prostaglandins Senescence Oxidative stress NF-κB

ABSTRACT

Cyclooxygenase-2 (COX-2) is an inducible enzyme of the prostaglandin biosynthesis pathway. It is involved in many stress responses, and its activity can produce oxidative damage, suggesting it could participate in senescence. In this study, COX-2 expression is shown to increase during senescence of normal human dermal or prostatic fibroblasts, and the ensuing prostaglandin E_2 (PGE₂) production to increase about 10-fold. Enhancing this COX-2 activity by supplying exogenous arachidonic acid accelerates the occurrence of the major markers of senescence, cell-size increase, spreading, senescence-associated- β galactosidase (SA- β -Gal) activity and growth plateau. Conversely, blocking this COX-2 activity with the specific inhibitor NS398 partially inhibited the occurrence of these markers. COX-2 expression and PGE₂ production are also increased about 10-fold during both NF- κ Bor H₂O₂-induced senescence. Using NS398 or small interferent RNA specifically targeting COX-2 attenuated the appearance of the SA- β -Gal activity and growth arrest in both stress situations. Taken together, these findings indicate that COX-2 is highly up-regulated during both normal and stress-induced fibroblast senescence and contributes to the establishment of the senescent characteristics.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Studies about senescence are on the increase since this phenomenon was proposed as a mechanism that would have evolved to protect organisms against cancer development [1]. Senescence is defined as the state of irreversible growth arrest reached by normal cells after a certain number of doublings. Senescent cells are dramatically different from their young counterparts: they express a specific genetic program, display a characteristic enlarged and spread morphology, exhibit decreased saturation density, express a high lysosomal β -galactosidase activity detectable at pH 6 and are irreversibly cell-cycle arrested [2]. At least two types of events were shown to promote senescence: telomere uncapping and cumulative oxidative damage. At each cell division, telomeres shorten because of the so-called end-replication problem. This shortening deprotects the chromosome ends that hence mimic DNA breaks and signal for cell-cycle arrest [3]. Reactive oxygen species (ROS) are produced all along cell life and constantly attack macromolecules. Most of the oxidized lipids and proteins being poorly degradable, they accumulate with time in the form of large aggregates of lipofuscin that congest

* Corresponding author. Fax: +3 33 20 47 61 99.

E-mail address: corinne.abbadie@ibl.fr (C. Abbadie).

^{0014-4827/\$ –} see front matter © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/j.yexcr.2007.04.033

the cell and alter its functioning [4]. The oxidative damage affecting DNA contributes with telomere shortening to the cell-cycle arrest. All stress situations that enhance DNA damage or ROS production contribute to accelerated occurrence of senescence [5]. Hence, premature senescence can be triggered upon treatment with subtoxic H_2O_2 doses [6] or overexpression of oncogenes such as Ras or NF- κ B that alter intracellular ROS levels [7,8].

Cyclooxygenases (COXs), also named prostaglandin endoperoxide synthases, are involved in the synthesis of prostaglandins from arachidonic acid. COXs share two enzymatic activities: a cyclooxygenase activity that bis-oxygenates the arachidonic acid in PGG₂, and a hydroperoxidase activity that reduces PGG₂ in PGH₂. Specific terminal PG synthases then convert PGH₂ to the different prostaglandins, PGE₂, PGF₂, PGD₂, to the prostacyclin PGI₂ and to thromboxane A2. Two COX isoforms were identified. COX-1 is constitutively expressed. COX-2 is induced by pro-inflammatory growth factors and cytokines, namely in pathologies such as cancer or neurodegeneration. Prostaglandins are involved in many physiological functions such as bone homeostasis, smooth-muscle contraction, angiogenesis and nervous communication. However, their major role seems to lie in the stress-response with a participation in the immune response, inflammation, tissuedamage and pain [9].

Interrelations between the prostaglandin biosynthetic pathway and oxidative stress are numerous. Co-oxidations of various substrates occur during the conversion of PGG_2 to PGH_2 , probably due to the side-production of superoxide anions (O_2^-) and hydroxyl radical (OH'). These side-reactions were shown for example to induce cerebral arteriolar damage [10–12]. PGE_2 suppresses mononuclear cell activation by decreasing the intracellular concentration of GSH [13]. PGD_2 was shown to be able to conjugate with GSH [14]. In addition, prostaglandins are inactivated by forming GSH-adducts, a reaction catalyzed by glutathione-S-transferases [15].

Given these correlations between COX activity and oxidative stress, we postulated that COXs expression or activity could be modified during and even participate in senescence. We present here investigations demonstrating that COX-2 expression is up-regulated both during normal and stress-induced senescence of fibroblasts and contributes to the establishment of the specific senescent phenotype, including cell-size increase, cell spreading, SA- β -Gal activity and growth arrest.

Materials and methods

Cell culture and reagents

Normal human dermal fibroblasts (NHDF) and prostate fibroblasts (PrSC) were purchased from Clonetics, and grown at 37 °C in an atmosphere of 5% CO_2 in the *ad hoc* medium supplied by Clonetics (FGM-2 and SCGM bulletKit systems for NHDF and PrSC respectively). Cells were seeded as recommended by the supplier and passaged at 70% confluence. The number of population doublings (PDs) was calculated at each passage by using the following equation: PD=ln(number of collected cells/number of plated cells)/ln2. NHDF were able to achieve approximately 30PDs in our culture conditions with-

out displaying any sign of senescence. Between 30 and 50PDs, some cells with senescent morphologies began to appear but the culture continued to grow. From 50PDs, the growth of the culture slowed down. Beyond 60PDs, the senescent phenotype was fully established in the majority of cells that were large and anarchically organized and the culture displayed a characteristic growth plateau. The growth kinetics of prostatic fibroblasts was similar with a growth plateau reached at 50PDs. Human fetal lung IMR-90 fibroblasts immortalized with the catalytic subunit of telomerase (hTERT) (hTERT IMR-90, Ludwig Institute for Cancer Res., UK) were grown in MEM (Invitrogen, UK) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Invitrogen, UK). NS398 (N-(2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl) methanesulfonamide) was from Biomol Research Laboratories or from Calbiochem, UK. Arachidonic acid was from Sigma.

NF-*k*B-induced senescence

Production and use of adenoviral vectors were described elsewhere [16]. Cells were infected by adding virus stocks directly to the culture medium at an input multiplicity of 100 viral particles/cell.

H₂O₂-induced senescence

hTERT IMR-90 HDFs at half confluence were exposed for 2 h to 200 μ M H₂O₂ (Merck, Germany) diluted in MEM+10% FCS. After



Fig. 1 – Changes in COX-2 expression and activity during normal senescence of human dermal fibroblasts. (A) Protein extracts were performed from 10 to 20PDs for young NHDF, and from 50 to 60PDs for senescent cells and analyzed by western blot for COX-2 and β -actin expression. The quantity of PGE₂ released in the culture medium during 15 h by cells at different stages was measured by an ELISA assay. Each bar represents the mean±SD of 4 points. (B) Protein extracts were performed at 7.75DPs for young prostate fibroblasts, at 27PDs for cells in the middle of the growth phase and at 47.5PDs for senescent cells and analyzed by western blot for COX-2 and β -actin expression.

the stress, cells were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and given fresh MEM+10% FCS. Control cultures followed the same schedule of medium changes without H_2O_2 treatment.

Western blotting

Protein extraction, dosages, separation by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transfer followed standard procedures. Primary antibodies used were: antihuman c-Rel mouse IgG (sc-6955, Santa Cruz Biotechnology), anti-human COX-2 mouse IgG [17] in Fig. 1 and from Cayman, UK, in Fig. 5, anti-human actin goat IgG (sc-1616, Santa Cruz Biotechnology) and anti- α -tubulin antibody (AM2495-11, Innogenex, USA).

COX-2 activity

COX-2 activity was estimated by measuring the level of PGE_2 release in the culture medium with the PGE_2 EIA Kit-Monoclonal (Cayman Chemical, 514010) in (Figs. 1, 2 and 4) and the PGE2 ELISA kit (R&D Systems, UK) in Fig. 5. Eight thousand cells



Fig. 2 – Activating endogenous COX-2 activity by supplying exogenous arachidonic acid accelerates the occurrence of senescence markers. (A) NHDF from 17PDs were treated with arachidonic acid at 1 or 5 μ M or ethanol diluent every 48 h. They were photographed under phase-contrast microscopy at different time points after 10 days of treatment. (B) During the treatment, cells were passaged at 70% confluence, counted and the number of population doublings calculated. The experiment was performed in triplicate, each point representing the mean of three counts. Significant differences between Ethanol control and 5 μ M arachidonic acid treatment are indicated. (C) SA- β -Gal assays were performed at different time points after the beginning of the treatment. SA- β -Gal-positive cells were manually counted in triplicate. Each bar represents the mean \pm SD of 4 points. (D) The quantity of PGE₂ released in the culture medium during 15 h by cells 24 h after the arachidonic acid treatment was measured by an ELISA assay. Each bar represents the mean \pm SD of 4 points.

were seeded in 24-well plates, eventually infected and treated with NS398. After 48 h the medium was replaced by fresh one and 15 h later the level of PGE_2 was measured.

BrdU incorporation assays, $[^{3}H]$ -thymidine incorporation and SA- β -Gal assays

Cells were incubated with BrdU (Boehringer Mannheim) at 10 µM during 20 h. Cells were subsequently fixed with 4% paraformaldehyde in PBS and permeabilized with 0.2% Triton-X100, incubated with 40 U/ml DNaseI (Promega) and 20 U/ml ExonucleaseIII (Boehringer Mannheim) during 30 min at 37 °C. BrdU was revealed by incubations with anti-BrdU mouse IgG (Dako), and with Rhodamine Red anti-Mouse IgG (715-296-150, Jackson ImmunoResearch Laboratories). For [³H]-thymidine incorporation, cells were seeded 24 h after the H₂O₂-stress in 24-well plates (Cell Cult, UK) at a density of 10,000 cells/well. 1 μCi [³H]-thymidine (specific activity: 2 Ci/mmol, Du Pont, NEN, USA) was added to the culture medium for 48 h. The incorporated radioactivity was quantified by a scintillation counter (Packard Instrument Company, USA). SA-β-Gal assays were performed as described in [18]. SA- β -Gal-positive cells were manually counted in randomly selected microscopic fields.

Real-time RT-PCR

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). COX-2 specific primers were designed with Primer Express 1.5 Software, PE Applied Biosystem, Foster City, CA, USA. They were 5'-ATTAGCCTG-AATGTGCCATAAGACT-3' (position 111–136) and 5'-ACCCAC-AGTGCTTGACACAGAAAT-3' (position 217–230). Amplification reaction assays contained 1× SYBR Green PCR Mastermix and primers at optimal concentration (Applied Biosystems, The Netherlands). A hot start at 95 °C for 5 min was followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 65 °C for 1 min using the ABI PRISM 7000 SDS thermal cycler (Applied Biosystems, The Netherlands). Fluorescence emission was detected for each PCR cycle and the threshold cycle (Ct) values were determined. Values were reported as average of triplicate analysis±SD.

Gene silencing experiments

Small interferent RNA (siRNA) transfection experiments against COX-2 were performed using double-stranded RNA synthetized by Dharmacon (siGENOME SMARTpool, Dharmacon, USA). A non-targeting siRNA (Eurogentec, Belgium) was used as control. IMR-90 hTERT cells were transfected with JetSI (Eurogentec, Belgium) at a ratio of $3 \mu l/\mu g$ of siRNA according to the manufacturer's instructions. Transfection efficiency in cells plated on cover-slips was determined using fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled siRNA and evaluated to 90–95% after 24 h by cell counting by a confocal microscopy (Leica, Germany). IMR-90 hTERT cells were plated in 25 cm² flasks at 50% confluence 24 h before transfection with siRNA or incubated with JetSI alone. At 24 h after transfection, cells were stressed for 2 h with 200 μ M H₂O₂.

Immunofluorescence staining and confocal microscopy

IMR-90 hTERT HDFs were seeded at 1000 cells/cm² in MEM+ 10% FCS on glass coverslides at 4 h after H_2O_2 stress. At 24 h after the stress, cells were fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde (Merck, Germany) in PBS before three washings with PBS. Cells were permeabilized in PBS+1% Triton X-100 (Sigma, USA) and then washed twice with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma, USA). The specific rabbit antibody raised against COX-2 (1:500 dilution Santa-Cruz, USA) was added overnight at 4 °C in a wet room. Cells were washed twice with PBS+1% BSA before adding the specific Alexa Fluor-568-conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:1000 dilution, Molecular Probes, USA) diluted in PBS+1% Triton X-100 for 1 h in a wet room at room temperature. Cells were washed three times in PBS+1% BSA. To visualize the nucleus, cells were incubated for 35 mn at room temperature with



Fig. 3 – Inhibiting endogenous COX-2 activity by NS398 partly abrogates the occurrence of senescence markers. (A) NS398 was applied to long-term cultures of NHDF every 2–3 days at the concentration of 5 μM. Cells were passaged at 70% confluence, counted and the number of population doublings calculated. The experiment was performed in duplicate. The inset enlarges the curve from the senescent growth plateau. (B) SA-β-Gal assays were performed after control cells have reached the senescence growth plateau. SA-β-Gal-positive cells were manually counted in triplicate. Each bar represents the mean±SD of 4 counts.

TO-PRO-3 (1:80 dilution, Molecular Probes, USA) in PBS+2 mg/ml RNAse (ICN, USA). Negative controls were without primary antibody and without secondary antibody. Coverslides were mounted in Mowiol (Sigma, USA) and observed with a TCS confocal microscope (Leica, Germany) using a constant multiplier.

Statistical analysis

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

Results

COX-2 is up-regulated during senescence of normal human fibroblasts

To assess whether COX-2 expression or activity could be modified with senescence, we cultivated normal human dermal fibroblasts (NHDF) until senescence, and compared the expression of COX-2 between young and senescent cells by western blot. We also performed ELISA assays to measure the release of PGE₂ in the culture medium, the prostaglandin synthesized by COX-2 in the broader range of cell types [19]. The expression of the COX-2 protein was strongly upregulated in senescent NHDF compared to young ones. In accordance, PGE₂ production and secretion were about 10-fold higher in senescent fibroblasts than in young ones (Fig. 1A). To reinforce these results, we investigated the expression of COX-2 in another type of fibroblasts, normal human fibroblasts from prostate. As in NHDF, the expression of COX-2 was very low in young cells at 7DP as well as in cells at 27DP, in the middle of the growth phase of the culture, and dramatically increased in cells at the senescence growth plateau. These first results opened the possibility that COX-2 could participate in the occurrence of senescence.

Activating COX-2 endogenous activity accelerates the occurrence of senescence. Inhibiting COX-2 endogenous activity attenuates the senescent phenotype

To establish whether COX-2 activity participates in senescence, we investigated whether activating the endogenous COX-2 in young cells could accelerate the occurrence of senescence. Since it was shown that COX-2 can use exogenous arachidonic acid as substrate and that adding exogenous acid increases PGE₂ production in different cell types [20–24], we cultivated NHDF at 17 population doublings in the presence of 1, 5 or 10 µM arachidonic acid, and we followed the appearance of senescence criteria. Ten micromolar arachidonic acid was slightly toxic and produced a too high quantity of PGE₂ (data not shown). Five micromolar arachidonic acid led to a production of PGE₂ similar to that observed during senescence (Fig. 2D). After 10 days of this treatment, cells acquired some morphological features characteristic of senescent cells: they became slightly enlarged and spread and they lost their organization in connective-like tissue. This morphology then amplified all over the treatment. At the end

of the experiment on day 94, numerous arachidonic acidtreated cells were full of granulations reminiscent of lipofuscine (Fig. 2A). Ten percent of cells began to display SA- β -Gal activity until 10 days of treatment; this percentage then reached about 50% after 40 days of treatment (Fig. 2B). The arachidonic acid treatment also affected the growth of cells, significantly although more slightly than the morphological and β -Gal markers (Fig. 2C). Therefore, enhancing the endogenous COX activity accelerated the occurrence of a phenotype resembling senescence.

We next wanted to determine whether COX-2 activity was necessary for the occurrence of senescence. For that purpose, COX-2 activity was blocked by the specific pharmacological inhibitor NS398 [25] applied to long-term culture of NHDF. The efficacy of NS398 was checked by measuring the PGE₂ secretion (Fig. 6A). NS398 strongly inhibited the appearance of the SA- β -Gal activity (Fig. 3B). It also inhibited the occurrence of the senescence growth plateau, but only in a minor manner, although statistically significant (Fig. 3B).



Fig. 4 – c-Rel overexpression from an adenoviral vector and COX-2 induction. c-Rel, a member of the NF- κ B family was overexpressed in NHDF from an adenoviral vector. Young NHDF from 10 to 20 PDs were infected with AdGFP or AdRel or kept non infected (n.i.), and 48 h later analyzed by immunofluorescence (A) or western blot (B). For the PGE₂ release measure, the culture medium was replaced by fresh one, and 15 h later the quantity of PGE₂ released in the culture medium was measured by an ELISA assay.

COX-2 is also involved in stress-induced premature senescence

Our next concern was to establish whether COX-2 was also involved in stress-induced premature senescence. We previously established that overexpressing c-Rel, a transcription factor of the NF- κ B family, in young epidermal keratinocytes induces a premature senescent phenotype in 2–3 days [7]. We therefore wanted to establish whether overexpressing c-Rel in young NHDF could also induce a premature senescent phenotype and whether it could involve an up-regulation of COX-2. c-Rel was expressed from an adenoviral vector; cells infected with a recombinant adenovirus encoding GFP (AdGFP) and non-infected cells were used as controls. The overexpression of c-Rel was checked by western blots and immunofluorescence experiments 48 h after infection (Fig. 4). We then examined by phase contrast microscopy the morphology of AdRel-infected young NHDF 72 h after infection, and compared it to the morphology of senescent NHDF. Numerous young fibroblasts overexpressing c-Rel lost their fusiform shape and their organization in connective-like



Fig. 5 – Premature senescence induced by c-Rel overexpression. (A) Analysis of cell morphology and SA- β -Gal activity of NHDF overexpressing c-Rel. Young NHDF from 10 to 20 PDs were infected with AdGFP or AdRel or kept non-infected (n.i.). Seventy-two hours after infection, cells were fixed in 3% formaldehyde for microscopic observation and SA- β -Gal assay. Senescent cells from 50 to 60PDs were used for comparison. Note increase in size, spreading and flattening of both c-Rel-overexpressing cells and senescent cells compared to non-infected or AdGFP-infected young cells. Large c-Rel-infected cells and senescent cells display a high SA- β -Gal activity. SA- β -Gal-positive cells were manually counted in duplicate. Bars represent the mean±SD of these two counts. Results are representative of two independent experiments. (B) Analysis of proliferation by BrdU-incorporation assays 48 h after infection. BrdU-positive cells were manually counted in triplicate. Bars represent the mean±SD of these three counts.
tissue to adopt a more bigger and flattened morphology and a more anarchic organization that closely resemble those of senescent cells (Fig. 5A). We also evidenced an SA-β-Gal activity in about 45% of AdRel-infected young NHDF as well as in 45% of senescent NHDF, compared to only 5% of young control NHDF (Fig. 5A). A BrdU-incorporation assay indicated in addition that AdRel-infected young NHDF proliferate twofold less than AdGFP-infected or non-infected cells (Fig. 5B). Therefore, overexpressing c-Rel in young NHDF induces a premature senescent phenotype as in keratinocytes. We next followed the expression of COX-2 in c-Rel expressing cells by western blot; it was greatly increased (Fig. 4B). The PGE₂ production by young c-Rel-overexpressing NHDF reached 300 pg/ml, a concentration 10-fold higher than that of control NHDF (Fig. 4C) that perfectly mimics what is secreted by normal senescent fibroblasts (Fig. 1). Since these results suggested that COX-2 could mediate the c-Rel-induced premature senescence, we blocked this COX-2 activity by NS398. The efficacy of NS398 on the high level of PGE₂ production by c-Rel-overexpressing cells was checked (Fig. 6A). NS398 dramatically reversed the proliferation blockage induced by c-Rel (Fig. 6B) and suppressed the SA-β-Gal activity (Fig. 6C).

A well studied model of stress-induced premature senescence is IMR90 fibroblasts immortalized by human telomerase (hTERT) treated by subtoxic doses of H_2O_2 . Expression of hTERT does not prevent stress-induced senescence but protects from stress-induced apoptosis and necrosis [26]. We evaluated COX-2 relative expression level in these cells by Real-time RT-PCR on mRNA extracted at different times after stress. Compared with control cells, a 2.7- and 2.8-fold increase in the mRNA level of COX-2 was obtained, respectively at 24 and 72 h after stress (Fig. 7A). As shown in Fig. 7B and C, H₂O₂ stress also promoted an important increase of COX-2 protein abundance, starting from a very low basal level. In accordance, the production and extracellular release of PGE₂ increased 2.2-, 9.9- and 4.1-fold at 4, 24 and 72 h after stress, respectively (Fig. 7D). Therefore, this type of stress-induced premature senescence of fibroblasts is also accompanied by an induction of COX-2 expression and activity. We then investigated whether inhibiting this COX-2 activity could attenuate the establishment of H₂O₂-induced premature senescence in IMR-90 hTERT HDFs. Cells were incubated with 10 μ M NS398 before, during and after exposure to H₂O₂. The proportion of SA-β-Gal positive cells at 72 h after stress reached 51% (Fig. 8A). The addition of NS398 significantly attenuated the stress-induced increase of the proportion of SA-B-Gal positive HDFs, which remained at 33%. The proliferative potential was estimated by measuring the level of [³H]-thymidine incorporation into DNA at 72 h after stress. NS398 at 10 µM significantly moderated the sharp decrease of [³H]-thymidine incorporation into DNA observed after exposure to H_2O_2 (Fig. 8B). In complementary experiments, endogenous expression of COX-2 was down-regulated using small interferent RNA (siRNA) specifically targeting COX-2. Using real-time RT-PCR analysis, we confirmed that COX-2 siRNA treatment attenuated H₂O₂-induced COX-2 expression by 66% at 24 hrs after stress (Fig. 9A). Transfected nonsilencing siRNA did not affect COX-2 expression whereas COX-2 siRNA attenuated H_2O_2 -induced SA- β -gal activity (Fig. 9B). In



Fig. 6 – COX-2 participates in c-Rel-induced premature senescence. (A) The efficacy of NS398 on inhibiting COX-2 activity was estimated by measuring the level of PGE₂ release in the culture medium. Eight thousand cells were seeded in 24-well plates, eventually infected with AdGFP or AdRel, and treated or not with NS398. After 48 h the medium was replaced by fresh one and 15 h later the level of PGE₂ was measured by an ELISA assay. Each value represents the mean \pm SD of 8 measures. (B) Effect of COX-2 inhibition on proliferation of c-Rel-expressing cells. Two days after infection by AdGFP or AdRel, BrdU incorporation assays were performed. BrdU-positive cells were manually counted in quadruplicate. Each bar represents the mean \pm SD. (C) Effect of COX-2 inhibition on the appearance of the SA- β -Gal marker both in young infected fibroblasts 2 days after infection, and normal senescent fibroblasts. SA- β -Gal-positive cells were manually counted in triplicate. Each bar represents the mean \pm SD.



Fig. 7 – COX-2 is induced during H_2O_2 -induced premature senescence IMR-90 hTERT HDFs were treated by 200 μ M H_2O_2 . (A) COX-2 mRNA level. Total RNA was extracted at 24 and 72 h after H_2O_2 stress. The GAPDH steady-state mRNA level was used as reference in the real-time RT-PCR. Results are expressed in percentage of the corresponding control as mean ± SD of three independent experiments. (B) The abundance of COX-2 protein was determined by western blotting in control or H_2O_2 -stressed cells at 24, 48 and 72 h after H_2O_2 stress. α -tubulin protein was used as reference level. (C) Fluorescence micrographs of COX-2 immunostaining obtained by semi-quantitative confocal microscopy. COX-2 was detected using a specific anti-COX-2 antibody (green) at 24 h after stress. The nuclei were stained with TO-PRO-3 (blue). (D) Quantitative detection of PGE₂ production: ELISA assays were performed on cell medium collected at various times after H_2O_2 stress in three independent experiments. Each point represents the mean ± SD. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

addition, down-regulation of COX-2 by siRNA prevented partly the stress-induced decrease in proliferative potential (Fig. 9C).

Discussion

We have shown in this work that the production of prostaglandins increases during both normal and stress-induced fibroblast senescence, because of an increase in COX-2 expression, the rate-limiting and inducible enzyme of the prostaglandin biosynthetic pathway. We have evidence to say that this increase in COX-2 activity is causal, at least in part, of fibroblast senescence. First, we show that enhancing the low COX-2 activity of young cells by supplying exogenous arachidonic acid during their culturing accelerates the occurrence of the major senescence markers, i.e. the special enlarged and spread cell morphology, the SA- β -Gal activity, and the growth plateau. Conversely, blocking the endogenous COX-2 activity with the specific inhibitor NS398 decreases the appearance of these markers. Similarly, NF- κ B or H₂O₂ stress-induced senescence is partly abrogated by applying NS398 or siRNA specifically targeting COX-2.

It is noteworthy that the efficacy of both arachidonic acid that enhances the endogenous COXs activities or the NS398 inhibitor and siRNAs is greater on the cell morphology and the SA- β -Gal marker than on the growth arrest. This has also been



Fig. 8 – COX-2 inhibitor NS398 attenuates the establishment of premature senescence in H₂O₂-stressed cells. (A) Effect of 10 μ M NS398 on the percentage of IMR-90 hTERT HDFs positive for SA- β -Gal activity at 72 h after stress with 200 μ M H₂O₂. (B) Effect of 10 μ M NS398 on [³H]-thymidine incorporation of IMR-90 hTERT HDFs 48 h after 200 μ M H₂O₂ stress. Results are expressed as percentages of cpm incorporated by control cells. Results are given as mean±SD from three independent experiments.

observed for other determinants of cell senescence. For instance, TGF- β 1 has been shown to be overexpressed in replicative senescence and in ethanol-, tert-butylhydroperoxide-, H₂O₂- and UVB-induced premature senescence [6,27,28]. As in the present work, it was observed that TGF- β 1 exerts a stronger effect on biomarkers of senescence such as senescent morphology, SA- β -Gal activity and overexpression of senescence-associated genes such as fibronectin, osteonectin and apolipoprotein J, rather than on the cell cycle. The β -Gal activity at pH 6 associated with senescence reflects an increase in the mass of lysosomes [29], and is also induced upon H₂O₂ treatment [30]. Therefore this marker seems relevant to the increase in oxidized macromolecules that the senescent cell have to eliminate. The growth plateau and the irreversible cell-cycle arrest would be, for their part, mainly the result of telomere attrition. Hence, the preferential effect of COX-2 activity blockage on the appearance of the SA- β -gal marker suggests that COX-2 would participate in the induction of senescence by increasing the oxidant status in the cell rather than acting on cell-cycle regulation pathways. As pointed out in the introduction section, interrelations between COX activity and oxidative stress are numerous. We have some preliminary results suggesting that PGE₂ could act on

senescence by affecting the GSH pool. As for the involvement of COX-2 in proliferation, data in the literature are controversial. If COX-2 and prostaglandins were often associated with tumor cell proliferation [31,32], several studies report in contrast a role of COX activity in partly mediating cell-cycle arrest induced in different contexts, by TGF- β for example [33] or associated with senescence [34] as in our present work.

In conclusion, an increase in COX-2 expression and activity might be one of the mechanisms involved in the establish-



Fig. 9 – Down-regulation of COX-2 expression using specific siRNA attenuates the establishment of premature senescence in H₂O₂-stressed cells. (A) Effect of COX-2-specific siRNA on *COX-2* mRNA level. (B) Effect of COX-2-specific siRNA on the percentage of IMR-90 hTERT HDFs positive for SA- β -gal activity at 72 h after stress with 200 μ M H₂O₂. (C) Effect of COX-2-specific siRNA on the incorporation of [³H]-thymidine. The cells were incubated with [³H]-thymidine for 24 h, between the 48th and 72nd hour after stress. Results are expressed as percentages of cpm incorporated by control cells. Results are given as mean ± SD from three independent experiments.

ment of senescence in human fibroblasts. Although established in vitro, these results should be physiologically relevant since they were established with normal fibroblasts issued from three different tissues, skin, prostate and lung. In addition, increases in COX-2 expression and activity have also been associated with aging at the organism level, for example in rat kidney [35,36], rat prostate [37], brain [38,39] and macrophages [40].

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université Lille 1, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Ligue contre le Cancer, the Institut Pasteur de Lille, the Conseil Régional Nord/Pas-de-Calais, the European Regional Development Fund, the Région Wallonne/FSE First-Europe projects "Arrayage", "CosmUV", First-DEI project "Cosmet-X", "Réseaux II, Senegene" and "Nanotoxico". We also thank the European Commission (Geha Project, LSHM-CT-2004-503270; Link-Age Project, LSHM-CT-2005-523866). S. Zdanov is a recipient of the FRIA, Belgium. O. Toussaint and F. Debacq-Chainiaux are respectively Research Assistant and Research Associate of the FNRS, Belgium. K. Gosselin had a fellowship from the Institut Pasteur de Lille and the Région Nord/Pas-de-Calais and from the Société Française du Cancer.

REFERENCES

- J. Campisi, Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism, Trends Cell Biol. 11 (2001) S27–S31.
- [2] V.J. Cristofalo, A. Lorenzini, R.G. Allen, C. Torres, M. Tresini, Replicative senescence: a critical review, Mech. Ageing Dev. 125 (2004) 827–848.
- [3] H. Vaziri, S. Benchimol, 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 (1996) 295–301.
- [4] U.T. Brunk, A. Terman, The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis, Eur. J. Biochem. 269 (2002) 1996–2002.
- [5] I. Ben-Porath, R.A. Weinberg, The signals and pathways activating cellular senescence, Int. J. Biochem. Cell Biol. 37 (2005) 961–976.
- [6] C. Frippiat, Q.M. Chen, S. Zdanov, J.P. Magalhaes, J. Remacle, O. Toussaint, 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 (2001) 2531–2537.
- [7] D. Bernard, K. Gosselin, D. Monte, C. Vercamer, F. Bouali, A. Pourtier, B. Vandenbunder, C. Abbadie, Involvement of Rel/ NF-kappaB transcription factors in keratinocyte senescence, Cancer Res. 64 (2004) 472–481.
- [8] A.C. Lee, B.E. Fenster, H. Ito, K. Takeda, N.S. Bae, T. Hirai, Z.X. Yu, V.J. Ferrans, B.H. Howard, T. Finkel, Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species, J. Biol. Chem. 274 (1999) 7936–7940.
- [9] C.N. Serhan, B. Levy, Success of prostaglandin E2 in structure–function is a challenge for structure-based therapeutics, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 (2003) 8609–8611.

- [10] L.J. Marnett, P. Wlodawer, B. Samuelsson, Co-oxygenation of organic substrates by the prostaglandin synthetase of sheep vesicular gland, J. Biol. Chem. 250 (1975) 8510–8517.
- [11] H.A. Kontos, E.P. Wei, J.T. Povlishock, W.D. Dietrich, C.J. Magiera, E.F. Ellis, Cerebral arteriolar damage by arachidonic acid and prostaglandin G2, Science 209 (1980) 1242–1245.
- [12] R.W. Egan, J. Paxton, F.A. Kuehl Jr., Mechanism for irreversible self-deactivation of prostaglandin synthetase, J. Biol. Chem. 251 (1976) 7329–7335.
- [13] C.L. Yu, C.L. Liu, C.Y. Tsai, K.H. Sun, T.S. Liao, W.M. Lin, H.L. Chen, H.S. Yu, Prostaglandin E2 suppresses phytohemagglutinin-induced immune responses of normal human mononuclear cells by decreasing intracellular glutathione generation, but not due to increased DNA strand breaks or apoptosis, Agents Actions 40 (1993) 191–199.
- [14] J. Atsmon, M.L. Freeman, M.J. Meredith, B.J. Sweetman, L.J. Roberts II, Conjugation of 9-deoxy-delta 9,delta 12(E)-prostaglandin D2 with intracellular glutathione and enhancement of its antiproliferative activity by glutathione depletion, Cancer Res. 50 (1990) 1879–1885.
- [15] R.C. Murphy, S. Zarini, Glutathione adducts of oxyeicosanoids, Prostaglandins Other Lipid Mediators 68-69 (2002) 471–482.
- [16] D. Bernard, D. Monte, B. Vandenbunder, C. Abbadie, The c-Rel transcription factor can both induce and inhibit apoptosis in the same cells via the upregulation of MnSOD, Oncogene 21 (2002) 4392–4402.
- [17] A. Habib, C. Creminon, Y. Frobert, J. Grassi, P. Pradelles, J. Maclouf, Demonstration of an inducible cyclooxygenase in human endothelial cells using antibodies raised against the carboxyl-terminal region of the cyclooxygenase-2, J. Biol. Chem. 268 (1993) 23448–23454.
- [18] G.P. Dimri, X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E.E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, 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.
- [19] H.H. Versteeg, P.M. van Bergen en Henegouwen, S.J. van Deventer, M.P. Peppelenbosch, Cyclooxygenase-dependent signalling: molecular events and consequences, FEBS Lett. 445 (1999) 1–5.
- [20] M. Hughes-Fulford, C.F. Li, J. Boonyaratanakomkit, S. Sayyah, Arachidonic acid activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling and induces gene expression in prostate cancer, Cancer Res. 66 (2006) 1427–1433.
- [21] E. Horia, B.A. Watkins, Comparison of stearidonic acid and alpha-linolenic acid on PGE2 production and COX-2 protein levels in MDA-MB-231 breast cancer cell cultures, J. Nutr. Biochem. 16 (2005) 184–192.
- [22] S.T. Reddy, H.R. Herschman, Ligand-induced prostaglandin synthesis requires expression of the TIS10/PGS-2 prostaglandin synthase gene in murine fibroblasts and macrophages, J. Biol. Chem. 269 (1994) 15473–15480.
- [23] S. Nakatsugi, N. Sugimoto, M. Furukawa, Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on prostaglandin E2 production by cyclooxygenase-2 from endogenous and exogenous arachidonic acid in rat peritoneal macrophages stimulated with lipopolysaccharide, Prostaglandins Leukot. Essent Fatty Acids 55 (1996) 451–457.
- [24] S. Karim, A. Habib, S. Levy-Toledano, J. Maclouf, Cyclooxygenase-1 and-2 of endothelial cells utilize exogenous or endogenous arachidonic acid for transcellular production of thromboxane, J. Biol. Chem. 271 (1996) 12042–12048.
- [25] N. Futaki, S. Takahashi, M. Yokoyama, I. Arai, S. Higuchi, S. Otomo, NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro, Prostaglandins 47 (1994) 55–59.

- [26] V. Gorbunova, A. Seluanov, O.M. Pereira-Smith, Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis, J. Biol. Chem. 277 (2002) 38540–38549.
- [27] T. Pascal, F. Debacq-Chainiaux, A. Chretien, C. Bastin, A.F. Dabee, V. Bertholet, J. Remacle, O. Toussaint, Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays, FEBS Lett. 579 (2005) 3651–3659.
- [28] F. Debacq-Chainiaux, C. Borlon, T. Pascal, V. Royer, F. Eliaers, N. Ninane, G. Carrard, B. Friguet, F. de Longueville, S. Boffe, J. Remacle, O. Toussaint, Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway, J. Cell Sci. 118 (2005) 743–758.
- [29] D.J. Kurz, S. Decary, Y. Hong, J.D. Erusalimsky, Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells, J. Cell Sci. 113 (Pt. 20) (2000) 3613–3622.
- [30] J. Severino, R.G. Allen, S. Balin, A. Balin, V.J. Cristofalo, Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? Exp. Cell Res. 257 (2000) 162–171.
- [31] C. Han, T. Wu, Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 promotes human cholangiocarcinoma cell growth and invasion through EP1 receptor-mediated activation of the epidermal growth factor receptor and Akt, J. Biol. Chem. 280 (2005) 24053–24063.
- [32] D. Wang, F.G. Buchanan, H. Wang, S.K. Dey, R.N. DuBois, Prostaglandin E2 enhances intestinal adenoma growth via activation of the Ras-mitogen-activated protein kinase cascade, Cancer Res. 65 (2005) 1822–1829.
- [33] R.J. McAnulty, N.A. Hernandez-Rodriguez, S.E. Mutsaers, R.K.

Coker, G.J. Laurent, Indomethacin suppresses the anti-proliferative effects of transforming growth factor-beta isoforms on fibroblast cell cultures, Biochem. J. 321 (Pt. 3) (1997) 639–643.

- [34] J.H. Han, M.S. Roh, C.H. Park, K.C. Park, K.H. Cho, K.H. Kim, H.C. Eun, J.H. Chung, Selective COX-2 inhibitor, NS-398, inhibits the replicative senescence of cultured dermal fibroblasts, Mech. Ageing Dev. 125 (2004) 359–366.
- [35] H.Y. Chung, H.J. Kim, K.H. Shim, K.W. Kim, Dietary modulation of prostanoid synthesis in the aging process: role of cyclooxygenase-2, Mech. Ageing Dev. 111 (1999) 97–106.
- [36] H.J. Kim, K.W. Kim, B.P. Yu, H.Y. Chung, The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression: NF-kappaB activation and IkappaBalpha degradation, Free Radical Biol. Med. 28 (2000) 683–692.
- [37] A.F. Badawi, Y. Liu, M.B. Eldeen, W. Morrow, Z.R. Razak, M. Maradeo, M.Z. Badr, Age-associated changes in the expression pattern of cyclooxygenase-2 and related apoptotic markers in the cancer susceptible region of rat prostate, Carcinogenesis 25 (2004) 1681–1688.
- [38] P. Casolini, A. Catalani, A.R. Zuena, L. Angelucci, Inhibition of COX-2 reduces the age-dependent increase of hippocampal inflammatory markers, corticosterone secretion, and behavioral impairments in the rat, J. Neurosci. Res. 68 (2002) 337–343.
- [39] B.S. Baek, J.W. Kim, J.H. Lee, H.J. Kwon, N.D. Kim, H.S. Kang, M.A. Yoo, B.P. Yu, H.Y. Chung, Age-related increase of brain cyclooxygenase activity and dietary modulation of oxidative status, J. Gerontol., Ser. A, Biol. Sci. Med. Sci. 56 (2001) B426–B431.
- [40] D. Wu, S.N. Meydani, Mechanism of age-associated up-regulation in macrophage PGE2 synthesis, Brain Behav. Immun. 18 (2004) 487–494.

c) Données complémentaires : mécanismes d'action de la COX-2 dans le processus de sénescence des fibroblastes

1) COX-2 n'induit pas la sénescence via la production de ROS

Comme il vient d'être présenté, la sénescence des fibroblastes humains résulte, au moins en partie, de l'augmentation de l'expression de la COX-2 et d'une augmentation de 10 fois de la sécrétion de PGE₂ qui atteint des concentrations de l'ordre de 1nM. Nous avons voulu déterminer si la COX-2 induit une sénescence à cause des propriétés particulières des prostaglandines elles-mêmes, ou à cause d'un stress oxydant résultant de la production parallèle de ROS, particulièrement O_2° - et OH°, qui s'opère durant la conversion de l'acide arachidonique en PGH₂ par COX-2. Nous avons donc examiné s'il était possible de retarder la survenue de la sénescence des fibroblastes de derme avec des antioxydants. La culture de fibroblastes en présence de TIRON, ou de Mannitol, des chélateurs d'O₂°- et OH° respectivement, ou de catalase, n'ont eu aucun effet sur la survenue de la sénescence et l'apparition du marqueur SA- β -Gal (figure 16A). Cependant, nous pouvons observer quelques effets sur la morphologie avec la catalase : les cellules sont moins étalées et présentent moins de vacuoles (figure 16B). Ces résultats indiquent que le niveau de ROS, dont ceux engendrés par l'activité de la COX-2, n'est pas la cause majeure de la sénescence des fibroblastes.

2) PGE2 induit la sénescence via un mécanisme autocrine/paracrine

Nous avons ensuite émis l'hypothèse que ce soit les prostaglandines elles-mêmes qui puissent être responsables de l'induction du phénotype sénescent. Nous avons dans un premier temps exploré la voie autocrine/paracrine qui implique les récepteurs membranaires de la famille EP (E prostanoïde), couplés aux protéines-G. Les changements d'expression de ces récepteurs au cours des doublements ont été étudiés par RT-PCR. Ces expressions dans les fibroblastes ont été comparées avec d'autres types de cellules primaires, les kératinocytes et les HUVEC, et aussi avec des Hela. Les quatre récepteurs EP1, 2, 3 et 4 sont exprimés dans les fibroblastes, et sont plus fortement exprimés dans les stades pré-sénescents et sénescents (figure 17). De manière intéressante, le récepteur EP3 n'est exprimé que dans les fibroblastes. Ainsi, la sénescence des fibroblastes est non seulement accompagnée d'une augmentation d'expression de la COX-2 et de la sécrétion de PGE₂, mais aussi d'une augmentation potentielle de leur sensibilité aux prostaglandines.

Nous avons donc étudié ensuite l'effet de l'apport exogène de PGE₂ sur la sénescence des fibroblastes. De jeunes fibroblastes ont été traités avec du PGE₂ à des concentrations de 1 à 100nM. Les cellules acquièrent une morphologie sénescente dès 2 jours de traitement (figure 18A). Leur prolifération est également réduite, même si les différences par rapport au contrôle ne sont pas significatives (figure 18B). Quantitativement, les effets ont été les mêmes quelle que soit la concentration et donc maximum dès 1nM, une concentration compatible avec un effet autocrine/paracrine. Ces résultats suggèrent que PGE₂ pourrait participer à l'induction de la

sénescence par un mécanisme autocrine/paracrine. Cependant, le phénotype induit étant relativement discret, d'autres mécanismes intracrines pourraient coexister.

3) PGE2 induit la sénescence également via un mécanisme intracrine

Afin d'éclaircir le rôle potentiel de voies intracrines, nous avons établi un protocole qui favorise l'import du PGE₂ exogène dans la cellule. En effet, bien que le PGE₂ soit sécrété à travers la membrane plasmique par diffusion passive, son import *via* la diffusion passive est très inefficace. Cependant, il peut être importé *via* un échangeur lactacte/prostaglandine, le PGT (Chan et al., 2002). Nous avons montré par RT-PCR que cet échangeur est exprimé à un niveau constant dans les fibroblastes (figure 17). Nous avons donc ensuite traité les fibroblastes avec 1 à 100nM de PGE₂ en présence de glucose 25mM, une source d'énergie qui favorise la glycolyse et la fermentation, et donc ainsi le fonctionnement de l'échangeur. Nous avons observé que PGE₂ induit une sénescence prématurée avec une morphologie typique (figure 19A), une augmentation du pourcentage des cellules exprimant p16 dans le noyau (figure 19B), et une inhibition de la prolifération, avec toutes les concentrations (figure 19C), et ce avec ou sans glucose, mais avec un effet toujours plus marqué en présence de glucose. L'effet maximal est atteint à 100nM, avec ou sans glucose. A 10nM, l'effet maximal est aussi atteint en présence de glucose mais est beaucouip plus faible en absence de glucose. Ces résultats indiquent donc que les effets observés sur la sénescence sont essentiellement le résultat d'un mécanisme intracrine.

4) Les prostaglandines induisent une sénescence par déplétion du stock de GSH

Nous avons ensuite voulu déterminer comment PGE₂ agissait dans la cellule. Il a été montré que PGE₂ pouvait diminuer le stock en GSH (Yu et al., 1993). Nous avons donc investigué le rôle de la concentration en GSH dans la sénescence induite par les prostaglandines. Nous avons pour cela traité des cellules avec PGE₂ et rajouté du GSH afin de déterminer si cela pouvait empêcher la survenue de la sénescence induite par PGE₂. En présence de GSH, les changements morphologiques (figure 20A), et l'apparition du marqueur SA-β-gal induits par PGE2 sont inhibés (figure 20B). La diminution du nombre de doublements est également contrecarrée, même si l'effet n'est pas significatif (figure 20C). Sachant que GSH est l'un des tampons redox majeurs de la cellule, sa déplétion en présence de PGE₂ devrait créer un stress oxydant responsable du phénotype sénescent. Afin de tester cette hypothèse, nous avons suivi la sénescence normale en présence de GSH. Des fibroblastes pré-sénescents ont été traités avec du GSH 2,5mM jusqu'à la sénescence. Les cellules traitées avec GSH atteignent le plateau de sénescence légèrement, mais significativement, plus tard que les cellules contrôle (figure 21A) et l'activité SA-β-Gal est en partie évitée (figure 21B).

d) Conclusion et discussion

Ainsi, la sénescence induite par un stress, par c-Rel, mais aussi la sénescence normale des fibroblastes est en partie le résultat d'une augmentation d'expression de la COX-2. Le PGE₂ produit suite à cette augmentation agit de manière auto/paracrine, et surtout de manière intracrine, pour induire la sénescence des fibroblastes. Nous montrons également qu'une des cibles intracellulaires des prostaglandines pourrait être le glutathion. La déplétion du stock de glutathion par les prostaglandines pourrait contribuer à l'établissement du plateau de sénescence.

Ce mécanisme que nous avons établi *in vitro* avec des fibroblastes normaux issus de trois tissus différents (la peau, la prostate et le poumon) pourrait être relevant de ce qui se passe *in vivo*. En effet, une augmentation de l'expression et de l'activité COX-2 est décrite dans l'organisme vieillissant, par exemple au niveau du rein (Chung et al., 1999; Kim et al., 2000), de la prostate (Badawi et al., 2004), du cerveau (Casolini et al., 2002) et dans les macrophages chez le rat (Wu & Meydani, 2004).



Α.



Figure 16 : Les antioxydants ne retardent pas la survenue de la sénescence des fibroblastes

Les fibroblastes ont été traités toutes les 48h avec des chélateurs d'anions superoxydes ou de radicaux hydroxyl, le Tiron (100µM) et le Mannitol (10mM) respectivement, ou avec de la catalase (100U/mL) qui dégrade H₂O₂. Les expériences ont été réalisées en triplicata. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types. (A) Courbes de croissance. (B) Morphologie des cellules traitées avec la catalase au plateau de sénescence.



Figure 17 : <u>Expression des ARNm des récepteurs membranaires aux prostaglandines couplés aux protéine-G</u> DP = doublement de population ; J= jeune ; S = Sénescent



в



Figure 18 : Le PGE2 induit une sénescence prématurée via la voie para/autocrine.

Des fibroblastes jeunes ont été traités avec du PGE₂ à 1, 10, et 100nM, ou non traités pour les contrôles. (A) Morphologie des cellules après 2 et 6 jours de traitement. (B) Nombre de doublements effectués après 5 et 8 jours de traitement.

56



Figure 19 : Le PGE2 induit la sénescence prématurée via la voie intracrine.

Les fibroblastes jeunes ont été traités avec différentes concentrations de PGE₂. Afin de favoriser l'entrée de PGE2 via le PGT dans les cellules, ces dernières ont été traitées avec du glucose 25mM, ou sans glucose pour les cellules contrôle. (A) Morphologie des cellules après 48h de traitement. (B) Après immunomarquage avec un anticorps anti-p16, le pourcentage (%) de noyaux présentant un marquage p16 a été calculé après 48h. (C) Nombre de doublements effectués après 48h. Pour (A) et (B) chaque barre représente la moyenne +/- l'écart-type calculé sur 3 échantillons (*** valeur p< 0.01 ; la valeur p est calculé avec le test de student).



Figure 20 : Le GSH inhibe la sénescence des fibroblastes induite par PGE₂

De jeunes fibroblastes ont été traités avec PGE₂ en présence ou non de GSH à 2,5mM. Le phénotype des cellules a été suivi au microscope de contraste de phase. Un test SA-β-Gal a été réalisé et le nombre de doublement effectués calculé après 48h de traitement. (A) Observation de la morphologie des cellules au microscope à contraste de phase. (B) Pourcentage de cellules SA-β-gal positives. (C) Nombre de doublements de population.



Figure 21 : Le GSH retarde la sénescence normale des fibroblastes

Des fibroblastes pré-sénescents à 45 doublements de population ont été traités avec du GSH 2,5mM jusqu'au plateau de sénescence. (A) Courbe de croissance des fibroblastes traités ou non avec GSH. (B) Pourcentage de cellules SA-β-gal positives.

2. LA MORT DES CELLULES SENESCENTES

2.1. Introduction

Une fois l'état sénescent atteint, les cellules se maintiennent au plateau un certain temps, puis meurent. Cette mort intervient plus ou moins tardivement selon le type cellulaire, après des mois pour les fibroblastes, ou après seulement 1 à 2 semaines pour les kératinocytes d'épiderme ou les cellules épithéliales mammaires. Peu d'études ont permis de déterminer clairement le mécanisme de mort des cellules sénescentes, et les quelques données disponibles sont parfois contradictoires. Une mort par apoptose est décrite dans les cellules endothéliales humaines de veine ombilicale (HUVEC) sénescentes (Unterluggauer et al., 2003). Dans les fibroblastes, une augmentation du pourcentage de cellules apoptotiques avec la sénescence a été rapportée (Mammone et al., 2006). Cependant, de manière contradictoire, il est connu que les cellules sénescentes sont résistantes aux différents stimuli apoptotiques (Marcotte et al., 2004; Wang, 1995). Au laboratoire notamment, nous avons montré que la résistance des kératinocytes sénescents à l'apoptose leur était conférée par l'augmentation d'expression des facteurs Rel/NF- κ B et l'induction de la MnSOD (Bernard et al., 2004; Bernard et al., 2001b). De la même manière qu'un échappement à l'apoptose contribue à la tumorigenèse, un échappement au processus de mort des cellules sénescences pourrait permettre une évolution néoplasique. Nous nous sommes donc intéressés au processus de mort des kératinocytes sénescents.

2.2. Résultats sur le mécanisme de mort des kératinocytes

Lors de la mort des kératinocytes, aucun marqueur d'apoptose n'a pu être mis en évidence : la caspase-3 n'est pas activée, AIF et le cytochrome C ne sont pas relargués des mitochondries, et la morphologie des cellules sénescentes mourantes est complètement différente de celle de cellules apoptotiques. De plus, l'application d'un inhibiteur d'apoptose (le zVAD) ne retarde pas la mort des cellules sénescentes. Il s'avère que les kératinocytes sénescents meurent par un autre processus de mort programmée : l'autophagie. L'observation au microscope électronique à transmission révèle l'apparition de vacuoles autophagiques au cours de la sénescence, et l'accumulation de cellules mourantes présentant une aire centrale délimitée par une cage de kératine où se retrouvent concentrées les vacuoles autophagiques, la plupart des mitochondries et le noyau. Les vacuoles autophagiques contiennent des débris, souvent membranaires. Le noyau est bien souvent déformé, et la chromatine souvent altérée. L'utilisation de sondes spécifiques des compartiments acides, le lysotracker ou la monodansyl cadavérine (MDC), nous a permis de mettre en évidence une augmentation de l'activité lysosomiale au cours de la sénescence. Le marquage en parallèle des mitochondries avec une sonde spécifique, le mitotracker, révèle la présence de nombreuses mitochondries à proximité des lysosomes et agrégées autour du noyau. Nous décrivons également l'augmentation d'expression de marqueurs associés à l'autophagie, Beclin-1 et Lamp-1, et la diminution de l'expression de Bcl-2, un inhibiteur de Beclin-1. Enfin, l'application d'un inhibiteur de la formation initiale des autophagosomes, le 3-methyladénine, retarde la mort des cellules sénescentes, tandis que l'utilisation d'un inhibiteur des pompes à protons, la Bafilomycine, qui diminue l'activité de dégradation dans les lysosomes, entraine l'accumulation de cadavres cellulaires complètement encombrés de vacuoles autophagiques.

L'ensemble de ces résultats permettent de proposer qu'une activation massive du processus de macro-autophagie dans les cellules sénescentes conduit à la dégradation de nombreux constituants cellulaires vitaux, notamment les mitochondries et le noyau, et à la mort des cellules. Ces résultats sont développés dans l'article qui suit, accepté pour publication dans American Journal of Pathology.

Article 3: « Senescent keratinocytes die by autophagic programmed cell death »

Senescent keratinocytes die by autophagic programmed cell death

GOSSELIN Karo¹, DERUY Emeric¹, MARTIEN Sébastien¹, VERCAMER Chantal¹, BOUALI Fatima¹, DUJARDIN Thibault¹, SLOMIANNY Christian², HOUEL-RENAULT Ludivine¹, CHELLI Fazia¹, De LAUNOIT Yvan¹, and ABBADIE Corinne¹*

¹UMR8161 Institut de Biologie de Lille, CNRS/Universités Lille1 et Lille2/Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr. Calmette, 59021 Lille Cedex, France

²INSERM U800 Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Université Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

*Corresponding author. Mailing address: UMR8161, Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Pr. Calmette, BP 447, 59021 Lille Cedex, France. Phone: 33-3-20-87-11-02. Fax: 33-3-20-87-11-11. E-mail: <u>corinne.abbadie@ibl.fr</u>

Running title: Senescent cell death

Key words: apoptosis, autophagy, senescence

Abstract

Senescence is the state reached by normal cells after a certain time and a certain number of divisions, leading ultimately to cell death. Although escape from this fate may be a requisite step in neoplastic transformation, how senescent cells die has never been investigated. We show here, using normal human epidermal keratinocytes, that no apoptosis markers appear with senescence. In contrast, the expression of several proteins involved in the regulation of macroautophagy, notably Beclin-1 and Bcl-2, was found to change with senescence. The corpses occurring at the senescence growth plateau displayed a large central area delimited by the cytokeratin network and containing a huge quantity of autophagic vacuoles, the damaged nucleus, and most mitochondria. 3-Methyladenine, an inhibitor of autophagosome formation, but not the caspase inhibitor zVAD, prevented senescent-cell death. We conclude that senescent cells do not die by apoptosis, but as a result of high macroautophagic activity targeting the main vital cell components.

Introduction

Senescence is described as a tumour suppressor mechanism that limits proliferation of altered cells ¹. It occurs *in vivo* with advancing age as well as in culture, because of both telomere erosion and increasing oxidative damage ². Despite these alterations, senescent cells are not dead cells: they maintain a metabolic activity, different from that of young cells ³; they remain in this state for a while, and finally die. Although escape from this fate could be a requisite step in neoplastic transformation, how cells die once they have become senescent has not been much investigated, and the results remain controversial.

Cell death can occur accidentally, in response to an insult, or as the result of a genetic program, activated for example during development or in response to a specific signal. Death following senescence fits with the definition of programmed cell death, because (i) it is timescheduled and (ii) senescent cells express a genetic program different from that of young cells ⁴⁻¹¹. Two main types of programmed cell death have been described: apoptosis (type I), and autophagic programmed cell death (type II). Apoptosis involves characteristic morphological and biochemical changes, including cytoplasmic and nuclear condensation, blebbing, chromatin condensation, oligonucleosomal DNA degradation, and final cell fragmentation into apoptotic bodies. Apoptosis is attributed mainly to caspase activation 12 . Autophagic programmed cell death is accompanied by an increase in macroautophagic activity and is believed to occur through the ensuing degradation of many vital cell components ^{13,14}. The macroautophagic process starts with sequestration of a damaged cell component by a double membrane whose origin is controversial ¹⁵⁻¹⁷. The autophagosome resulting from closure of this membrane then fuses with lysosomes to form an autophagolysosome, inside which the sequestered material is degraded by hydrolytic enzymes at acidic pH. The formation and migration of all these vesicles are orchestrated by about 30 Atg genes ^{17,18} and depend on the integrity of the cytoskeleton, which is in contrast degraded during apoptosis ¹⁹. Caspase

activation is not required ²⁰ and may even inhibit the autophagic pathway ²¹. Necrosis, although originally described as the process of accidental cell death, might be partly programmed. It is defined as a type of cell death lacking the characteristics of apoptosis and autophagy, and both its cellular manifestations and its molecular pathways are poorly described. It is generally recognized, however, that necrosis involves early plasma membrane lysis, organelle swelling and lysis, and some vacuolization ^{22,23}. The purpose of this study was therefore to establish whether senescent cells die by apoptosis, autophagic programmed cell death, necrosis, or some other undescribed or mixed type of cell death. Throughout this text, we use the expression *senescent-cell death* to refer to the mechanism of death following senescence.

Results

Kinetics of senescence and senescent-cell death

We first investigated the kinetics of senescence and senescent-cell death in two normal human cell types, dermal fibroblasts (NHDFs) and epidermal keratinocytes (NHEKs). Fibroblasts are the most commonly used cell type in senescence studies; keratinocytes are more relevant to tumourigenesis studies. We have used fibroblasts from three and keratinocytes from six different donors, all female, of different ages and races. Dermal fibroblasts grew for 50-60 PDs, according to the donor, and then reached a senescence growth plateau where they remained for several months, suggesting that the level and speed of cell death in this cell type were very low (data not shown). In contrast, keratinocytes reached a senescence growth plateau after only 15-25 PDs (according to the donor); this plateau lasted only a few days to 2-3 weeks (according to the donor), and then almost all cells apparently died massively and detached from the dish, while a few clones of partly transformed cells emerged (Fig.1A). Since the death of senescent keratinocytes was more massive and rapid than that of fibroblasts, and since emergence, possibly resulting from senescent-cell escape from death, was observed only with keratinocytes, we subsequently focused our studies on senescent-keratinocyte death.

Keratinocytes at the growth plateau displayed all the characteristics of senescent cells: senescence-associated β -galactosidase activity at pH 6 (Fig.1B), upregulation of the CKI p16^{INK4} (Fig.1C and supplemental Fig.S1 at http://ajp.amjpathol.org), a 5- to 100-fold larger size than young cells, numerous dense particles (probably damaged components), and several vacuole-like structures of different sizes (Fig.1D). After Hoechst staining, their nuclei often appeared bigger than those of young cells, and about 20% of the cells were polynucleated (Fig.1D). Flow cytometry analysis of forward and side scatter factors, i.e. size and granularity respectively, revealed dramatic changes in the cell population at the senescence plateau, with a global increase of these two parameters, a great variability within the population regarding these two parameters, and the appearance of a subpopulation of smaller cells with a high granularity, probably corpses (Fig.1E).

Morphological and kinetic features of senescent-keratinocyte death

We then performed a more specific kinetic analysis of keratinocyte death by recording all types of cell death using Annexin-V/propidium iodide (AnV/PI) assays. Annexin-V is an appropriate marker of any type of cell death -apoptosis, autophagy, or necrosis- because cells undergoing either apoptosis ²⁴ or autophagy ²⁵ have been shown to externalize phosphatidylserines and because corpses generated by any mechanism ultimately lose their plasma membrane integrity. PI staining similarly reveals cells having lost their membrane integrity.

We first used flow cytometry to quantify AnV- and PI-positive cells in the whole population as the number of population doublings increased. The results revealed from the presenescent stage onward a general shift of the population toward an increase in AnV/PI staining, with the formation of three subpopulations (Fig.2A and B). The first one is positive for both markers. It is composed of the smaller cells with high granularity, proving they are corpses. The second subpopulation is composed of AnV-negative/PI-positive cells. As the preceding ones, these cells are generally small and have a high granularity. They are therefore also corpses. The third subpopulation consisted of AnV-positive but PI-negative cells and can therefore be classified as dying cells. They are found in all the range of size and granularity but mostly among the largest cells. At the senescence plateau, the proportion of dying and dead cells reached almost 20% of the total population (Fig.2C). We then examined more precisely the morphology of the AnV-positive cells at the senescence plateau by a microscopic analysis. For comparison with the morphology of typical apoptotic cells, keratinocytes in the growth phase were treated with $TNF\alpha+CHX$. These cells appeared stained at the level of the plasma membrane as expected, whereas untreated cells were negative (Fig.3A). At the senescence plateau, the AnV-positive cells typically display the morphology of senescent cells. Some diffuse Annexin-V staining was observable in their cytoplasm, but the highest staining localized to a central area that always contained a damaged nucleus and various other altered components (Fig.3A). The intracellular nature of this staining suggests that these senescent cells have their membrane permeabilized. PI staining confirmed the permeabilized state of the membrane in these large, flat senescent cells (Fig.3B), confirming they were dying, although they were still adherent. Among cells at the senescent plateau, corpses, identified by their small size and high density, also displayed some staining delineating a central area, and some more diffuse staining of the remaining cytoplasm (Fig.3A).

To evaluate the kinetics of the death process at the single-cell level, we used timelapse phase-contrast videomicroscopy. Pictures (Fig.4 and supplemental video) clearly revealed typical senescent cells with a damaged nucleus evolving through progressive encircling of the nucleus by refringent components. Cells in this state progressively detached from the others, acquired a rounded shape, but remained attached to the dish and continued to move randomly for several tens of hours. Cells undergoing this process were found to secrete big, dense particles repeatedly, probably by exocytosis. On the basis of the videomicroscopy analysis, the duration of the death process was estimated at 24 h to a few days.

In conclusion, dying cells and corpses at the senescence plateau appear morphologically different from apoptotic cells and apoptotic bodies, which are characterized by their condensed and fragmented nucleus and cytoplasm. In addition, the slowness of the senescent-cell death process does not fit with the duration of apoptosis, which is generally a few hours. PI-positivity might indicate that senescent cells die by necrosis; but no sign of cell swelling or lysis was observed. The presence of numerous vacuole-like structures in senescing cells is reminiscent, rather, of autophagic cell death.

Inhibiting autophagic cell death, but not apoptosis, decreases the rate of senescent-cell death

To test the hypothesis that the mechanism of senescent-keratinocyte death is autophagy rather than apoptosis, we examined whether inhibitors of apoptosis or autophagy would differentially affect the level or time course of the death process. zVAD-fmk, a pancaspase inhibitor, was used to inhibit apoptosis, and 3-methyladenine (3-MA), an inhibitor of the class III phosphatidylinositol 3-kinase (class III PI3K) complex involved in initial autophagosome formation ²⁶, was used to inhibit autophagy. In a first experiment, zVAD or 3-MA was applied from the beginning and throughout the culture. 3-MA rapidly inhibited cell growth and induced a senescence-like phenotype (data not shown). This unanticipated effect of 3-MA, probably resulting from a lack of damaged component turnover, forced us to settle on a protocol in which the inhibitors tested were applied to pure populations of already senescent cells. For this purpose, NHEKs at the senescence plateau were analysed by flow cytometry according to their forward and side scatter factors. The subpopulation with the highest forward and side scatter factors and the subpopulation with values just below the highest were sorted and plated (Fig.5A). Microscopic observation of the subpopulation with the highest scatter factors revealed that many of these cells were unable to adhere, suggesting that this subpopulation was engaged too far along the death pathway. The subpopulation with slightly lower scatter factors was thus assumed to encompass pre-dying senescent cells suitable for this experiment. Cells of this subpopulation were therefore treated with z-VAD or

3-MA for 5 days, and corpses with the typical central area were counted every day. The percentage of corpses increased with time in control cells and, to the same extent, in z-VADtreated cells. In 3-MA-treated cells it decreased (Fig.5B). These results indicate that senescent-cell death does not occur through a caspase-dependent mechanism but involves a class III PI3K, suggesting that senescent cells do not die by apoptosis but by autophagic cell death. To confirm this conclusion, we examined whether bafilomycin A1, an inhibitor of the H^+ pump that decreases the efficacy of digestion inside autophagolysosomes, could freeze the death process in its last stage. Pre-dying senescent cells were sorted as above and treated with bafilomycin. Corpses with the typical central area rapidly accumulated to a high rate (40%) in bafilomycin-treated cultures (Fig.5C). To make sure this was not due to an inherent toxicity of bafilomycin, we applied bafilomycin under the same conditions to cells in the exponential growth phase and measured toxicity by Trypan blue exclusion: the percentage of Trypan bluepositive cells reached only 23% (See supplemental Fig.S3 at http://ajp.amjpathol.org). In addition to increasing the percentage of corpses, bafilomycin modified their appearance: the central area appeared to be full of very dense, granular material (Fig.5C). Taken together, these experiments indicate that senescent-cell death involves class III PI3K-mediated autophagosome formation and cell component degradation in acidic compartments.

Senescent keratinocytes do not display the hallmarks of apoptosis, but display altered mitochondria and nuclei

To go beyond the above observations suggesting that senescent cells do not die by apoptosis, we checked for any activation of caspase-3, a major actor of apoptosis. Young cells treated with TNF- α or TRAIL plus CHX were used as a positive control. In immunofluorescence experiments with an antibody recognizing the cleaved active form of caspase-3, senescent cells were negative, in contrast to apoptotic cells (Fig.6A). In western

blots produced with extracts of cells harvested at different time points on the senescence plateau, the cleaved active form of caspase-3 was not detected, whereas it was detected in apoptotic control cells (Fig.6B). We also measured cleavage of PARP, a caspase target. Basal-level cleavage of PARP was observed, without any change during senescence (Fig.6B).

Another molecular hallmark of apoptosis is DNA degradation to oligonucleosomelength fragments detectable by the TUNEL assay. Senescent cells with a damaged nucleus were TUNEL-positive, whereas cells with a nucleus still morphologically intact were negative (Fig.7A). Yet as the TUNEL assay detects double-strand breaks specific to apoptosis but also single-strand breaks, we used comet assays to sharpen our analysis. In these assays, DNA fragments migrate out of a permeabilized nucleus in the form of a comet-like tail. At pH=8, free DNA fragments result only from double-strand breaks, while under denaturing conditions (pH>13), they also result from single-strand breaks ²⁷. The analysis of cells at the growth phase and at the senescence plateau confirmed that the percentage of DNA breaks increases with senescence, and showed that breaks at senescence are mainly single-strand ones (Fig.7B). Thus, senescent cells do undergo DNA degradation, but via a non-apoptotic pathway.

We also investigated by immunofluorescence the potential release from mitochondria of cytochrome C and AIF, two markers of the intrinsic apoptotic pathway ²⁸. In cells at the growth phase, cytochrome C localized discreetly to small sticks (the typical appearance of mitochondria). AIF staining was very faint. In cells at the senescence plateau, the number of cytochrome C- and AIF-stained structures dramatically increased, these structures becoming vesicular and clustered in the vicinity of the nucleus. We never observed a clear translocation of cytochrome C or AIF into the cytoplasm or nucleus (Fig.8). These results indicate that senescent cells do display some mitochondrial alterations, but unrelated to apoptosis.

Since one difference between apoptotic and autophagic programmed cell death is the fate of the cytoskeleton ¹⁹, we performed cytokeratin14 detections. In immunofluorescence experiments, the cytokeratin14-network appeared completely preserved, even more developed, in senescent cells than in growing ones, whereas it was completely disintegrated in TNF α +CHX-induced apoptotic control cells (Fig.9).

Senescent keratinocytes display high macroautophagic activity

To more specifically document the likelihood that senescent cells die by autophagic cell death, we investigated different markers of macroautophagy by western blotting, flow cytometry, epifluorescence microscopy, and transmission electron microscopy (TEM). We first examined the expression of Atg6/Beclin-1, a subunit of the class III PI3K complex required for initial autophagosome formation ¹⁷. Protein extracts were made from cells in the growing phase, cells in the presenescent stage, and from a FACS-sorted subpopulation of cells at the senescence plateau with the highest forward and side scatter factors (Fig.10A). We observed an increase in Beclin-1 expression as soon as presenescence (Fig.10B). We also checked Bcl-2, the well-known anti-apoptotic protein, which is also an inhibitor of Beclin-1 ²⁹. Bcl-2 expression dramatically decreased in sorted senescent cells (Fig.10B). We also observed increased expression of LAMP-1, a lysosomal membrane protein, as soon as the presenescent stage (Fig.10B).

We further documented the increase in autophagic activity during senescence by using Lysotracker, a cell-permeant probe that fluoresces in acidic organelles, i.e. lysosomes and autophagolysosomes (but also late endosomes). Cells were stained with Lysotracker and analysed by flow cytometry. The subpopulation with the highest forward and side scatter factors was that with the highest staining, while staining of the subpopulation ranked next on the scatter factor scale was less intensely stained (Fig.10C). Microscopic analysis confirmed

the increase in Lysotracker staining with senescence and highlighted, as expected, a large quantity of small vacuoles (Fig.10D). Similar results were obtained with monodansylcadaverine (MDC) (Fig.10D), also a marker of acidic compartments ^{30,31}.

We finally investigated the fine structure of senescent cells by TEM. NHEKs at the senescence plateau were sorted by FACS according to their forward scatter factor, and the subpopulation with the highest factor was analysed by TEM by comparison with cells in the exponential growth phase. Keratinocytes in the exponential growth phase displayed a normal organization ³² with a typical nucleus, several dispersed organelles, some rare vesicles, and a cytokeratin network (Fig.11a). In contrast, sorted keratinocytes from the growth plateau displayed a highly partitioned substructure, with a cortical and a central area delimited by the cytokeratin network (Fig.11b). The cortical area appeared clear of any organelles, whereas the central area was full of autophagic vacuoles. The autophagic vacuoles generally contained debris, often membranous (Fig.11c and d). They accumulated upon bafilomycin treatment, and after this treatment they contained more debris than in the control situation (See supplemental Fig.S4 at http://ajp.amjpathol.org). The mitochondria were either dispersed in this central area or grouped together in an aggregate clustered with the nucleus (Fig.11b). Some mitochondria were found inside autophagic vacuoles or encircled by a membrane (Fig.11d and e). The nucleus was always found in the central area; it was often distorted and its chromatin often appeared altered (Fig.11b). These TEM observations are in total agreement with the observations made by epifluorescence microscopy with anti-cytokeratine 14 (Fig.9) and with Lysotracker and MDC (Fig.10). Note that the autophagic vacuoles concentrated in the central area of senescent cells might be responsible for the intracellular AnnexinV staining seen in Fig.3, a very recent study having shown that the cytosolic leaflets of endosomes and lysosomes are rich in phosphatidylserine ³³. Taken together, these results indicate that senescence is accompanied by high autophagic activity.

Senescent keratinocytes die as a result of high autophagic degradation of the nucleus and mitochondria

To determine whether this high autophagic activity in senescent keratinocytes might result in their death, we took a closer look at the corpses themselves. We performed triple staining experiments with lysosomal and autophagosomal markers (Lysotracker or antibodies against Atg8/LC3, a protein that associates with the membrane phagosome ³⁴). Hoechst to stain the nucleus, and Mitotracker to stain the mitochondria. The analysis was done by epifluorescence microscopy with a standard microscope or with a microscope equipped with the ApoTome system for optical sectioning. In corpses, the central area appeared Lysotrackerpositive (Fig.12A) and full of numerous Atg8/LC3-positive punctate structures (Fig.12B). It always contained a nucleus, sometimes two or three, that could be pycnotic (Fig; 12A). It also contained almost all the Mitotracker staining, which no longer delineated individual structures identifiable as mitochondria (Fig.12A). These Hoechst and Mitotracker staining patterns suggest that the mitochondria and nuclei were undergoing degradation. In order to further investigate this potential nuclear and mitochondrial degradation, we performed a western-blot analysis of several mitochondrial and nuclear proteins at different stages of the senescent growth plateau and, at the latest stage, in dead floating cells. The results show that the nuclear protein PARP was degraded in cells having reached the senescence plateau, its complete degradation being reached in floating cells. The mitochondrial proteins Bcl-2 and Bid were also completely undetectable in dead floating cells, the disappearance of Bcl2 beginning earlier than that of Bid. These nuclear and mitochondrial protein degradations were specific, since the quantity of cytokeratin14 increased continuously throughout the senescence plateau until the latest stage (Fig.12C). Thus, senescent keratinocytes seem to die through massive and specific autophagic degradation of their vital components, notably their nuclei and mitochondria.

Discussion

Although senescence is a cell state now extensively studied because of its implication in ageing and associated pathologies such as cancer, the final fate of senescent cells, i.e. how they die, has not been clearly established. Here, on the basis of an investigation of several molecular and morphological markers of apoptosis and autophagy, we propose that the main cell death mechanism occurring in senescent keratinocytes is not apoptosis but autophagic cell death. This conclusion would appear to apply to other cell types as well, since we observed increasing vacuole formation in several other senescent epithelial cell types (mammary and prostatic epithelial cells, data not shown) and in dermal fibroblasts (and prostatic fibroblasts, data not shown). Although in our hands the process of senescent fibroblast death seems very slow, a study by another group has confirmed that an increase in subcellular modifications corresponding to autophagy occurs during MRC5 human fibroblast senescence ³⁵.

Autophagy as a cell death mechanism in senescent keratinocytes?

Autophagy plays different, apparently contradictory roles. It is the normal mechanism for the turnover of long-lived proteins and organelles. It is also a survival process induced to enable cells to resist nutrient deprivation, and it can evolve towards cell death when the cytosol and organelles are excessively degraded ³⁶⁻³⁸. The increased autophagic activity we have evidenced in senescent cells might thus play a role other than cell death. What are the arguments in favour of a role of autophagy in the death of senescent keratinocytes?

First of all, we show that when the initial phases of autophagy are blocked with 3methyladenine, the death of senescent cells is delayed. Moreover, if the acidification required for the final degradation of cell components is blocked, autophagic vacuoles full of debris accumulate inside corpses.

Secondly, we show by fluorescence and electron microscopy that dying senescent cells acquire a particular intracellular organization. The cytokeratin network develops and partitions the cell into two main areas, a cortical one devoid of organelles and a central one in which are concentrated a huge quantity of autophagic vacuoles, most of the mitochondria, and the nucleus. We assume that nuclei and mitochondria could be degraded therein. This is supported by the altered morphology of the nuclei and mitochondria in this area, by the level and type of DNA degradation, and by our western-blot analysis showing that numerous mitochondrial and nuclear proteins are lacking in the subpopulation comprising adherent senescent cells and floating dead cells. Autophagic elimination of nuclei has been poorly studied, as regards both its mechanism and its inducers, except in yeast where nuclei appear to be degraded by so-called piecemeal microautophagy ³⁹. The nuclei of senescent cells could be targeted for autophagy because their DNA is broken, since inhibition of DNA-PK, a nuclear kinase involved in DNA-break signalling, sensitizes to autophagy ⁴⁰, suggesting that persistence of damaged DNA can activate the autophagic process. Similarly, both an increase in Beclin-1 expression and an increase in autophagic programmed cell death occur following treatment with the DNA-damaging agent etoposide ⁴¹. Furthermore, DNA damage has been shown to accumulate in cancer cells deficient in autophagy ⁴². The elimination of a large quantity of mitochondria may also be crucial to rendering autophagy lethal. The mitochondria of senescent cells are damaged. This may activate their massive autophagic elimination, as shown in the case of NGF-deprived neurons ⁴³. Surprising is the increased number of mitochondria during senescence despite the damage these organelles undergo. Such an increase has already been documented in MRC5 fibroblasts following H2O2-induced premature senescence ⁴⁴. Also surprising is the lack of cytochrome C and AIF release from the damaged mitochondria. Actually, cytochrome C and AIF are probably released but, as suggested by Lemasters et al.⁴⁵, sequestration of the mitochondria in autophagic vacuoles

would prevent them from diffusing towards the cytosol and nucleus, and hence from exerting their activity as apoptosis-inducing factors.

The last argument concerns Beclin-1 expression. This might be a key determinant of the switch from autophagy as a vital process of cell component turnover to autophagy as a lethal process. Unlike autophagy induced by serum or amino-acid deprivation that involves beclin-1 but without any increase in expression, autophagic programmed cell death induced by etoposide appears to be associated with an increase in Beclin-1 expression ⁴¹. We show here that Beclin-1 expression is induced at the presenescence stage, supporting the notion that autophagic cell death could follow.

A contrario, it has been suggested that senescent cells die because of a decreased ability to digest and evacuate the content of autophagic vacuoles ⁴⁶. Our videomicroscopic recordings and flow cytometric analyses show that senescent cells retract during their death process. If they died because of an inability to evacuate damaged components, they should instead continue to increase in size. Our videomicroscopic recordings also show that dying senescent cells do evacuate some dense material, probably corresponding to the non-degradable content of their autophagolysosomes. This suggests that the autophagic process is functional in senescent cells until late. Moreover, our electron micrographs show that the autophagic vacuoles accumulating in senescent cells are functional, since most of them contain only small pieces of degraded material. In contrast, when the degradation process is blocked with bafilomycin, these vesicles retain more material.

Senescent cells do not die by apoptosis

We additionally show here that senescent cells do not die by apoptosis. This is supported by the morphology of the corpses appearing during senescence, which differ markedly from apoptotic bodies. This is also supported by the lack of several apoptotic markers in senescent cells or corpses observable at the senescence plateau. Furthermore, caspase inhibitors have no effect on the kinetics of senescent-cell death. Our conclusion is entirely consistent with the apoptosis-resistance of senescent cells, an impopular fact that is nevertheless clearly established for several cell types and several apoptosis inducers ^{47,50}. Other groups have examined whether senescent cells die by apoptosis, and conflicting results have been published. In one study, senescent fibroblasts appeared caspase-3 positive, with only 2% of them showing other typical apoptotic changes ⁵¹. In another study comparing endothelial HUVECs with fibroblasts, senescent HUVECs displayed many signs of apoptosis but senescent fibroblasts did not ⁵². The authors associated the death of HUVECs with the generation of oxidative stress during senescence ⁵³ and proposed that fibroblasts do not die by apoptosis because they are more resistant to oxidative stress than HUVECs ⁵⁴. A study focusing on keratinocytes concluded, in accordance with our results, that apoptotic cells are a minority subpopulation and that their number does not change with passaging ⁵⁵.

Implications for ageing and tumourigenesis

An interesting question is whether autophagy is involved in the death of senescent cells *in vivo* during ageing, as it is in culture. The sole established universal marker of senescence, SA-beta-Gal activity ⁵⁶, increases in the course of normal human and mouse ageing ⁵⁶⁻⁵⁹. Since a lysosomal hydrolase has been shown to exert this activity, ⁶⁰, this indicates that the autophagic activity of the cells increases during ageing. Similarly, lipofuscin, the well-known marker of aged skin, has been shown to accumulate with advancing age inside autophagic vacuoles, as an aggregate of proteins having reacted with lipid peroxidation end-products ⁶¹. This also supports the notion that autophagic activity increases with age. Therefore, one might speculate that during ageing, most altered cells might die by autophagy.

Understanding the death pathway of senescent cells may be a key to understanding the relationship between ageing and cancer. It is widely recognized that the appearance of apoptosis resistance is an important event in neoplastic transformation. The same might apply to resistance to autophagic cell death. There is evidence already that autophagy is down-regulated in cancer cells. Beclin-1 is often mono-allelically deleted in various carcinomas ³⁷ and its heterozygous disruption in mice causes spontaneous tumours ^{62,63}. The tumour suppressor PTEN, which rivals p53 as the most frequently mutated gene in human cancer ⁶⁴, promotes autophagy in HT-29 colon cancer cells by blocking the Akt survival pathway, and mutations in PTEN result in inactivation of autophagy and tumour formation ⁶⁵. One might thus speculate that during ageing, some cells escape autophagic cell death to evolve into long-lived transformed cells. Once formed, however, cancer cells might use autophagy in the opposite way, for example to survive under nutrient deprivation resulting from limited angiogenesis ⁶⁶.

Materials and Methods

Cell culture

Normal human epidermal keratinocytes (NHEKs), purchased from Clonetics (CC-2501), were collected from 4 different females of different races and ages. They were grown at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ in KGM-2 BulletKit medium consisting of modified MCBD 153 with 0.15 mM calcium, supplemented with bovine pituitary extract, EGF, insulin, hydrocortisone, transferrin, and epinephrin (CC-3107, Clonetics). Such a serum-free low-calcium medium has been shown to minimize keratinocyte terminal differentiation ⁶⁷. Cells were seeded as recommended by the supplier and splited at 70% confluence. The number of population doublings was calculated at each passage by means of the following equation: PD=ln(number of collected cells/number of plated cells)/ln2. For positive controls of apoptosis, cells were treated for 6 to 18 h with 20 ng/ml TNF α + 10 µg/ml cycloheximide, or 10 ng/ml TRAIL + 10 µg/ml cycloheximide.

Flow cytometry analysis and sorting, Annexin-V/propidium iodide assays

NHEKs were analysed on a Coulter EPICS XL-MCL for their forward and side scatter factors and, according to the experiment, subpopulations with different forward and/or side scatter factors were electrostatically sorted in air. For Annexin-V/propidium iodide staining, cells were processed with an Annexin-V-Alexa 568 kit (Roche, Calbiochem) according to the manufacturer's recommendations. The results were analysed with the WinMDI 2.9 software (http://facs.scripps.edu/software.html). Alternatively Annexin-V/propidium iodide assays were performed with the same kit on cells grown on glass slides.
Videomicroscopy

Time-lapse videomicroscopy was done with a Zeiss Axiovert 100M equipped with a warm stage. Cells were maintained under 5% CO_2 in closed flasks. Images were taken at 15-min intervals for 24 to 48 h.

Immunofluorescence

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS and permeabilized with 0.2% Triton-X100. Slides were incubated with the primary antibody: anti-active caspase-3 (Cell Signaling Technology), anti-keratin 14 (Chemicon International), anti-cytochrome C (Pharmingen), anti-AIF (Chemicon International), or anti-MAPLC3 (Santa-Cruz). They were then washed 3 times with PBS and incubated with the secondary antibody: Rhodamine red-conjugated anti-Mouse IgG or Rhodamine red-conjugated anti-Rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Nuclei were stained with Hoechst 33258 at 1 μ g/ml for 3 min. Slides were analysed with either a Zeiss AxioPlan2 epifluorescence microscope, or a Zeiss Axio Imager Z1-ApoTome epiflurorescence microscope for optical sectioning.

Western blotting

Cells were lysed in the following solution: 27.5 mM Hepes pH 7.6, 1.1 M urea, 0.33 M NaCl, 0.1 M EGTA, 2 mM EDTA, 60 mM KCl, 1 mM DTT, and 1.1% NP40. The total protein concentration was measured with the Bio-Rad protein assay. Proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-C extra, Amersham). Equal loading was checked after Ponceau red staining of the membranes. The primary antibodies used were: anti-active caspase-3 (Cell Signaling Technology), anti-PARP (Alexis Biochemical), anti Bcl-2 (Santa Cruz), anti-keratin-14 (Chemicon International), anti-Beclin-1 (Santa Cruz), anti-Bid (Pharmingen), anti-LAMP1 (Santa Cruz), and anti-actin (Santa-Cruz).

The secondary antibody used was a peroxidase-conjugated rabbit anti-sheep IgG or a peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Peroxidase activity was revealed with an enhanced chemiluminescence kit (Amersham). The films were scanned for quantification with a Syngene Chemi-Genius Bio Imaging System.

TUNEL and Comet assays

The TUNEL assay was performed with the Apoptag Kit (Intergen) according to the manufacturer's recommendations. For comet assays, ten thousands cells were embedded in 80 μ l of 0.5% low-melting-point agarose at 37°C and the suspension was immediately pipetted onto a TREVIGEN Inc. cometslide, which was then placed at 4°C in the dark for at least 30 min. The slides were immersed in prechilled Lysis Solution and left at 4°C for 60 min. They were then left in alkaline solution for 20 min at room temperature in the dark. The migration was carried out at pH=8 or pH>13 in TBE buffer at 1 V/cm for 20 min. Quantitative analysis (%DNA in the comet tail) was performed with the Tritek Comet Score freeware.

Fluorescence staining of mitochondria, lysosomes and autophagic vacuoles

Monodansylcadaverine, Lysotracker green, and Mitotracker red were from Molecular Probes. Living cells were incubated at 37°C with MDC (0.05 mM), Lysotracker green (100 nM), or Mitotracker red (25 nM) added directly to the cell culture medium (respective incubation times: 10 min, 2 h, and 30 min). Nuclei were stained with vital Hoechst 33342 at 1 μ g/ml for 10 min at 37°C.

Transmission electron microscopy

Cell pellets were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4 for at least 30 min at 4°C. After fixation, the specimens were thoroughly washed in 0.1 M

cacodylate buffer and then postfixed with 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h at room temperature, stained *en bloc* with 2% uranyl acetate in distilled water for 15 min, dehydrated in graded acetonitrile, and embedded in Epon. Ultrathin sections (80-100 nm thick) mounted on 150-mesh grids were stained with 2% uranyl acetate solution and Reynolds lead citrate solution 68 . The electron micrographs were taken with a Hitachi H600 electron microscope at 75 kV.

Acknowledgements

We wish to thank Fabrice Nesslany for technical advice on comet assays, Nathalie Jouy at the Service commun de Cytometrie et de Tri cellulaire (IMPRT-IFR114), and Julie Bertout at IBL for FACS facility, Didier Deslee for Videomicroscopy Facility at the Institut Pasteur de Lille Campus, and Albin Pourtier for critical discussions and reading of the manuscript. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université Lille 1, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Ligue contre le Cancer (Comités du Nord et de l'Aisne), the Institut Pasteur de Lille, the Conseil Régional Nord/Pas-de-Calais, and the European Regional Development Fund. KG had a fellowship from the Institut Pasteur de Lille, the Région Nord/Pas-de-Calais and from the Société Française du Cancer. SM has a fellowship from the French Research Ministry and the Fondation pour la Recherche Médicale. ED has a fellowship from the Institut Pasteur de Lille and the Région Nord/Pas-de-Calais.

References

- Campisi J: Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. Trends Cell Biol 2001, 11:S27-31
- Cristofalo VJ, Lorenzini A, Allen RG, Torres C, Tresini M: Replicative senescence: a critical review. Mech Ageing Dev 2004, 125:827-848
- Zwerschke W, Mazurek S, Stockl P, Hutter E, Eigenbrodt E, Jansen-Durr P: Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence. Biochem J 2003, 376:403-411
- Yoon IK, Kim HK, Kim YK, Song IH, Kim W, Kim S, Baek SH, Kim JH, Kim JR: Exploration of replicative senescence-associated genes in human dermal fibroblasts by cDNA microarray technology. Exp Gerontol 2004, 39:1369-1378
- 5. Kang MK, Kameta A, Shin KH, Baluda MA, Kim HR, Park NH: Senescenceassociated genes in normal human oral keratinocytes. Exp Cell Res 2003, 287:272-281
- Linskens MH, Feng J, Andrews WH, Enlow BE, Saati SM, Tonkin LA, Funk WD,
 Villeponteau B: Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display. Nucleic Acids Res 1995, 23:3244-3251.
- Schwarze SR, DePrimo SE, Grabert LM, Fu VX, Brooks JD, Jarrard DF: Novel pathways associated with bypassing cellular senescence in human prostate epithelial cells. J Biol Chem 2002, 277:14877-14883.
- Shelton DN, Chang E, Whittier PS, Choi D, Funk WD: Microarray analysis of replicative senescence. Current Biology 1999, 9:939-945
- 9. Untergasser G, Koch HB, Menssen A, Hermeking H: Characterization of epithelial senescence by serial analysis of gene expression: identification of genes potentially involved in prostate cancer. Cancer Res 2002, 62:6255-6262.

- Benvenuti S, Cramer R, Quinn CC, Bruce J, Zvelebil M, Corless S, Bond J, Yang A, Hockfield S, Burlingame AL, Waterfield MD, Jat PS: Differential proteome analysis of replicative senescence in rat embryo fibroblasts. Mol Cell Proteomics 2002, 1:280-292.
- Dierick JF, Kalume DE, Wenders F, Salmon M, Dieu M, Raes M, Roepstorff P, Toussaint O: Identification of 30 protein species involved in replicative senescence and stress-induced premature senescence. FEBS Lett 2002, 531:499-504.
- 12. Degterev A, Boyce M, Yuan J: A decade of caspases. Oncogene 2003, 22:8543-8567
- Gozuacik D, Kimchi A: Autophagy and cell death. Curr Top Dev Biol 2007, 78:217-245
- Lockshin RA, Zakeri Z: Apoptosis, autophagy, and more. Int J Biochem Cell Biol 2004, 36:2405-2419
- Dunn WA, Jr.: Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. J Cell Biol 1990, 110:1923-1933
- Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhisa T, Ohsumi Y, Yoshimori T: Dissection of autophagosome formation using Apg5deficient mouse embryonic stem cells. J Cell Biol 2001, 152:657-668
- 17. Mizushima N: Autophagy: process and function. Genes Dev 2007, 21:2861-2873
- Xie Z, Klionsky DJ: Autophagosome formation: core machinery and adaptations. Nat Cell Biol 2007, 9:1102-1109
- Bursch W, Hochegger K, Torok L, Marian B, A. E, Schulte-hermann R: Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. J Cell Sci 2000, 113:1189-1198
- 20. Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G: Cell death independent of caspases: a review. Clin Cancer Res 2005, 11:3155-3162

- Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ:
 Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8.
 Science 2004, 304:1500-1502
- Edinger AL, Thompson CB: Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. Curr Opin Cell Biol 2004, 16:663-669
- Golstein P, Kroemer G: Cell death by necrosis: towards a molecular definition. Trends Biochem Sci 2007, 32:37-43
- Kagan VE, Fabisiak JP, Shvedova AA, Tyurina YY, Tyurin VA, Schor NF, Kawai K:
 Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane
 phosphatidylserine during apoptosis. FEBS Lett 2000, 477:1-7
- 25. Petrovski G, Zahuczky G, Katona K, Vereb G, Martinet W, Nemes Z, Bursch W, Fesus L: Clearance of dying autophagic cells of different origin by professional and non-professional phagocytes. Cell Death Differ 2007, 14:1117-1128
- 26. Seglen PO, Gordon PB: 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 1982, 79:1889-1892
- 27. Rojas E, Lopez MC, Valverde M: Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1999, 722:225-254
- Fadeel B, Orrenius S: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. J Intern Med 2005, 258:479-517
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B: Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy.
 Cell 2005, 122:927-939
- 30. Biederbick A, Kern HF, Elsasser HP: Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. Eur J Cell Biol 1995, 66:3-14

- Mizushima N: Methods for monitoring autophagy. Int J Biochem Cell Biol 2004, 36:2491-2502
- 32. Allen DG, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA: Analysis of interleukin-8 release from normal human epidermal keratinocytes exposed to aliphatic hydrocarbons: delivery of hydrocarbons to cell cultures via complexation with alpha-cyclodextrin. Toxicol In Vitro 2001, 15:663-669
- 33. Yeung T, Gilbert GE, Shi J, Silvius J, Kapus A, Grinstein S: Membrane
 phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. Science 2008,
 319:210-213
- 34. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T: LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. Embo J 2000, 19:5720-5728
- 35. Gerland LM, Peyrol S, Lallemand C, Branche R, Magaud JP, Ffrench M: Association of increased autophagic inclusions labeled for beta-galactosidase with fibroblastic aging. Exp Gerontol 2003, 38:887-895
- Clarke PGH: Developmental cell death : morphological diversity and multiple mechanisms. Anat Embryol 1990, 181:195-213
- Gozuacik D, Kimchi A: Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism.
 Oncogene 2004, 23:2891-2906
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ: Autophagy fights disease through cellular self-digestion. Nature 2008, 451:1069-1075
- Roberts P, Moshitch-Moshkovitz S, Kvam E, O'Toole E, Winey M, Goldfarb DS:
 Piecemeal microautophagy of nucleus in Saccharomyces cerevisiae. Mol Biol Cell
 2003, 14:129-141

- 40. Daido S, Yamamoto A, Fujiwara K, Sawaya R, Kondo S, Kondo Y: Inhibition of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit radiosensitizes malignant glioma cells by inducing autophagy. Cancer Res 2005, 65:4368-4375
- Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y: Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. Nat Cell Biol 2004, 6:1221-1228
- 42. Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, White E: Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. Genes Dev 2007, 21:1621-1635
- 43. Kirkland RA, Adibhatla RM, Hatcher JF, Franklin JL: Loss of cardiolipin and mitochondria during programmed neuronal death: evidence of a role for lipid peroxidation and autophagy. Neuroscience 2002, 115:587-602
- 44. Lee HC, Yin PH, Lu CY, Chi CW, Wei YH: Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. Biochem J 2000, 348 Pt 2:425-432
- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B: The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. Biochim Biophys Acta 1998, 1366:177-196
- Brunk UT, Terman A: The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging:
 accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. Eur
 J Biochem 2002, 269:1996-2002
- 47. Wang E: Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress *bcl*2 is involved. Cancer Res 1995, 55:2284-2292

- 48. Seluanov A, Gorbunova V, Falcovitz A, Sigal A, Milyavsky M, Zurer I, Shohat G, Goldfinger N, Rotter V: Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. Mol Cell Biol 2001, 21:1552-1564.
- 49. Spaulding C, Guo W, Effros RB: Resistance to apoptosis in human CD8+ T cells that reach replicative senescence after multiple rounds of antigen-specific proliferation.
 Exp Gerontol 1999, 34:633-644.
- Chaturvedi V, Qin J-Z, Denning MF, Choubey D, Diaz MO, Nickoloff BJ: Apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes. J Biol Chem 1999, 274:23358-23367
- Ohshima S: Apoptosis in stress-induced and spontaneously senescent human fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun 2004, 324:241-246
- 52. Wagner M, Hampel B, Bernhard D, Hala M, Zwerschke W, Jansen-Durr P:
 Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest,
 polyploidization and senescence-associated apoptosis. Exp Gerontol 2001, 36:13271347
- 53. Unterluggauer H, Hampel B, Zwerschke W, Jansen-Durr P: Senescence-associated cell death of human endothelial cells: the role of oxidative stress. Exp Gerontol 2003, 38:1149-1160
- 54. Hampel B, Malisan F, Niederegger H, Testi R, Jansen-Durr P: Differential regulation of apoptotic cell death in senescent human cells. Exp Gerontol 2004, 39:1713-1721
- 55. Norsgaard H, Clark BF, Rattan SI: Distinction between differentiation and senescence and the absence of increased apoptosis in human keratinocytes undergoing cellular aging in vitro. Exp Gerontol 1996, 31:563-570.

- 56. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M, Campisi J: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 1995, 92:9363-9367
- 57. Ding G, Franki N, Kapasi AA, Reddy K, Gibbons N, Singhal PC: Tubular cell senescence and expression of TGF-beta1 and p21(WAF1/CIP1) in tubulointerstitial fibrosis of aging rats. Exp Mol Pathol 2001, 70:43-53
- Martin JA, Buckwalter JA: The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. J Bone Joint Surg Am 2003, 85-A Suppl 2:106-110
- 59. Keyes WM, Wu Y, Vogel H, Guo X, Lowe SW, Mills AA: p63 deficiency activates a program of cellular senescence and leads to accelerated aging. Genes Dev 2005, 19:1986-1999
- 60. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D,
 Hwang ES: Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase.
 Aging Cell 2006, 5:187-195
- 61. Yin D: Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores.Free Radic Biol Med 1996, 21:871-888
- 62. Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N: Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. Proc Natl Acad Sci U S A 2003, 100:15077-15082
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL,
 Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B: Promotion of tumorigenesis by
 heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. J Clin Invest 2003, 112:18091820

- 64. Sansal I, Sellers WR: The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. J Clin Oncol 2004, 22:2954-2963
- 65. Arico S, Petiot A, Bauvy C, Dubbelhuis PF, Meijer AJ, Codogno P, Ogier-Denis E: The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. J Biol Chem 2001, 276:35243-35246
- 66. Hippert MM, O'Toole PS, Thorburn A: Autophagy in cancer: good, bad, or both?Cancer Res 2006, 66:9349-9351
- 67. Boyce ST, Ham RG: Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. J Invest Dermatol 1983, 81:33s-40s.
- Reynolds ES: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 1963, 17:208-212

Figure legends

Figure 1: Growth curve and characteristics of young, senescent, and dying keratinocytes (A) NHEK growth curve under standard conditions. (B) SA-β-Gal assays. SA-β-Gal-positive cells in each phase were counted amongst about a thousand cells in at least 5 microscopic fields. Results are given as means +/-SD of all field counts. The percentages at 18 and 20 PD are statistically different from that at 13 PD (p=6E-07 and p=4E-10), and the percentages at 23 and 25 PD are statistically different from that at 20 PD (p=5E-05 and p=3E-05). (C) Western-blot analysis of the CKI p16^{INK4} level in total cell extracts. Actin was used as a loading control. The quantification of the film is given in supplemental Figure S1 at http://ajp.amjpathol.org. (D) Cells during the exponential growth phase and at the senescence plateau were stained with Hoechst and observed under phase contrast and by epifluorescence microscopy. Senescent keratinocytes display vacuole-like structures of different sizes generally close to the nucleus (red arrows); they are often binucleated (green arrowhead). Bars represent 20 µm. (E) Flow cytometry analysis of the side-scatter (X) and forward-scatter (Y) factors, i.e. granularity and size respectively, of NHEKs during the exponential growth phase and at the senescence plateau. The colours represent the point densities. The two cursers help to see that at the senescent growth plateau the overall population shifts in size and granularity and becomes very heterogeneous. A subpopulation of cells of very low size but high granularity, probably corpses, appears at the senescence plateau. The results from A to E are representative of different experiments performed with cells from 6 different donors.

Figure 2: Flow cytometric analysis of cell death occurrence during NHEK culture

(A) NHEKs grown under standard conditions were analysed by flow cytometry after an increasing number of population doublings for Annexin-V (X) and PI (Y) staining. Colours

represent point densities. Cursors were placed after considering autofluorescence (not shown). Different subpopulations are distinguishable: R1, AnV/PI-negative, i.e. live cells, R2, AnV/PI-positive, i.e. dead cells, R3, AnV-positive but PI-negative, i.e. dying cells, and R4, PI-positive, also dead cells. (B) Forward scatter (Y) and side scatter (X) factors of the four subpopulations R1, R2, R3 and R4. R1 (in green) is the main cell population, with a wide range of forward and side scatter factors, i.e. with a more or less developed senescent phenotype; they are alive. R2 (in red) is a subpopulation with a smaller size and a wide range of granularity; it appears with doubling and consists of corpses. R3 cells (in blue) are found in the whole population and display all sizes and granularities. They are senescent cells in the process of dying. R4 (in pink), like R2, consists of corpses. (C) Proportions of cells in the different subpopulations.

Figure 3: Morphological characteristics of dying and dead cells at the senescence plateau (A) NHEKs at different phases were processed for the Annexin-V assay. As a positive control for apoptosis, keratinocytes in the growth phase were treated with $TNF\alpha+CHX$. Young keratinocytes (a and a') are negative. Young apoptotic keratinocytes (b and b') are stained at the level of the plasma membrane. The senescent keratinocyte (c and c') on the right, but not the senescent keratinocyte on the left, displays some diffuse cytoplasmic staining and some staining inside a central structure (cs) containing a damaged nucleus (n) and various other altered components (ac). The corpse (d and d') also displays some staining of its remaining cytoplasm and of its central structure. Bars represent 20 μ m. (B) NHEKs at presenescence and senescence were processed for propidium iodide staining. Nuclear staining, indicative of nuclear membrane damage, was recorded only in cells at the senescence plateau. Bars represent 30 μ m.

Figure 4 and supplemental video: Time-lapse phase contrast videomicroscopy of senescent cells undergoing death

NHEKs at the senescence plateau were followed by videomicroscopy. Pictures were taken at 15-min intervals for 24 to 48 h. Some images taken at the indicated times were extracted for the figure. The senescent cell that will evolve into a corpse is indicated by a red arrow. Note that the nucleus, at first, seems surrounded by a big structure (conspicuous at 3 h 15). Then the dying cell detaches from the other cells but remains attached to the support for several hours. The dying cell expulses some dense material (green arrowhead) several times in the course of the process.

Figure 5: Inhibition of autophagy, but not of apoptosis, delays senescent cell death

(A) NHEKs at the senescence plateau were analysed by flow cytometry according to their forward-scatter (Y) and side-scatter (X) factors. Two subpopulations were sorted, subpopulation A composed of the 15% of cells with the highest forward and side scatter factors, and subpopulation B with the next-highest scatter-factor values. Sorted cells were plated in 12-well plates at 20,000 cells per well and observed 24 h later under a phase contrast microscope. A lot of non-plated cells were observed in subpopulation A, indicating that it is enriched in dying cells. Therefore subpopulation B, less engaged in the death pathway, was chosen for the experiment. (B) Cells of subpopulation B were continuously treated with 3-MA at 5 mM or with its diluent H₂O as a control or with z-VAD at 20 μ M or its diluent DMSO. The number of typical corpses with a big central vacuole was counted every day under the microscope. The results are means +/- standard deviations of counts in 5 random microscopic fields of each well, each condition being duplicated. (C) Cells of subpopulation B were

treated every 48 h with 5 nM bafilomycin A1 or its diluent DMSO. The number of corpses was counted as above. The photograph represents the morphology of bafilomycin-treated cells after 96 h of treatment. Note the presence of a big central vacuole full of very dense, granular material. P values were calculated with the t-test. * corresponds to p<0.05, ** to p<0.005, and *** to p<0.0005. Those indicated are between 3-MA and control and between bafilomycin and DMSO. The other differences are non-significant. The bar represents 50 μ M in A and 40 μ M in C.

Figure 6: Caspase-3 is not activated in senescent keratinocytes

(A) NHEKs in the growth phase or at the senescence plateau were processed for immunofluorescence with an antibody recognizing the activated form of caspase-3. As a positive control, NHEKs in the growth phase were treated with TNF α +CHX. Neither young nor senescent keratinocytes were positive. In contrast, typical apoptotic cells with condensed and fragmented nuclei were caspase-3 positive (arrow). Bars represent 10 µm. (B) Western blots. Cell extracts were produced with NHEKs in the growth phase and at different time points in the senescence plateau. Extracts of keratinocytes in the growth phase, induced to die by apoptosis with TRAIL+CHX or TNF α +CHX, were used as a positive control.

Figure 7: Senescent keratinocytes display DNA breaks

(A) A TUNEL assay was performed on keratinocytes at the senescence plateau to detect DNA fragmentation. Positive signals were seen only on much-altered nuclei (arrow). Other large nuclei typical of still healthy senescent cells were negative. Bars represent 5 μ m. (B) A comet assay was performed on NHEKs in the growth phase or at the senescence plateau in neutral (pH 8) versus alkaline conditions (pH>13) to detect only single- or single- plus double-strand breaks, respectively. The percentage (%) of DNA in the comet tail was assessed in each

condition. Each bar represents the mean +/- SD of 20 measures. P values were calculated with a t-test.

Figure 8: The mitochondria of senescent keratinocytes are altered but do not release cytochrome C or AIF

NHEKs in the growth phase or at the senescence plateau were processed for immunofluorescence with specific anti-cytochrome C and anti-AIF antibodies. Both signals increase with senescence. The cytochrome C-positive structures change from radiating stick-shaped structures in growth-phase cells (a) to vesicular ones agglutinated in the vicinity of the nucleus in senescent cells (b and b', note that the shown senescent cell contains two pycnotic nuclei). The AIF staining is very faint in young cells (c). It increases greatly in senescent cells; AIF-positive structures are very numerous and agglutinated around the nucleus (d and d', note that the nucleus of the shown senescent cell is very large). Senescent keratinocytes do not show clear translocation of AIF from the nucleus or cytochrome C release into the cytosol (b and d). Bars represent 10 μm.

Figure 9: Fate of the cytoskeleton in senescent keratinocytes

The cytokeratin14 network is preserved during senescent cell death. NHEKs at the senescence plateau were processed for immunofluorescence with a cytokeratine14-specific antibody and compared to NHEKs in the growth phase undergoing apoptosis after TNF α +CHX treatment. The cytokeratin network appears totally preserved, even overdeveloped in senescent cells (arrow) compared to the still-young cells visible in the microscopic field (arrowheads), whereas apoptotic cells, identified by their condensed nuclei (stars), are completely cytokeratin14-negative. Bars represent 10 μ m.

Figure 10: Expression of autophagic markers in senescent and dying keratinocytes

(A) NHEKs at the senescence plateau were analysed by flow cytometry according to their forward scatter (Y) and side scatter (X) factors. The subpopulation (10.9% in red) with the highest forward and side scatter factors was sorted and used for protein extraction (B) Western-blot analysis of the expression of some markers of autophagosomes and lysosomes. Cell extracts were produced with keratinocytes in the growth phase, at the presenescent stage, and with senescent keratinocytes sorted by FACS in A. PCNA was used as a sorting quality control and actin as a loading control. These results are representative of 3 independent experiments performed with cells from 2 different donors. (C) NHEKs at the senescence plateau were stained with Lysotracker and analysed by flow cytometry for their side scatter (X) and forward scatter (Y) factors. Then the staining intensity (FITC-A) in the subpopulation with the highest forward and side scatter factors (blue) was compared with that of the subpopulation ranking just below it in terms of scatter-factor values (green). The results show that the cells with the highest factors are the most Lysotracker-positive. (D) NHEKs in the exponential growth phase and at the senescence plateau were stained with either monodansylcadaverine (MDC) or Lysotracker. The mass of both autophagic vacuoles and lysosomes increases in the large, flat senescent cells (arrowheads). Bars represent 10 µm.

Figure 11: Ultrastructure of dying senescent cells

NHEKs at the senescence plateau were analysed by flow cytometry and sorted according to their forward side factor (not shown). They were then fixed for TEM analysis (a) in parallel with cells in the exponential growth phase (b). (c, d, and e) are high magnifications of sorted senescent cells. N: nucleus, N*: altered nucleus, k: cytokeratin network encircling the nucleus and the autophagic vacuoles, m*: area of altered mitochondria aggregated close to the nucleus, av: autophagic vacuoles full of membranous or non-membranous debris, em: mitochondrion encircled by a membrane.

Figure 12: Corpses degrade their mitochondria and nuclei in a central area full of autophagic vacuoles

(A) Triple staining of a corpse with Lysotracker (green), Hoechst (blue) and Mitotracker (red). The three stains co-localize within a central area that occupies most of the corpse volume. The nucleus appears pycnotic. Bars represent 10 μ m. (B) Corpse immunostained with an antibody against LC3 (pink), co-stained with Hoechst (blue), and analysed by circular dichroism and with the Apotome system. The four images represent one optical section. The central area is full of LC3-positive punctate structures and contains a damaged nucleus. Bars represent 10 μ m. (C) Western blots. Cell extracts were performed with NHEKs in the growth phase and at different time points in the senescence plateau. Last lane: extracts from still-adherent cells plus dead floating cells.



Fig 2





В

Senescence plateau presenescence











В





hrs of treatment



17 kDa

PARP



В





Senescence plateau



Cyt C

AIF







Senescence plateau

Growth phase Lysotracker MDC





В

С







Supplemental Figure S1: Quantification of the western-blot of Fig1C



Supplemental Figure S2: Quantification of the western-blots of Fig10B



Supplemental Figure S3: Toxicity of 3-MA and Bafilomycine

Cells at the exponential growth phase were treated by 3-MA 5mM or its diluent (H2O) or Bafilomycine A1 5nM or its diluent (DMSO). Toxicity was evaluated by counting every day trypan blue-positive cells



Supplemental Figure S4: Bafilomycine induces an accumulation of autophagic vacuoles

Cells at the end of the growth phase were treated or not by Bafilomycin A1 5nM and analyzed by TEM. Bafilomycin-treated cells are full of autophagic vacuoles whose contain numerous various debris. N=nucleus, n=nucleolus.

2.3. Données complémentaires sur le rôle du stress oxydant dans la mort des cellules sénescentes par autophagie

Nous avons voulu déterminer les mécanismes qui menaient à la dégradation massive par macro-autophagie des mitochondries et du noyau dans les cellules sénescentes. Comme il avait été établi au laboratoire que le stress oxydant est l'une des causes principales de la sénescence des kératinocytes, nous avons émis l'hypothèse que ce stress oxydant puisse engendrer des dommages aux mitochondries et au noyau suffisamment importants pour activer leur élimination par macro-autophagie.

a) Les kératinocytes sénescents et mourants présentent des dommages oxydants aux mitochondries et au noyau

Nous avons donc recherché la présence de dommages oxydants mitochondriaux et nucléaires dans les cellules sénescentes et les cadavres cellulaires qui se forment au cours du plateau de sénescence. Nous avons tout d'abord focalisé sur les 8-oxo-dG, la principale base oxydée de l'ADN mitochondrial, nucléaire et du pool de nucléotides libres (Sekiguchi & Tsuzuki, 2002). Les expériences d'immunofluorescence montrent que le nombre de cellules positives pour les 8-oxo-dG augmente de manière très importante au cours de la sénescence des kératinocytes pour atteindre 20%, contre seulement 3% dans les cellules jeunes (figure 22). La fluorescence est localisée au niveau de structures ponctiformes cytoplasmiques principalement regroupées autour du noyau, probablement des mitochondries altérées. On peut également observer de la fluorescence dans des noyaux très altérés. De plus, les structures positives sont souvent regroupées dans une aire centrale, qui correspond à la zone de la cellule ou sont concentrées les vésicules autophagiques. Nous avons également analysé les ponts AIP. La plupart des cellules sénescentes sont positives pour les ponts AIP. Le marquage est principalement localisé dans le noyau mais également dans le cytoplasme au niveau de structures ponctiformes, probablement les mitochondries. Ainsi, le noyau et les mitochondries sont affectés par des dommages oxydants, et ils peuvent être retrouvés dans cet état dans la zone cellulaire ou est concentrée l'activité autophagique, ce qui suggère que leurs dommages oxydants pourraient les cibler pour une dégradation par macro-autophagie.

b) La mort des kératinocytes par autophagie résulte de l'accumulation de dommages oxydants

Afin d'appuyer l'hypothèse que le stress oxydant puisse être à l'origine de la mort par autophagie des kératinocytes sénescents, nous avons généré dans des cellules jeunes un stress oxydant de même nature que celui qui se produit lors de la sénescence et nous avons examiné si cela induisait une mort par autophagie. Ce stress oxydant correspondant à une accumulation de H₂O₂ suite à l'induction de la MnSOD, nous avons tout d'abord surexprimé la MnSOD à l'aide d'un vecteur adénoviral (AdMnSOD) dans des cellules jeunes et nous avons analysé la survenue de la sénescence
et la mort par autophagie. Trois jours après infection, les cellules infectées par AdMnSOD entrent en sénescence prématurée, puis dans les quatre jours qui suivent, des signes d'autophagie apparaissent dans certaines cellules, et des cellules mourantes similaires à celles observées lors de la sénescence normale s'accumulent dans les cultures. Un immuno-marquage de la MnSOD révèle la présence de la MnSOD dans les cellules mourantes, et montre que la plupart des mitochondries exprimant fortement la MnSOD sont incluses dans la zone centrale ou sont concentrées les vésicules autophagiques (figure 23A). De manière similaire aux cellules mourantes normales, ces cellules mourant suite à la surexpression de la MnSOD présentent des membranes altérées comme en témoigne le test annexine-V (figure 23B), et accumulent des dommages oxydants (ponts AIP et 8-oxo-dG) (figures 23C et 23D). Nous avons ensuite réitéré ces expériences, après avoir directement traité des kératinocytes jeunes avec H₂O₂. Une sénescence prématurée, et des signes d'autophagie ont été observés après 3 jours de traitement par 50µM de H₂O₂. Les cellules sénescentes et mourantes suite à ce traitement présentent des marquages Annexine-V et des ponts AIP similaires à ceux observés dans des conditions normales (données non montrées). Nous avons également vérifié que les inhibiteurs pharmacologiques d'autophagie retardaient bien la mort de ces cellules induite en sénescence par H₂O₂ et que, au contraire, un inhibiteur d'apoptose était inefficace (figure 24). Enfin, pour prouver formellement que la mort des cellules sénescentes est activée par le stress oxydant, nous avons examiné si des antioxydants étaient capables de ralentir la mort des cellules sénescentes. Nous avons utilisé la catalase, qui dégrade H₂O₂ en H₂O, et le N-tert-butyl-hydroxylamine (NtBHA) un antioxydant plus général qui cible les mitochondries et réduit le dommage à l'ADN (Atamna et al., 2000). Les antioxydants ont été appliqués sur des cultures enrichies en cellules sénescentes (après tri par cytométrie en flux sur critère de taille), toutes les 24h pendant 5 jours. L'apparition des cellules mourantes s'est trouvée diminuée de 25-30% lors du traitement avec les antioxydants (figure 25). Ces résultats démontrent que les dommages oxydants sont bien impliqués dans l'activation de la mort par autophagie des kératinocytes sénescents.

c) Conclusion et discussion

En conclusion, lors de la sénescence des kératinocytes, l'activation de la voie Rel/NF- κ B>MnSOD>H₂O₂ engendrerait de nombreux dommages oxydants à la cellule, dont des dommages aux mitochondries et à l'ADN. Ces nombreux dommages enclencheraient une importante activité autophagique entrainant la dégradation notamment des mitochondries et du noyau et menant à terme à la mort de la cellule. Plusieurs études ont montré une régulation directe du processus autophagique par les ROS (Chen et al., 2007b; Chen et al., 2008; Scherz-Shouval & Elazar, 2007; Scherz-Shouval et al., 2007a). Il a été notamment rapporté que la protéine Atg4 (autophagy related gene-4), une protéase impliquée dans le processus autophagique, pouvait être régulée directement par H₂O₂ (Scherz-Shouval et al., 2007b).



	% cellules positives pour 8- oxo-dG	% noyaux positifs pour les ponts AIP
Jeune	2.98 +/-1.95	7.19 +/-1.44
Senescent	19.09 +/-6.33 <i>P</i> =0.003	87.72 +/-3.79 <i>P</i> =7.6 ^E -08

Figure 22 : Les mitochondries et le noyau des cellules sénescentes et autophagiques souffrent de stress oxydant.

Des expériences d'immuno-marquage anti-8-oxo-dG et anti-ponts AIP ont été réalisées sur des kératinocytes jeunes et sénescents. Le pourcentage de cellules positives pour 8-oxo-dG et de noyaux positifs pour les ponts AIP sont indiqués. Les valeurs correspondent aux moyennes +/- la déviation standard d'un comptage effectué sur 5 champs aléatoires au microscope. Les valeurs P sont calculées avec le test de student. Les cellules jeunes sont négatives pour 8-oxo-dG et les ponts AIP (A et B). Les cellules sénescentes présentent un marquage différent selon le degré de dommages. Lorsque les cellules sont peu endommagées, le marquage 8-oxo-dG est principalement localisé dans des structures ponctiformes dans le cytoplasme, probablement les mitochondries (C). Lorsque le noyau est endommagé (présence de micronoyaux), les 8-oxo-dG sont localisées dans le noyau et dans des structures ponctiformes cytoplasmiques agrégées à proximité du noyau (E). Lorsque la cellule est mourante, le marquage 8-oxo-dG est localisé dans l'aire centrale où sont concentrées les vésicules autophagiques. Ce marquage concerne le noyau et des structures ponctiformes dans le cytoplasme (G). Les ponts AIP sont retrouvés essentiellement dans le noyau, et dans des structures ponctiformes dans le cytoplasme (D). Lorsque le noyau est localisé dans l'aire centrale ou sont concentrées les vésicules autophagiques, l'aire centrale ou sont concentrées les vésicules autophagiques, le marquage disparait, probablement suite à la dégradation enzymatique des ponts AIP (F and H). La barre représente 10µM.





De jeunes kératinocytes ont été infectés avec un vecteur adénoviral encodant la MnSOD (AdMnSOD) et analysés après 7 à 10 jours. (A) Immuno-marquage de la MnSOD sur les cellules infectées AdMnSOD. L'image montre une cellule mourante avec un marquage MnSOD important. (B) Test Annexine-V sur des cellules infectées. Les deux cellules sénescentes et la cellule mourante montrent un marquage au niveau de membranes intracellulaires. Les barres représentent 20µm dans A et B. (C) Immuno-marquage des 8-oxo-dG et des ponts AIP dans les cellules infectées. Les cellules mourantes sont positives pour ces dommages oxydants au niveau de l'aire centrale où sont concentrées les vésicules autophagiques. Les barres représentent 40µm.





Des kératinocytes à 12 doublements de population ont été traités avec du H_2O_2 50µM jusqu'à induction d'une sénescence prématurée dans 100% des cellules (après 48 h). Les cellules ont ensuite été traitées avec z-VAD (inhibiteur d'apoptose), 3-MA, Bafliomycine (inhibiteurs d'autophagie), DMSO (diluant du z-VAD et de la bafilomycine) ou non traitées pour les cellules contrôles. Après 48h, le traitement H_2O_2 suivi du traitement par les inhibiteurs a été renouvelé. (A) Morphologies des cellules au microscope à contraste de phase. La barre représente 50µm. (B) Le nombre de cellules mourantes présentant une aire centrale réfringente a été compté au microscope à contraste de phase aux temps indiqués. Les résultats correspondent aux moyennes +/- l'écart-type de comptages effectués sur 2 puits de culture, sur 10 champs aléatoires par puits. Les valeurs p sont calculées en utilisant le test de student par rapport aux contrôles respectifs.



Figure 25 : L'inhibition du niveau de stress oxydant retarde la mort des cellules par autophagie.

Des kératinocytes sénescents ont été traités ou non avec des anti-oxydants, NtBHA et catalase toutes les 48h pendant 5 jours. Le nombre de cellules mourantes, caractérisées par la présence d'une aire centrale réfringeante, a été compté au microscope à contraste de phase tous les jours. Les résultats représentent les moyennes +/- l'écart-type de 10 comptages sur des champs aléatoires. La valeur p a été calculée par rapport au contrôle correspondant avec le test de student.

2.4. Données complémentaires sur la mort des fibroblastes sénescents

Le processus de mort des fibroblastes de derme sénescents semble également emprunter la voie autophagique. A la sénescence, nous pouvons observer au microscope à contraste de phase l'apparition de nombreuses vacuoles, probablement autophagiques, et le nombre de cellules présentant une aire centrale concentrant ces vacuoles augmente au cours du temps. Cependant, dans ces cellules où la sénescence s'établit lentement, le processus de mort semble lui aussi très lent. Une fois au plateau de sénescence, les fibroblastes peuvent se maintenir des mois dans cet état sans qu'on puisse constater de réel déclin de la culture (données personnelles non publiées). L'apparition des vacuoles autophagiques se fait lentement dans le temps, et l'apparition de cellules mourantes peut parfois se révéler très tardive dans le plateau de sénescence. Nous avons tenté d'étendre l'étude de la mort par autophagie aux fibroblastes, notamment par l'utilisation des différents inhibiteurs d'autophagie, cependant, ces travaux se sont avérés difficiles à mener de par la lenteur du processus de mort de ces cellules. Cet établissement du processus de mort par autophagie plus lente que dans les kératinocytes pourrait suggérer une accumulation de dégâts oxydants dans les fibroblastes moins importante à la sénescence. Cette hypothèse semble en accord avec les résultats obtenus précédemment sur le rôle du stress oxydant dans la sénescence des fibroblastes, et semble confirmée par le fait que le traitement des fibroblastes avec du H2O2 accélère le processus de mort des fibroblastes (données personnelles non publiées).

3. ROLE DU STRESS OXYDANT DANS LA SENESCENCE ET L'INITIATION TUMORALE DES CELLULES EPITHELIALES

3.1. Les dommages oxydants à l'ADN associés à la sénescence participent à la génération de cellules cancéreuses initiées.

a) Introduction

Les nombreuses études effectuées sur les fibroblastes sénescents ont amené à formuler l'hypothèse selon laquelle la sénescence constituerait une barrière à la tumorigenèse ; elle entraînerait l'arrêt dans le cycle de cellules endommagées et donc potentiellement cancérigènes (Campisi, 2001). Cependant, la situation pourrait être différente pour les kératinocytes d'épiderme humain car à la sénescence ces cellules ne s'arrêtent pas irréversiblement. En effet, après avoir effectué 15-20 doublements de population, ces cellules entrent en sénescence, puis meurent massivement par autophagie, comme montré précédemment. Néanmoins, dans ces cultures de kératinocytes sénescents, nous observons à une fréquence de 10⁻⁴ à 10⁻², et ce de manière systématique et spontannée, l'apparition de clones de cellules capables d'effectuer une dizaine de doublements supplémentaires avant d'entrer dans un second plateau de croissance au cours duquel elles acquièrent un phénotype s'apparentant à la sénescence. A l'issue de ce second plateau, alors que la plupart des cellules meurent, nous pouvons observer une seconde émergence de cellules à la durée de vie allongée, à une fréquence de 10⁻⁶-10⁻⁵. Nous avons baptisé ces cellules ImK (Immortal Keratinocytes) car nous pensions lors de notre première observation qu'elles étaient immortalisées. Nous savons maintenant qu'elles ne le sont pas : elles entrent dans un troisième plateau de sénescence que nous n'avons que très peu caractérisé à ce jour. Cette émergence de cellules à durée de vie allongée à partir de cellules sénescentes infirmant potentiellement le paradigme de sénescence, phénomène suppresseur de tumeur, nous nous sommes attachés à caractériser les propriétés de ces cellules émergentes et les mécanismes à l'origine de leur émergence.

b) Résultats

Les études que nous avons menées nous ont permis de montrer que ce phénomène d'émergence *in vitro* pourrait représenter un modèle d'étude des étapes initiales de la cancérisation des cellules épithéliales. En effet, l'étude des propriétés de ces cellules émergentes nous a permis de montrer qu'elles présentaient des caractéristiques de cellules transformées. Alors qu'à la sénescence nous pouvons observer une augmentation de marqueurs de différenciation comme l'involucrine ou la Kératine-14, l'expression de ces marqueurs est diminuée dans les cellules émergentes. Ces cellules montrent également une diminution de l'expression de la E-Cadhérine, une caractéristique de transformation des cellules épithéliales. Dans plupart des foyers émergents, les cellules présentent une morphologie de cellules épithéliales, mais certains foyers sont constitués de cellules à

morphologie plus transformée, fibroblastoïde, qui se dispersent très rapidement. Ces cellules fibroblastoïdes ne présentent plus aucun marquage Kératine-14 (données personnelles non publiées), suggérant qu'elles ont subi une transition épithélium-mésenchyme, signe d'une évolution cancéreuse plus avancée. La comparaison des transcriptomes de cellules jeunes avec ceux de cellules émergentes nous a permis de mettre en évidence des modifications d'expression de gène à l'émergence. Près de 50% des gènes présentant une modification d'expression dans les cellules émergentes relèvent d'un état transformé. Enfin, ces cellules émergentes semblent prédisposées à évoluer vers un phénotype encore plus transformé. En effet, à l'issue du second plateau, elles peuvent donner naissance aux cellules ImK qui présentent une morphologie transformée, une durée de vie très allongée et de nombreuses aberrations caryotypiques suggérant une instabilité chromosomique. C'est la raison pour laquelle nous avons qualifié les cellules émergentes de « cellules cancéreuses initiées ». La réactivation de l'activité télomérase semble être un élément clé de l'évolution cancéreuse, puisque près de 80% des tumeurs présentent une activité télomérase. Nous avons donc examiné si ces cellules émergente réexprimaient la télomérase. Bien que transformées, ni les cellules émergentes, ni les ImK ne présentent d'augmentation d'activité télomérase, elle est même plus faible que dans les cellules jeunes. Afin de déterminer le caractère tumorigène des cellules émergentes ainsi que des ImK, nous avons réalisé des expériences de tumorigenèse en injectant en sous cutané ces cellules dans des souris nude. Les cellules émergentes et ImK ont formé des lésions métastatiques au niveau de la peau, de type carcinome non mélanocytaire, ainsi que des métastases dans de nombreux autres organes, notamment les poumons et le foie. L'apparition de ces lésions est assez tardive puisqu'elles apparaissent 8 mois après injection. L'analyse anatomo-pathologique de ces tumeurs est actuellement en cours.

Par différentes approches, notamment par videomicroscopie et par l'utilisation de traceurs de filiation cellulaire, nous avons montré que les cellules émergentes proviennent des cellules sénescentes elles-mêmes. Elles sont générées par un processus de mitose atypique, bourgeonnante. Les cellules émergentes se divisent ensuite par un mécanisme de mitose classique. Les kératinocytes sénescents ont donc encore une capacité proliférative. Nous l'avons prouvé en montrant que leurs télomères ne sont que peu raccourcis, que certaines cellules peuvent incorporer la BrdU et que l'activation de p16 est assez faible et revertée dans les cellules émergentes.

Nous avons vu que la sénescence des kératinocytes s'accompagne de l'activation de la voie NF-κB>MnSOD>H₂O₂. Il s'avère que cette voie, de par les dommages oxydants qu'elle entraine, participe également à l'initiation cancéreuse des kératinocytes. En effet, au cours de la sénescence des kératinocytes nous observons l'accumulation de dommages oxydants à l'ADN potentiellement mutagènes: cassures simple-brin et 8-oxo-dG. L'inhibition de cette voie *via* l'ajout d'antioxydants (catalase ou NtBHA), ou d'inhibiteur d'activité NF-κB (sulfasalazine), diminue la fréquence d'émergence. De manière concomitante, la culture en présence de catalase réduit le niveau de cassures simple-brin et de 8-oxo-dG à la sénescence. A l'inverse, le traitement de kératinocytes

jeunes avec H₂O₂ ou la surexpression de la MnSOD à l'aide d'un vecteur adénoviral, induit une sénescence prématurée suivie d'une émergence des cellules.

c) Conclusion et discussion

La sénescence est généralement considérée comme une barrière à la tumorigenèse car elle provoque un arrêt du cycle cellulaire de cellules endommagées et devenues potentiellement cancéreuses. Cependant nous montrons ici que dans les kératinocytes, des cellules transformées et tumorigènes sont capables d'émerger à partir de la sénescence. Nous proposons que ce phénomène d'émergence à partir de la sénescence constitue un modèle *in vitro* de cancérisation des cellules épithéliales à partir de la sénescence. Nous montrons que le stress oxydant associé à la sénescence des kératinocytes joue un rôle essentiel dans l'initiation cancéreuse de ces cellules.

Ces résultats font l'objet d'un article actuellement en révision dans Cancer Research, présenté ci-après.

Article 4: « Senescence-associated oxidative DNA damage promotes the generation of transformed and tumorigenic cells »

Senescence-associated oxidative DNA damage promotes the generation of cancer-initiated cells

Karo GOSSELIN^{\$1}, Sébastien MARTIEN^{\$1}, Albin POURTIER¹, Chantal VERCAMER¹, Peter OSTOICH², Luc MORAT², Laure SABATIER², Laurence DUPREZ³, Claire T'KINT de ROODENBEKE⁴, Eric GILSON⁴, Predrag SLIJEPCEVIC⁵, Marjan ASHTARI⁵, Fazia CHELLI¹, Emeric DERUY¹, Bernard VANDENBUNDER¹, Yvan DE LAUNOIT¹ and Corinne ABBADIE*¹

¹UMR8161 CNRS-Université Lille1-Université Lille2-Institut Pasteur de Lille, Institut de Biologie de Lille, 1 rue Calmette, 59021 Lille Cedex, France.

²Radiobiology and Oncology Unit, CEA Life Science Division, BP6, 92265 Fontenay-aux-Roses, France.

³Laboratoire de Cytogénétique Erasme-ULB-CHU Brugmann, Route de Lennik, 808, 1070 Belgium.

⁴Laboratory of Molecular Biology of the Cell, UMR5239 CNRS, IFR128, Faculté de Médecine Lyon Sud, Université Lyon1, 69495 Pierre Bénite, Lyon, France.

⁵Brunel Institute of Cancer Genetics and Pharmacogenomics, Brunel University, Uxbridge, Middlesex, UB8 3PH, UK.

^{*}Corresponding author. Mailing address: UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, 1 rue Calmette, BP 447, 59021 Lille Cedex, France.

^{\$} KG and SM contributed equally to the work.

Phone: 33-3-20-87-11-02. Fax: 33-3-20-87-11-11. E-mail: corinne.abbadie@ibl.fr

Running title: Senescence and tumourigenesis

Abstract

Studies on human fibroblasts have led to viewing senescence as a barrier against tumourigenesis. Using keratinocytes, we show here that cancer-initiated cells, partially transformed and tumourigenic, systematically and spontaneously emerge from senescent cultures. We demonstrate that these cancer-initiated cells are generated from senescent cells that are still competent for replication, by an unusual budding-mitosis mechanism. We further present data implicating reactive oxygen species that accumulate during senescence as a potential mutagenic motor of this post-senescence emergence. We conclude that senescence and its associated oxidative stress could be a tumour-promoting state for epithelial cells, potentially explaining why the incidence of carcinogenesis dramatically increases with advanced age.

Introduction

Both in vitro and in vivo, as a result of time and cumulative divisions, normal cells enter senescence, characterized by an enlarged morphology accompanied by lipofuscin accumulation and a high β -galactosidase (β -Gal) activity. Senescent cells are cell-cycle arrested and often polynucleated (1-3). It is accepted that senescence results from cumulative oxidative damage and telomere shortening, each probably acting to a different degree according to the proliferation index, cell type, or environmental conditions. Oxidative damage is due mainly to enhanced production of reactive oxygen species (ROS) and concerns all macromolecules. Oxidation of proteins and lipids may explain accumulation of lipofuscin and other damaged components (4, 5), and oxidative DNA damage may be a signal for cell-cycle arrest (6). Telomere shortening is due primarily to the well-described end-replication problem (7), but it is also enhanced by ROS, to which telomeres seem especially sensitive (8, 9). This shortening leads to unstructured and unprotected chromosome ends that either behave like DNA breaks and as signals for cell-cycle arrest or are mis-repaired by end-to-end fusions leading to genomic instability (7, 10). Because of its associated cohort of damage and irreversible cell-cycle arrest, senescence has been viewed as a tumour-suppressing mechanism that stops proliferation of genetically altered cells (11). Consequently it has been assumed that to become tumoural, a cell has to bypass senescence. Yet this assumption is invalidated by *in* vivo evidence that positively links ageing to tumourigenesis: the incidence of carcinomas in humans is 2- to 3-fold higher in the 60-79 age bracket than in the 40-59 age bracket, cancer is frequent in patients suffering from progeroid syndromes (12), and when ageing is delayed by caloric restriction the incidence of cancer decreases (13). Hence, rather than having to be bypassed, senescence might actually precede and sustain tumourigeneis. Perhaps the simplest hypothesis explaining how senescence might sustain tumourigenesis is that some genomic

alterations acquired during senescence are mutagenic and favour evolution towards a transformed state in a very few cells, besides evolution towards cell-cycle arrest and death in all others.

Here, after monitoring long-term cultures of human primary keratinocytes, we report the systematic and spontaneous emergence from senescence of cells displaying some transformed and tumourigenic characteristics, suggesting that senescence could indeed be a tumourpromoting state *per se*. We show that post-senescent emerging cells potentially originate from all initial cells and not from a special subpopulation, and that they have not bypassed senescence but have been formed, on the contrary, through division of cells with already senescent characteristics. We present evidence that the molecular switches necessary for emergence are set during senescence by ROS accumulating with senescence. This supports the view that senescence-associated ROS might be a cause of both senescence, through their deleterious effects, and the emergence of pre-tumoural cells, through their mutagenicity.

Material and methods

Cell culture

NHEKs purchased from Clonetics (CC-2501) were obtained from 8 female donors: 5 Caucasians (aged 60, 31,18, 37, and 19), one Black (aged 33), and one Asian (aged 40). They were grown at 37°C in 5% CO₂ in KGM-2 BulletKit medium consisting of modified MCBD153 with 0.15 mM calcium, supplemented with bovine pituitary extract, EGF, insulin, hydrocortisone, transferrin, and epinephrin (CC-3107, Clonetics). Such a serum-free low-calcium medium has been shown to minimize keratinocyte terminal differentiation (14). Cells were always split at 70% confluence. The number of population doublings was calculated as follows at each passage: PD=ln(number of collected cells/number of plated cells)/ln2. SA- β -Gal assays were performed as described by Dimri (15). Time-lapse phase-contrast videomicroscopy was performed with a Zeiss Axiovert 100M equipped with a warm stage with cells in closed flasks.

Western blotting

Cells were lysed in 27.5 mM Hepes pH 7.6, 1.1 M urea, 0.33 M NaCl, 0.1M EGTA, 2 mM EDTA, 60 mM KCl, 1 mM DTT, and 1.1% NP40. The total protein concentration was measured with the Bio-Rad protein assay. Proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-C extra, Amersham). Equal loading was checked by Ponceau Red staining. Primary antibodies were: mouse anti-rat PCNA (Dako), anti-human involucrin, anti-human cytokeratin14 (Chemicon), anti-human E-cadherin (Transduction Labs), and anti-human actin (Santa-Cruz). The secondary antibody was a peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

Immunofluorescence staining

For 8-oxoG staining, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min at 4°C, dehydrated at -20°C in 70% and 95% methanol for 3 min each followed by 99% methanol for 30 min, rehydrated for 3 min in 95% and 70% methanol at -20°C, and then washed 3 times in PBS. Cells were incubated with a mouse anti-8-oxoG antibody (Trevigen) for 1 h at 37°C, washed 3 times in PBS, and incubated at RT with a Rhodamine Red-conjugated anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Nuclei were stained with 1 μ g/ml Hoechst 33258 for 3 min. Since the antibody recognizes 8-oxoG in both ribo- and deoxyribonucleotides, we performed an RNaseA treatment, which did not affect the percentage of positive cells or the intracellular localization of the signal (data not shown). For cytokeratin14 staining, cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min, rinsed in PBS, and permeabilized in 0.2% Triton X-100 for 15 min at RT. Slides were blocked in 5% defatted milk for 30min and then incubated with the anti-cytokeratin14 antibody (Chemicon International). The secondary antibody was the same as above. Confocal analysis was performed on a Leica SP2 confocal microscope.

Adenoviral vector encoding MnSOD

The human MnSOD cDNA, obtained after retrotranscription, was amplified by PCR and propagated in pcDNA3.1. The cDNA was then digested with EcoRI and inserted into the pAdCMV2 vector at the XbaI sites after filling with Klenow polymerase. Recombinant adenovirus vectors were obtained by homologous recombination in *E. coli* BJ5183 as described previously (16). Viral stocks were amplified after infection of N52.E6 cells (17). Recombinant adenoviruses were purified with the ViraBind Adenovirus purification kit (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA) and titrated with the Adeno-X rapid titer kit (BD Biosciences

Clontech, Palo Alto, CA, USA). Cells were infected by adding virus stocks directly to the culture medium at an input multiplicity of 200 viral particles per cell.

Comet assays

Ten thousand cells were embedded in 80 μ l of 0.5% low-melting-point agarose at 37°C, and the suspension was immediately laid onto a TREVIGEN Inc. cometslide. Agarose was allowed to solidify at 4°C for 30 min. The slides were then immersed in prechilled Lysis Solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton, pH=10) at 4°C for 60 min and equilibrated in the electrophoresis buffer for 20 min at RT. The electrophoresis buffer was either 89 mM Tris base, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH=8 or 300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH=13. Migration was carried out at 1Volt/cm for 20 min. After migration, the slides were neutralized with 0.4 M Tris pH=7.5, and stained with either SYBR Green I (Trevigen) according to the manufacturer's recommendations or propidium iodide (2.5 μ g/mL). Tail moments were analyzed with the Tritek Comet Score freeware.

Results

Keratinocytes spontaneously give rise to transformed and tumourigenic cells in a twostep process

We monitored the behaviour in culture of normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) from 8 female adult donors of different ages and races. Such cells were found first to divide over a period of about 3 weeks, with 15-20 population doublings (PDs) according to the donor, then gradually to reach a plateau. At the plateau, they displayed the characteristics of senescent cells, including increased cell size, polynucleation, accumulation of vacuoles and various damaged components, SA-β-Gal activity, and decreased PCNA expression (Fig.1). After a few days to 3 weeks at this plateau, several clones of small cells appeared spontaneously and systematically in all cultures, whatever the donor, while most senescent cells died. These emerging cells (henceforth called "post-senenescent (PS) emerging cells") were found to have resumed expression of PCNA and to grow again for 5-15 PDs, after which they reached a second plateau and after a while massively died. With 7 donors out of 8, we observed a second emergence. These emerging cells appeared more transformed than the initial post-senescent ones (Fig.1). We first believed these cells were immortalized and named them ImKs for immortal keratinocytes (numbered IMK, IMK2, IMK3... to identify the donor). These cells, however, underwent up to 60 PDs but then stopped and died (data not shown). Neither ImKs nor PS emerging cells showed any resumption of telomerase activity, which was even lower than in young cells (Supplementary Fig.1). We estimated the emergence frequency, i.e. the number of emerging clones generated per cell in a plateau population, by plating plateau cells at low density and counting the emerging clones. Depending on the experiment, the frequency of the first wave of emergence ranged from 10^{-5} to 10^{-2} , and that of second wave of emergence was 10^{-5} - 10^{-4} . These frequencies are

considerably higher than 10^{-7} , the frequency of immortalization of SV40-transformed human fibroblasts (18, 19).

PS emerging cells looked partly transformed, some clones having kept an epithelioid morphology and some having acquired a fibroblastoid morphology associated with a tendency to scatter (Supplementary Fig.2A). To better examine the transformed status of PS emerging cells, we investigated the expression of involucrin and keratin14, two markers of keratinocyte differentiation. Expression of both proteins was found to increase with senescence and to decrease again with emergence (Supplementary Fig.2B). Expression of E-cadherin, a marker of epithelial cell-cell adhesion, was also slightly reduced in PS emerging cells (Supplementary Fig.2C). We then used DNA microarrays to compare the transcriptomes of PS emerging keratinocytes *versus* young keratinocytes. Amongst the 50 most upregulated and the 50 most down-regulated genes in PS emerging cells, 15 turned out to be linked to adhesion or migration, 6 to cytoskeleton structure or dynamics, 9 to senescence, oxidative stress, or DNA damage, 9 to cell cycle progression or cell death, and 10 to diverse cancer-related pathways (Supplementary Table 1). Hence, about 50% of the genes whose expression changes in emerging keratinocytes are relevant to a transformed state.

We also investigated the karyotypic status and tumourigenic potential of emerging cells. PS emerging cells displayed no karyotypic aberrations but ImKs displayed many, mainly translocations (Fig.2). Yet when injected into *nude* mice, both ImKs and PS emerging cells generated some metastatic skin lesions resembling non-melanoma skin carcinomas (Fig.3). Taken together, these results suggest that the cell populations present at both growth plateaus yield partially transformed and moderately tumourigenic emerging cells, with an apparent progression on the pathway to transformation from emergence wave to the next. Postsenescence emerging keratinocytes might thus provide a good model for investigating the earliest steps in the generation of tumour cells.

Post-senescent emerging cells are formed from a few senescent cells by an unusual budding mitosis mechanism

One of our concerns was to elucidate the origin of PS emerging cells. Our first and simplest hypothesis was that they might come from an initial subpopulation of young cells with special properties, such as stem cells or already transformed cells present in the donors despite their healthy status. To test this hypothesis, we performed limited dilutions so as to obtain monoclonal cultures of young NHEKs, which we monitored for senescence and emergence. Emerging clones appeared in about 75% of the cultures (Supplementary Table2), indicating that emerging cells are not the progeny of a restricted initial subpopulation of young cells, but rather that almost all initial young cells have the potential, eventually, to yield emerging cells. This invalidates our initial hypothesis.

Our next hypotheses were that emerging cells might either be produced before and selected at senescence or generated from senescent cells during senescence. To distinguish between these two possibilities we purified senescent cells by FACS from a presenescent population, as the population with the highest forward and scatter factors, i.e. the largest, most granular cells. Sorted cells were again placed in culture and stained with fluorigenic filiation tracers (Vybrant diI or Vybrant CFDA SE). We then monitored the population by phase-contrast microscopy for the appearance of emerging clones, and examined whether these emerging cells were stained by the tracers. Emerging cells arose around some senescent cells after about 1 week of culture, and were indeed stained by the fluorigenic tracers (Supplementary Fig.3), proving that emerging cells are directly generated through division of fully senescent cells.

The fact that senescent cells can divide to give rise to reproliferating cells was surprising, since numerous studies have shown that proliferation of senescent cells is irreversibly impaired by their short telomeres. However, in the case of keratinocytes, it has been shown the telomerase reexpression alone is insufficient to bypass senescence (20), suggesting that telomere length is not a limiting factor in this cell type. To confirm this point, we examined the state of NHEK telomeres at senescence. Southern-blot analysis showed that the average telomere size decreased from about 9 kb in young NHEKs to about 6 kb at senescence. It continued to decrease to about 5 kb in emerging cells (Supplementary Fig.4A). However, teloFISH analysis revealed that most cells at both plateaus still had substantial telomeres on all their chromosomes. Only a minority displayed some chromosomes with very short to undetectable telomeres likely to cause irreversible cell-cycle arrest. Even in ImKs, about 70% of the metaphases displayed detectable telomeres on all chromosomes (Supplementary Fig.4B and C). It thus seems that given their telomere length, senescent NHEKs should still have some proliferation potential.

Senescent cells, including keratinocytes, have also been described as irreversibly arrested through induction of CKIs p16 and p21 (20-22). We therefore used RT-qPCR to assess their expression at transcript level. The levels of p16 and p21 mRNAs were found to increase at both growth plateaus. The upregulation of p16 occurs as soon as the presenescent stage and is moderate; that of p21 occurs later and to a greater level. The levels of both p16 and p21 transcripts decreased again in emerging cells to a level similar to that of young cells. In ImKs in contrast, the expression of p16 was almost abolished. Surprisingly, that of p21 was only slightly reduced (Supplementary Fig.5). Thus, regarding the first plateau, the transcriptional upregulation of p16 and p21 appears only partial and transient.

To confirm the ability of some senescent cells to proliferate, we performed BrdUincorporation assays. As expected, most typical polynucleated senescent cells were BrdUnegative, but some were BrdU-positive (Supplementary Fig.6A). We also treated senescent cultures with colcemid and monitored metaphasic plates. We observed some typical large polynucleated senescent cells with one, sometimes two, interphasic nuclei displaying damaged chromatin but one nucleus in metaphase (Supplementary Fig.6B). Thus, although overall growth of the culture is arrested at the senescence plateau, some senescent cells actually divide.

We next wondered by what cell-division mechanism a senescent cell, very enlarged, spread out, and littered with damaged components, gives rise to small cells with a clear cytoplasm. Careful microscopic examination suggested that senescent cells generate emerging cells by an unusual asymmetric mitosis mechanism, remaining budding yeast cells. First, upon examining trypsin-dissociated FACS-sorted senescent cells by phase-contrast microscopy, we observed large cells with one, two, or three attached buds (Supplementary Fig.7A). Second, in routine cultures in plastic dishes, emerging cells were almost always observed gathered around a large senescent cell, to which some appeared still attached by a pedicle (Supplementary Fig.7B). To formally evidence this attachment, we analyzed by confocal microscopy a cytokeratin14 immunofluorescent staining of an emerging clone in the making around a senescent cell. We thus evidenced in optical transverse sections cytoskeletal continuity between the senescent cell and some surrounding emerging ones (Supplementary Fig.7C). Videomicroscopy provided final proof that emerging cells arise from senescent cells by this budding-mitosis mechanism. Despite the challenge of this investigation due to the low fraction of senescing cells actually producing emerging cells, we finally managed to capture three sequences of images showing two slightly different mechanisms of budding mitosis. In two cases, we observed a large multinucleated senescent cell generating several small daughter cells by budding cytokinesis (data not shown). In the third case we observed a typical senescent cell with already several nuclei, among which three underwent an additional full mitosis generating a daughter cell budding out of the senescent mother (Supplementary Fig.8 and supplementary video).

The NF-κB>MnSOD>H₂O₂ pathway is a causal agent of both senescence and emergence

We have previously shown that NHEK senescence arises in part through the deleterious effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation. This accumulation was shown to result from an imbalanced antioxidant enzyme expression, due to activation of the NF-kB transcription factor inducing upregulation of MnSOD, a mitochondrial enzyme responsible for the dismutation of O_2° to H_2O_2 . Without any co-upregulation of downstream H_2O_2 -degrading enzymes, this MnSOD upregulation leads to H₂O₂ accumulation (23). H₂O₂ being both deleterious and mutagenic, we wondered whether it might generate stochastic mutations statistically rendering some senescent cells competent for emergence. To test this hypothesis, we first investigated whether post-senescence emergence could be mimicked by H_2O_2 treatment. We treated young NHEKs with a dose of H₂O₂ that we previously established as inducing premature senescence (23), monitored the cells until they all displayed the senescent phenotype, then stopped the treatment and waited for potential emergence. Emerging clones did appear about ten days later at a frequency of about 10^{-4} . Emerging cells showed increased PCNA expression, proliferated for an additional 10-15 PDs, and then entered the 2nd growth plateau (Fig.4A). We then examined whether MnSOD overexpression might have the same effect. Young NHEKs were infected with an adenoviral vector encoding MnSOD. A premature senescence phenotype arose after about 3 days, followed 10 days later by emergence. We checked that both senescence and emergence occurred without any change in expression of several other antioxidant enzymes (Fig.4B). Taken together, these results indicate that H_2O_2 accumulation resulting from unbalanced antioxidant enzyme expression can indeed induce a post-senescence emergence similar to the spontaneous one.

To confirm that the NF- κ B>MnSOD>H₂O₂ pathway is a causal pathway of emergence, we examined whether treatment of senescent cells with antioxidants or NF- κ B inhibitors could inhibit emergence. As antioxidant we used catalase, which specifically degrades H₂O₂ to H₂O. We have already shown that exogenously added catalase can delay the senescence growth plateau of keratinocytes (23). We also used N-tert-butyl-hydroxylamine (NtBHA), a more general antioxidant shown to target mitochondria and to reduce nuclear DNA damage (24). To inhibit NF- κ B activity we used sulfazalazine and gliotoxin, two weak inhibitors we had previously shown to delay senescence without inducing massive apoptosis (23). Presenescent cells were seeded into culture plates and treated or not with each of these drugs. A few days later, emerging clones appeared in 85% of the wells containing untreated cells, as compared to 50% of those containing catalase-treated cells, 0% of the wells with (10 μ M) NtBHA-treated cells, and 0% of the wells containing NF- κ B-inhibitor-treated cells (Fig.5). These experiments demonstrate that the NF- κ B>MnSOD>H₂O₂ pathway is sufficient and necessary to induce post-senescence emergence.

To test the hypothesis that H_2O_2 induces emergence through its mutagenicity, we looked for mutagenic oxidative DNA damage in senescent cells and examined whether there was any correlation between the level of damage and treatments mimicking or inhibiting emergence. We first looked for DNA breaks, especially single-strand ones, which are known to be induced by H_2O_2 (25, 26). We used comet assays to distinguish single-strand breaks (SSBs) from double-strand breaks (DSBs). The results show that SSBs were predominant, increasing about 2-fold with senescence and affecting about 20% of the cells. Cells displaying DSBs were rare, even at senescence. H_2O_2 induced a dramatic increase in SSBs but no significant increase in DSBs (Fig.6A). Accordingly, when senescent cells were treated with catalase, the percentage of cells displaying DSBs did not change but the percentage showing SSB decreased (data not shown) and the comet tails formed by the broken DNA were about 2-fold smaller (Fig.6B). H_2O_2 is also known to induce mutagenic oxidation of bases, the most common being formation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG) in nuclear and mitochondrial DNA and in the nucleotide pool (27). We investigated the presence of 8-oxoG by immunofluorescence staining. About 20% of the senescent cells were found to display 8-oxoG, mainly in the cytoplasm, with some signal inside the nucleus, compared to only 3% of young cells (Fig.6C). When cells were treated with catalase, the percentage of affected senescent cells was reduced 4.25-fold (Fig.6C). Conversely, treatment of young cells with H_2O_2 increased the percentage of 8-oxoG-positive cells about 5-fold (Fig.6C). Thus, at least two types of oxidative mutagenic damage, SSBs and 8-oxoG, accumulate during senescence, in correlation with the H_2O_2 level and the frequency of the ensuing emergence.

Discussion

Numerous reports, mainly focusing on human fibroblasts, have described senescence as an irreversible growth arrest associated with telomere shortening. This has led to viewing senescence as a tumour-suppressing phenomenon. Yet human fibroblasts are probably not the most relevant cell model for studying the molecular links between tumourigenesis and ageing, since sarcomas are rare in humans and their incidence does not depend on age (NCI statistics). Epithelial cells, on the other hand, are cell types from which originate various high-incidence carcinomas linked to advanced age (NCI statistics). Using keratinocytes, we show that cells with moderate transformed and tumourigenic characteristics systematically and spontaneously emerge from senescence. Interestingly, we never observed any emergence with dermal fibroblasts (data not shown). We therefore propose this in vitro post-senescence emergence as a model for studying the very first steps of non-melanoma skin carcinogenesis. It is not yet clear whether this model can be generalized to other epithelial cell types. We have observed emergence with epithelial mammary cells, as already described by others (28-30), but these emerging cells never gave rise to a second emergence (data not shown). We have also assayed prostatic epithelial cells, but never observed any emergence under standard culture conditions (data not shown).

It is often assumed that tumoural cells form because they bypass senescence. We show here that emerging cells originate from senescent cells themselves. This indicates that they have not bypassed senescence but have instead passed through and emerged from a senescent stage. We show that senescent cells generate emerging cells via an unusual budding-mitosis mechanism. Senescent cells seem first to undergo multinucleation by a process that remains to be elucidated, and then to give rise over a short time to several small-sized daughter cells, by delayed asymmetric cytokinesis or by an additional asymmetric mitosis. The daughter cells then autonomously proliferate *via* classical mitosis to generate a clone of emerging cells. Although largely ignored by the scientific community, this kind of cell division, specific to senescent or DNA-damaged cells, has already been described by two groups (31, 32) and called "neosis". We highlight here the importance of such a mechanism by showing that cells generated in this way are tumourigenic. We have ruled out the hypothesis that emerging cells might come from an initial subpopulation of special young cells such as stem cells or already transformed cells. On this last point our results are in disagreement with those of Tlsty (33) suggesting, in the case of epithelial mammary cells, that emerging cells come from a subpopulation of cells pre-existing in explants and having a hypermethylated p16 promoter. We show here that in post-senescent emergent keratinocytes, the decrease in p16 expression is moderate and only transient (since p16 is again up-regulated at the second plateau), indicating that epigenetic modification of the p16 promoter is not an obligatory initial step for keratinocyte emergence. Only in ImKs does expression of p16 decrease to a very low level compatible with epigenetic extinction.

Because the transformed and tumourigenic cells that spontaneously emerge from normal primary keratinocytes are generated at two successive stages, and because cells of the first emergence wave are less genetically altered than those of the second, we are prompted to view the first emerging cells as cancer-initiated cells, i.e. cells en route towards tumoural development. Yet these cells can already generate metastatic tumours, no less efficiently than cells of the second emergence wave. It is noteworthy that neither post-senescent emerging cells nor ImKs are immortal, in contrast to the mouse embryonic fibroblasts that spontaneously emerge from senescence to form non-tumourigenic immortal cells (NIH3T3).

Since the free radical theory of ageing was proposed in 1956 (34), a large body of evidence has accumulated on the role of oxidative stress in senescence and ageing. Data on the role of oxidative stress in carcinogenesis are also abundant (35-37). The results presented here suggest a link between these two sets of data, since it appears that the NF- κ B>MnSOD>H₂O₂ oxidative stress pathway can play a causal role in both senescence and emergence. This conclusion is based on the observation that NF- κ B inhibitors and antioxidants delay the occurrence of the senescence plateau and decrease the emergence frequency while, conversely, NF-KB or MnSOD overexpression or H₂O₂ treatment induces premature senescence followed by emergence. We report the presence, in senescent cells, of at least two types of discreet oxidative DNA-damage, SSBs and 8-oxoG, both potentially causing point mutations (27, 38, 39). That they play a causal role in emergence is supported by the consistent correlation between the percentage of cells affected by these types of damage and the emergence frequency: this percentage rises upon H_2O_2 treatment (which triggers a process resembling senescence and emergence), and drops after senescence-delaying antioxidant treatments. Furthermore, the proportion of cells with SSBs and 8-oxoG was always much higher than the proportion of emerging cells, making it statistically possible for these alterations to affect a favourable cocktail of oncogenes, tumour-suppressor genes, and/or other crucial regulators of adhesion, migration, the cell-cycle, or cell death, as suggested by the transcriptomic changes observed in emerging cells. The stochastic nature of the genomic events leading to emergence is supported by the fact that emergence is always multiclonal, each clone having its specificities as regards morphology, doubling time, and life span (data not shown).

In conclusion, the results presented here suggest that the initiating events in tumourigenesis may result from the mutagenicity linked to the oxidative stress to which senescing cells are subject. Hence, senescence and its associated oxidative stress might be viewed as endogenous carcinogens, this providing a molecular explanation of the link between advanced age and increased cancer incidence. The presence of cells with senescence markers has been evidenced in some pre-malignant lesions of young people, such as congenital naevi and benign prostate hyperplasia (40, 41), thus extending the range of situations to which our findings may be relevant: oxidative stress, whether it results from normal ageing, from a special local hormonal environment as in the prostate, or from inherited oncogene activation as in congenital naevi, may generate (prematurely) senescent cells from which cancer-initiated cells have a high risk of emerging.

Acknowledgements

We wish to thank Fabrice Nesslany for technical advice on comet assays, Nathalie Jouy at the Service commun de Cytométrie et de Tri cellulaire (IMPRT-IFR114), Brigitte Quatannens at the IBL FACS facility, Didier Deslee of the Videomicroscopy Facility at the Institut Pasteur de Lille Campus, Géraldine Pottier for excellent technical help in karyotypic analysis, and Debbie Williams for excellent technical work in transcriptomics analysis. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, Universities Lille 1 and Lille 2, the PPF Bioinformatique of the Lille 1 University, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Ligue contre le Cancer (comités du Nord et de l'Aisne), the Institut Pasteur de Lille, the Conseil Régional Nord/Pas-de-Calais, the European Regional Development Fund, the European Integrated Project RISC-RAD, contract number FI6R-CT2003-508842, and Contract EDF V3-103. EG's laboratory is supported by the Ligue Nationale contre le Cancer, équipe labellisée. K. Gosselin had a fellowship from the Institut Pasteur de Lille and the Région Nord/Pas-de-Calais and from the Société Française du Cancer. S. Martien had a fellowship from the French Ministry of Research and from the Fondation pour la Recherche Médicale. P. Ostoich is funded by the CEA. CT de Roodenbeke is funded by the Association pour la Recherche sur le Cancer, ARECA programme on Epigenetic Profiling.

References

- 1. Hayflick, L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. Exp. Cell Res., *37*: 614-636, 1965.
- 2. Smith, J. R. and Pereira-Smith, O. M. Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression. Science, *273:* 63-67., 1996.
- 3. Cristofalo, V. J., Lorenzini, A., Allen, R. G., Torres, C., and Tresini, M. Replicative senescence: a critical review. Mech Ageing Dev, *125:* 827-848, 2004.
- 4. Cuervo, A. M. and Dice, J. F. When lysosomes get old. Exp Gerontol, *35:* 119-131, 2000.
- 5. Brunk, U. T., Jones, C. B., and Sohal, R. S. A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. Mutat Res, *275*: 395-403, 1992.
- 6. Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J. D., Yan, L. J., and Ames, B. N. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 92: 4337-4341, 1995.
- 7. Vaziri, H. and Benchimol, S. From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging. Exp Gerontol, *31*: 295-301., 1996.
- 8. von Zglinicki, T. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. Ann N Y Acad Sci, *908:* 99-110., 2000.
- 9. Opresko, P. L., Fan, J., Danzy, S., Wilson, D. M., 3rd, and Bohr, V. A. Oxidative damage in telomeric DNA disrupts recognition by TRF1 and TRF2. Nucleic Acids Res, *33*: 1230-1239, 2005.
- 10. Lo, A. W., Sabatier, L., Fouladi, B., Pottier, G., Ricoul, M., and Murnane, J. P. DNA amplification by breakage/fusion/bridge cycles initiated by spontaneous telomere loss in a human cancer cell line. Neoplasia, *4:* 531-538, 2002.
- 11. Campisi, J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. Trends Cell Biol, *11:* S27-31, 2001.
- 12. Puzianowska-Kuznicka, M. and Kuznicki, J. Genetic alterations in accelerated ageing syndromes. Do they play a role in natural ageing? Int J Biochem Cell Biol, *37:* 947-960, 2005.
- 13. Meydani, M., Lipman, R. D., Han, S. N., Wu, D., Beharka, A., Martin, K. R., Bronson, R., Cao, G., Smith, D., and Meydani, S. N. The effect of long-term dietary supplementation with antioxidants. Ann N Y Acad Sci, *854*: 352-360, 1998.
- 14. Boyce, S. T. and Ham, R. G. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. J Invest Dermatol, *81*: 33s-40s., 1983.
- 15. 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., and Campisi, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA, 92: 9363-9367, 1995.
- 16. Chartier, C., Degryse, E., Gantzer, M., Dieterle, A., Pavirani, A., and Mehtali, M. Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in Escherichia coli. J Virol, *70:* 4805-4810., 1996.
- 17. Schiedner, G., Hertel, S., and Kochanek, S. Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of Ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production. Hum Gene Ther, *11:* 2105-2116, 2000.

- Shay, J. W. and Wright, W. E. Quantitation of the frequency of immortalization of normal human diploid fibroblasts by SV40 large T-antigen. Exp Cell Res, *184:* 109-118, 1989.
- 19. Huschtscha, L. I. and Holliday, R. Limited and unlimited growth of SV40-transformed cells from human diploid MRC-5 fibroblasts. J Cell Sci, *63:* 77-99, 1983.
- 20. Dickson, M. A., Hahn, W. C., Ino, Y., Ronfard, V., Wu, J. Y., Weinberg, R. A., Louis, D. N., Li, F. P., and Rheinwald, J. G. Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)- enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. Mol Cell Biol, 20: 1436-1447., 2000.
- 21. Bringold, F. and Serrano, M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. Exp Gerontol, *35*: 317-329, 2000.
- 22. Darbro, B. W., Schneider, G. B., and Klingelhutz, A. J. Co-regulation of p16INK4A and migratory genes in culture conditions that lead to premature senescence in human keratinocytes. J Invest Dermatol, *125*: 499-509, 2005.
- 23. Bernard, D., Gosselin, K., Monte, D., Vercamer, C., Bouali, F., Pourtier, A., Vandenbunder, B., and Abbadie, C. Involvement of Rel/NF-kappaB transcription factors in keratinocyte senescence. Cancer Res, *64*: 472-481, 2004.
- 24. Atamna, H., Paler-Martinez, A., and Ames, B. N. N-t-butyl hydroxylamine, a hydrolysis product of alpha-phenyl-N-t-butyl nitrone, is more potent in delaying senescence in human lung fibroblasts. J Biol Chem, *275:* 6741-6748., 2000.
- 25. Cunningham, M. L., Peak, J. G., and Peak, M. J. Single-strand DNA breaks in rodent and human cells produced by superoxide anion or its reduction products. Mutat Res, *184:* 217-222, 1987.
- 26. Baker, M. A. and He, S. Q. Elaboration of cellular DNA breaks by hydroperoxides. Free Radic Biol Med, *11:* 563-572, 1991.
- 27. Sekiguchi, M. and Tsuzuki, T. Oxidative nucleotide damage: consequences and prevention. Oncogene, *21:* 8895-8904, 2002.
- 28. Huschtscha, L. I., Noble, J. R., Neumann, A. A., Moy, E. L., Barry, P., Melki, J. R., Clark, S. J., and Reddel, R. R. Loss of p16INK4 expression by methylation is associated with lifespan extension of human mammary epithelial cells. Cancer Res, 58: 3508-3512, 1998.
- 29. Romanov, S. R., Kozakiewicz, B. K., Holst, C. R., Stampfer, M. R., Haupt, L. M., and Tlsty, T. D. Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. Nature, *409*: 633-637., 2001.
- 30. Garbe, J. C., Holst, C. R., Bassett, E., Tlsty, T., and Stampfer, M. R. Inactivation of p53 function in cultured human mammary epithelial cells turns the telomere-length dependent senescence barrier from agonescence into crisis. Cell Cycle, *6*: 1927-1936, 2007.
- 31. Sundaram, M., Guernsey, D. L., Rajaraman, M. M., and Rajaraman, R. Neosis: a novel type of cell division in cancer. Cancer Biol Ther, *3*: 207-218, 2004.
- 32. Walen, K. H. Spontaneous cell transformation: karyoplasts derived from multinucleated cells produce new cell growth in senescent human epithelial cell cultures. In Vitro Cell Dev Biol Anim, *40*: 150-158, 2004.
- 33. Holst, C. R., Nuovo, G. J., Esteller, M., Chew, K., Baylin, S. B., Herman, J. G., and Tlsty, T. D. Methylation of p16(INK4a) promoters occurs in vivo in histologically normal human mammary epithelia. Cancer Res, *63*: 1596-1601, 2003.
- 34. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol, *11*: 298-300, 1956.

- 35. Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J., and Hiai, H. Persistent oxidative stress in cancer. FEBS Lett, *358:* 1-3, 1995.
- 36. Pelicano, H., Carney, D., and Huang, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. Drug Resist Updat, *7*: 97-110, 2004.
- 37. Halliwell, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? Biochem J, *401:* 1-11, 2007.
- 38. Caldecott, K. W. Protein-protein interactions during mammalian DNA single-strand break repair. Biochem Soc Trans, *31*: 247-251, 2003.
- Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S., and Loeb, L. A. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. J Biol Chem, 267: 166-172, 1992.
- 40. Choi, J., Shendrik, I., Peacocke, M., Peehl, D., Buttyan, R., Ikeguchi, E. F., Katz, A. E., and Benson, M. C. Expression of senescence-associated beta-galactosidase in enlarged prostates from men with benign prostatic hyperplasia. Urology, *56:* 160-166, 2000.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L. C., Soengas, M. S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C. M., Majoor, D. M., Shay, J. W., Mooi, W. J., and Peeper, D. S. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. Nature, *436*: 720-724, 2005.

Figure legends

Figure 1: Senescence and emergence of keratinocytes

(A) Growth curve. (B) Cell morphologies observed by phase-contrast microscopy. Bars represent 80 μ m. (C) SA- β -Gal assays. SA-b-Gal-positive cells were manually counted amongst about 300 total cells. (D) Western blot analysis of the PCNA protein level in total cell extracts. These results are representative of several experiments performed with cells from 7 different donors.

Figure 2: Karyotypic analysis of NHEKs at the different growth phases

Young, senescent, emergent, 2nd-plateau, ImK and ImK2 cells were analyzed by G-banding and M-FISH for karyotypic aberrations. At each growth phase, 11 to 28 metaphases were analyzed by either one or both techniques and the results were compiled in the graph. The term "Aneuploidies" regroups polyploidies and less severe chromosome gain or loss; the term "Chromosomes aberrations" regroups translocations, fusions, chromosome rings and chromosome minutes, with translocations the most frequent aberrations observed in ImK and ImK2. Photographs of representative ImK and ImK2 karyotypes are given.

Figure 3: In vivo tumorigenicity of PS emergent and ImK cells

Female *nude* mice were injected in the flank with 800.000 of either presenescent, PS emergent, or ImK cells embedded in a plug of collagen/matrigel. MDA-MB231 or NIH-3T3 were used as positive control. MDA-MB231- or NIH-3T3-injected mice developed tumors at the injection site after 4 and 17 weeks respectively. In mice injected with pre-senescent, PS emergent and ImK cells, the xenograft poorly developed, but from the 19th week onward skin lesions appear away from the injection site; they looked like ulcers (A) or hyperkeratotic plaques (B). Bar represents 5mm.

Figure 4: H₂O₂ is a motor of post-senescence emergence

(A) Treatment with a sublethal dose of H_2O_2 induces premature senescence and emergence. Young NHEKs were treated with 30 μ M H_2O_2 every 3 days until displaying the senescent phenotype (9-day total treatment). The treatment was then stopped and emergence was monitored. Growth curve, PCNA expression, and representative images of cell morphologies. Bars represent 400 μ m. (B) Overexpression of MnSOD induces premature senescence and emergence. Young NHEKs were infected or not with AdMnSOD. AdMnSOD-infected cells underwent premature senescence (plateau from 3 to 10 days after infection) and emergence afterwards. As seen in the western-blot analysis, MnSOD was overexpressed on day 3 postinfection. This overexpression decreased by day 14, the adenoviral genome being episomal. Expression of other antioxidant enzymes did not significantly change. Morphologies of infected and uninfected cells are shown on day 6 post-infection during premature senescence and on day10 at the beginning of emergence (one emerging clone is shown). Bars represent 30 μ m.

Figure 5: Antioxidants and NF-KB inhibitors inhibit post-senescence emergence

Presenescent NHEKs were seeded into 24-well culture plates at the limit density for emergence (10,000 cells per well) and treated or not with catalase (cat) at 100 U/mL, N-tert-butyl-hydroxylamine (NtBHA) at 1 or 10 μ M, sulfazalasine (sulfa) at 0.5 mM, or gliotoxin (glio) at 0.05 μ M. A few days later, the wells with emerging clones were counted and their percentages calculated.

Figure 6: Post-senescence emergence is linked to the level of mutagenic oxidative DNA damage in senescent cells

(A) Comet assays were performed on young NHEKs treated or not with 30 μ M H₂O₂ and on senescent NHEKs treated or not with 10, 100, or 500 U/mL catalase. The electrophoresis was performed at pH=8 to detect DNA double- and at pH=13 to detect both double- and single-strand breaks. Comet-positive cells were independently counted twice. Results are mean percentages of comet-positive cells ± standard deviations. (B) Comet assays were performed on senescent NHEKs treated or not with 10, 100, or 500 U/mL catalase to detect DNA single-strand breaks at pH=13. Tail moments (the tail moment is a value taking into account the percentage of DNA in the tail and the length of the tail) were measured. The tail moments (in arbitrary units) of 56 to 72 cells in each case are given in the graphs, along with mean and median values. (C) NHEKs at different stages, treated or not with 30 μ M H₂O₂ or 100U/mL catalase, were subjected to immunofluorescence staining with an antibody against 8-oxoguanine. 8-oxo-guanine-positive cells were counted in 5 independent microscopic fields. The results are given as means ± standard deviations. *P* values were calculated using t-tests.



Β.





M-FISH - ImK2 48 XX with t(10;11;10) iso11p t(7;20) t(15;11)

Same 12 ě ě Y 45

G-banding - ImK 45 00 with a chromosome ring



G-banding - ImK 87 XX with several translocations

aneuploidies ■ chromosome aberrations
injected cells	Pre- senescent	PS emergent	lmK	MDA- MB231	NIH 3T3
number of mice with metastatic skin lesions	1/6	4/5	6/6	0/1	0/2

Β.

Ulcer-like lesion (on the back)



(mouse n° 5377, ImK injected)

Hyperkeratotic plaque (on the rigth ear)



(mouse n° 5374, ImK injected)



Figure 4





antibody conjugate to horseradish peroxidase (HRP). The amount of TRAP products was determined by means of the HRP activity using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate and subsequent color development. Absorbance was measured at 450nm and 690nm and given as A_{450} - A_{690} .

FACS sorting of senescent cells and staining for cell filiation tracing

Senescent cells were electrostatically sorted in air, out of a presenescent population and according to their forward and scatter factors, on a Coulter EPICS XL-MCL or a Coulter EPICS ALTRA. The 25% cells with the highest factors were collected in complete culture medium and again placed in culture. After plating, cells were incubated with 10 µM Vybrant CFDA SE (Molecular Probes V-12883) for 15 min at 37°C or with Vybrant DiI cell-labelling solution (1/200 dilution, Molecular Probes) for 30 min at 37°C, washed, and monitored for emergence.

Transcriptomics analysis

cDNA preparation - Total RNAs were extracted using RNeasy mini-columns (QIAGEN). Double stranded cDNA was synthesised from total RNA using a SMART protocol (1). Two first strand reactions were set up starting with 500ng of total RNA. Four microlitres of each first strand reaction was used in the amplification step which was performed using 17 rounds of cycling. The ds cDNA was checked on a 1.2% agarose gel before the samples were purified using Qiagen Qiaquick clean up columns. The amount of cDNA amplified was then checked using the Nanodrop ND1000.

cDNA labelling and microarray hybridisation - Using the Bioprime labelling kits (Invitrogen), 10ul of purified cDNA was labelled, where $2\mu l$ of Cye dye (GE) was incorporated. After incubating for 3 hr at 37° C, the labels were purified using ProbeQuant

G50 micro columns (GE). Incorporation rates were determined using a Nanodrop ND1000 before specific labels were pooled and dried down to completion. The labels were resuspended in 40µl of hybridisation buffer (40% deionised formamide; 5x Denhart's; 5x SSC; 1mM Na pyrophosphate; 50mM Tris pH 7.4; 0.1% SDS) and hybridised onto a RNG-MRC microarray mouse 25K printed GE Codelink slide set on (http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/facilities/microarray/rng.html), overnight at 48°C in a water bath using the Corning hybridisation chambers. After hybridisation, the arrays were then washed initially in 2xSSC until the coverslip had come off, then 5 min with vigorous shaking in 0.1x SSC; 0.1% SDS and then finally in 0.1xSSC for 2 min with vigorous shaking. The arrays were then spun dry and scanned using a ProScanArray HT (Perkin Elmer, Beaconsfield, UK) at 7 different PMT gain settings from 40 to 70. The images were then processed using ImaGene 6.0.1 (Bio Discovery, El Segundo, CA, USA), where all 14 images were overlaid and gridded and the feature data extracted.

Analysis of microarray - The RNA data were processed using Mavi 2.6.0 (MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany), which increases the dynamic range whilst avoiding saturation problems. The data was then loaded into R Project for Statistical Computing (http://www.r-project.org) for further analysis. A two dimensional loess normalisation, from the YASMA5 (Yet Another Statistical Microarray Analysis) library, was performed on each array to correct for any spatial variation within the slide. The LIMMA library (Linear Models for Microarray Analysis (2) from the BioConductor software project (http://www.bioconductor.org) was used to further normalise the data and to select differentially expressed genes. In brief, a linear model is fitted to the data for each gene to fully model the systematic part of the data and provide estimates for each coefficient (samples in this case). These coefficients can then be compared and differentially expressed genes selected using an empirical bayes moderated t-statistic. Differential genes were selected for the comparisons of interest based on their

moderated t-statistic (3) after using a false discovery rate control of 5 % (4). The fitted values for each sample were then converted back to red and green intensities and loaded into GeneSpring GX (Agilent technologies, Stockport, UK) to allow for easy comparison of lists of differential genes.

Telomere length determination

We used the TeloTAAAG telomere length assay kit (Roche), according to manufacturer's instructions. Briefly, genomic DNA was isolated using a standard SDS-proteinaseK protocol. Two µg of purified DNA was digested with a Hinfl/Rsal enzyme mixture 2hrs at 37°C and separated by an overnight electrophoresis on a 0.8% agarose gel in TBE buffer at 5Volts/cm. The Southern capillary transfer was done using 20xSSC buffer on positively charged nylon membranes. The blot was hybridized with a digoxygenin-labeled probe specific for telomeric repeats and incubated with a digoxygenin-specific antibody coupled to alkaline phosphate. For TeloFISH, slides were prepared as for M-FISH. The hybridization mixture, containing 70% formamide, the nucleic acid probes labelled with Cy3 at 0.3µg/µL (Perceptive Biosystems, Ramsey, MN), 1% (W/V) blocking reagent (Boehringer-Mannheim, Gmbh) in 10mM Tris pH7.2, was laid down, a coverslip was added and DNA was denatured for 3min at 80°C. After 2hrs hybridization at RT, slides were washed with 70% formamide/10mM Tris pH 7.2 (2*15 min) and with 0.05M Tris 0.15M NaCl pH 7.5 containing 0.05% Tween-20 (3*5 min). Slides were then counterstained with 1µg/mL DAPI and mounted in antifade solution (VectaShield, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA).

Reverse Transcription and Quantitative-Polymerase Chain Reaction

Total RNAs were extracted using RNeasy mini-columns (QIAGEN). One µg of RNA was reverse-transcribed using random hexamers, Superscript III and dNTPs (Invitrogen) in a final

Supplementary Methods

Measure of telomerase activity by Telomerase Repeat Amplification Protocol (TRAP) Cells were collected and kept as frozen pellets. Pellets were suspended in ice-cold 1X CHAPS lysis buffer (10mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM MgCl2, 1mM EGTA, 0.1mM benzamidine, 5mM β-mercaptoethanol, 0.5% CHAPS, and 10% glycerol) containing RNase inhibitor at a final concentration of 150U/mL. After 30mn incubation on ice, the lysate was centrifuged at 14,000 g for 25mn at 4° C, and the supernatant was transferred into a fresh tube. Protein concentrations of the extract were measured by the Bradford method (Bio-Rad, Hercules, CA), and an aliquot of extract containing 1µg of protein was used for each TRAP assay. TRAP assays were performed using TRAPeze ELISA kit (S7750.Chemicon Int., Temecula, CA), according to manufacturer's instructions with minor modifications. Twenty µL of reaction mixture containing 1µg of protein extract, 4µL of 5X TRAP reaction mix (Tris buffer, primers, biotinylated TS primer and RP primer, dNTPs and DNPdCTP, and oligomer mix for amplification of 36-bp internal control band), and 1 unit of amplitaqGOLD Tag DNA polymerase (Applied Biosystems Foster City, CA,), was incubated for 30mn at 30° C and subsequently subjected to tree-step PCR (after activation of the hot start Taq) at 94° C for 30 seconds, 56° C for 30 seconds and 72°C for 66 seconds for 40 cycles. Each assay design included (i) a test extract of 1µg of protein in duplicate, (ii) a heat-inactivated lysate at 85° C for 15mn before the assay, (iii) a telomerase-positive control cell extract MDA-MB 231 corresponding to a range of 125 to 31 cells, (iv) a primerdimer/PCR contamination control where 2µL of 1X CHAPS lysis buffer was substituted to the extract, and (v) the TSR8 PCR/ELISA-positive control supplied in the kit. Nonradioactive detection of the telomerase products was performed by ELISA protocol. TRAP products (fifteen percent) were immobilized onto streptavidin-coated microtiter plates and then detected by anti-DNP

volume of 20 µl according to the manufacturer's instructions. The quantitative PCRs were performed on an Opticon 2 Thermocycler (Bio-Rad) with the following primers : p21 (fd 5'-ATGAAATTCACCCCCTTTCC; rs 5'- CCCTAGGCTGTGCTCACTTC), p16 (fd 5'-TGCCTTTTCACTGTGTTGGA; rs 5'-CCCTAGGCTAGCAGTGTGA); PCNA (fd 5'-TCTCAGCCATATTGGAGATG ; rs 5'-CAGGTACCTCAGTGCAAAAG), ARNpol2 (fd 5'- GTGCGGCTGCTTCCATAA; rs 5'-GCACCACGTCCAATGACAT), RPL13a (fd 5'-AGCTCATGAGGCTACGGAAA; rs 5'- CTTGCTCCCAGCTTCCTATG), Actine β (fd 5'-TCCCTGGAGAAGAGGCTACGA ; rs 5'- AGCACTGTGTTGGCGTACAG). PCRs were performed in duplicate on 10ng of cDNA using Invitrogen (for p16 and PCNA) and Epicentre reaction mixture with L buffer (for p21), with H buffer (for ARNpol2, RPL13a and Actine β) following the producer instructions. Cycle conditions were set as follows: 94°C for 15s and 60°C to 66°C (depending on the primers) for 1min, 40 cycles. Gene expression levels were normalized by geometric averaging of the 3 internal control genes, ARNpol2, RPL13a and Actine β , as recommended by Vandesompele et al.(5). Gene expression stability of ARNpol2, RPL13a and Actine β was validated with two softwares: geNorm(5) and NormFinder(6).

BrdU-incorporation assays

BrdU (Roche) was added to cell cultures at 10µM for 6hrs. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, permeabilized with 0.2% Triton X-100, and incubated with 40U/ml DNase I (Promega) and 20U/ml Exonuclease III (Roche) for 30min at 37°C. BrdU was revealed with anti-BrdU mouse IgG (Dako) and Rhodamine Red-conjugated antimouse IgG (Jackson Immunoresearch laboratories).

Metaphase assays

Presenescent cells were plated in Lab-tek II Chamber slide (Nalge Nunc International) and let grown until senescence. Slides were incubated with Karyomax Colcemid (Invitrogen Corporation) 1hr at 37°c, incubated in 60mM KCl solution at 37°C, fixed with 4%

paraformaldehyde in PBS for 20min, and stained with 1µg/ml Hoechst 33258 for 3min.

- 1. Petalidis, L., S. Bhattacharyya, G.A. Morris, V.P. Collins, T.C. Freeman, and P.A. Lyons. 2003. Global amplification of mRNA by template-switching PCR: linearity and application to microarray analysis. *Nucleic Acids Res* 31:e142.
- 2. Smyth, G.K., J. Michaud, and H.S. Scott. 2005. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 21:2067-2075.
- 3. Smyth, G.K. 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3:Article3.
- 4. Benjamini, Y., D. Drai, G. Elmer, N. Kafkafi, and I. Golani. 2001. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* 125:279-284.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034.
- 6. Andersen, C.L., J.L. Jensen, and T.F. Orntoft. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64:5245-5250.



Supplementary Figure 1: Telomerase activity in NHEKs at the different growth stages

Young (Y), PS emergent (Em) and ImK NHEKs of three different donors (1F225, 2F1958, and 4F0315) were analyzed for telomerase activity by TRAP assay. Each sample was analyzed as a native extract and after heat inactivation, in duplicate. Results are given as the difference of the mean absorbance of the native extract minus that of the heat inactive extract +/- standard deviation. TRS8 is a positive internal control for PCR/ELISA. MIX R- is a negative control without cell extract.

Α.



Supplementary Figure 2: Post-senescent emergent cells are partially transformed

E-cadherin

Actin

(A) Observation by phase-contrast microscopy of 2 PS emerging clones representative of many routine observations done with different donors. The clone of the left panel is the most commonly observed; it has still an epithelioid morphology. That of the right panel is rarer; it has a fibroblastoid morphology. Bars represent 60µm. (B and C) Western blot analysis of some markers of keratinocyte differentiation, involucrin, cytokeratin14 and E-cadherin, in total cell extracts of young (Y), senescent (S), PS emergent (E) and 2nd plateau (2nd P) NHEKs.



Supplementary Fig.3: Evidence of filiation between senescent and PS emergent cells

Senescent NHEKs were sorted by FACS as described in Experimental Procedures and placed again in culture at low density. After plating, the quality of the sort was checked by careful microscopic observation (not shown). The cells were then stained with the fluorogenic tracer CFDA SE or dil, washed, and monitored every day for emergence. Emergence occurred after about a week. Emerging clones were analysed under an epifluorescence microscope. One can see that emerging cells (arrows) are stained by the tracers like the parental senescent cells. Bars represent 30µm.



Supplementay Figure 4: NHEKs at the growth plateaus have telomeres only slightly shortened

(A) Young, senescent and PS emergent NHEKs were processed for telomere length analysis by southern-blot. The red arrowheads indicate the approximate median telomere length. (B) Young, senescent, 2nd plateau and ImK cells were processed for telomere analysis by teloFISH. Representative results are illustrated. Chromosomes without telomeres are very rare. (C) Thirty to 74 metaphases in each case were analysed for chromosomes with undetectable telomeres.



Supplementary Figure 5: Expression of p16 and p21 at the different growth phases

Total RNAs were extracted from NHEKs at different growth stages. RNAs for PCNA, p16 and p21 were quantified by Reverse Transcription and Quantitative-Polymerase Chain Reaction and normalized to the geometric average of 3 internal controls, ARNpol2, RPL13a and Actine b.

A. BrdU-incorporation assay



B. After colcemid



Supplementary Figure 6: Senescent keratinocytes are still able to divide

(A) Representative images of BrdU incorporation assays performed on a senescent population of NHEKs. Arrowheads indicate binucleated senescent cells. One is BrdU-negative; the other is BrdU-positive. Bars represent 6µm. (B) Images of a typical senescent cell treated by colcemid in order to block metaphase plates. This cell displays 3 nuclei, two interphasic (arrowheads), and one in metaphase (arrow). Bars represent 15µm.

A. Trypsin-dissociated and FACS-sorted senescent cells



B. Culture on plastic



C. Confocal analysis



Supplementary Fig.7: Senescent cells produce emergent cells by budding

(A) Phase-contrast images of trypsin-dissociated, FACS-sorted senescent cells. In panel 1, one cell has an attached bud; in panels 2 and 3, one cell seems to have two attached buds; in panel 4, one cell seems to have at least 3 attached buds. Bars represent 10 μ m. (B) Representative phase-contrast images of routine NHEK cultures on plastic dishes at the PS emergence stage. In panel 1, several emerging cells still seem attached by a pedicle to the senescent mother cell; in panel 2, the emerging cells seem to come from the inside of the senescent mother cell. Bars represent 30 μ m. (C) NHEKs at the PS emergence stage were processed for immunofluorescence with an antibody against cytokeratin14, in order to stain the cytoskeletons of both senescent and emerging cells. Panels 1 and 2 are general views of the staining pattern observed with an epifluorescence microscope. Panels 3 and 4 are optical cross-sections viewed with a confocal microscope. In both panels; the continuity of the cytoskeleton between the large senescent cell with a large nucleus and two of the emerging cells is marked by an arrowhead. Bars represent 20 μ m.



Supplementary Fig.8 : Time-lapse phase-contrast videomicroscopy of a senescent cell producing emergent cells by budding mitosis

NHEK cultures at the PS emerging stage were monitored by time-lapse phase-contrast videomicroscopy. Pictures were taken at 5-min intervals. The timing is indicated on each photograph. The large senescent cell with at least 3 visible nuclei and some vacuole-like structures undergoes three successive mitoses. The first (metaphase plate at 55 min and telophase at 70 min highlighted in red) produces one daughter cell that will individualize at 245 min and one daughter nucleus that will remain in the senescent mother cell. The second mitosis (metaphase plate highlighted in yellow) occurs at 105 min; it produces two daughter cells that will have individualized by 265 min. Note that at 130 min, a lamellipodia is observable in front of one daughter cell. The third mitosis (metaphase plate highlighted in blue) occurs at the end of the video. Note that throughout these divisions, the senescent mother cell remains spread on the dish and its central nucleus with a large nucleolus seems to remain quiescent.

Supplementary table 1A: Genes involved in adhesion/migration up- or downregulated in emergent vs. young keratinocytes								
t-test		Genbank	Name	Alternate name	Full name	Function	Pathology	
0,0101641	up	NM_020403	PCDH9		protocadherin 9	Localized to synaptic junctions		
5,7705584	down	NM_018937	PCDHB3	PCDH-BETA3	protocadherin beta 3	Cell-cell adhesion		
0,0200299	up	AK054903			moderately similar to mouse fat 1 cadherin	Protocadherin involved in polarization and directed migration		
0,0249515	up	NM_018836	AJAP1	MOT8; SHREW1	adherens junction associated protein 1	Localizes to the baso-lateral membrane of polarized epithelial cells	Overexpression results in invasion and overexpression of MMP9	
5,7281234	down	NM_000299	РКР1		plakophilin 1 (ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome).	Localizes to desmosomes. Links cadherin to intermediate filament. Also localizes to nuclei	Loss of expression during head and neck squamous carcinomas. Mutated in skin fragility-ectodermal dysplasia	
7,6670617	down	NM_020435	GJC2	Cx47; GJA12; CX46.6	gap junction protein, gamma2	Component of gap junctions	Defects are the cause of autosomal recessive Pelizaeus-Merzbacher-like disease-1	
5,6702564	down	NM_003829	MPDZ	MUPP1	multiple PDZ domain protein.	Associated with tight junctions		
7,5155968	down	NM_002212	EIF6	EIF3A; p27BBP; ITGB4BP	translation initiation factor 6. Also integrin-beta4 subunit	Translation initiation factor. Also a component of hemidesmosomes	Overexpressed in head and neck cancer	
5,4487437	down	NM_002210	ITGAV	CD51; MSK8, VNRA	integrin, alpha V (vitronectin receptor)	Adhesion to extracellular matrix		
6,265892	down	NM_002414	CD99			Cell adhesion glycoprotein	Oncosuppressor in onteosarcoma. Decreased in gastric adenocarcinoma	
5,9067146	down	NM_003247	THBS2	TSP2	thrombospondin 2	Cell-cell and cell-matrix interactions. Migration.	Potent inhibitor of tumor growth. Regulates cell proliferation induced by Rac1 redox-dependent signaling	
0,0167747	up	NM_005560	LAMA5		laminin alpha 5	Component of the basal membrane. Component of the anchoring complex connecting keratinocytes to the underlying dermis. Secreted by keratinocytes	Involved, with p16, in hypermobility and growth arrest during wound healing, senescence, and in area of invasion in carcinomas. Absent in Herlitz junctional epidermolysis bullosa	
6,5440547	down	NM_022763	FNDC3B	FAD104; PRO4979	fibronectin type III domain containing 3B; factor for adipocyte differentiation 104			
5,541533	down	NM_005099	ADAMTS4	ADMP-1; ADAMTS- 2; ADAMTS-4	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 4	Degradation of aggrecan and brevican, two components of the extracellular matrix		
5,3221721	down	NM_015466	PTPN23	HDPTP; HD-PTP	protein tyrosine phosphatase, non- receptor type 23	Involved in trafficking of endosomes	Endothelial cells down-regulating HD-PTP acquire a scattered and spindle-shaped phenotype and migrate more than controls	

	Supplementary table 1B: Genes involved in cytoskeleton structure and dynamics up- or downregulated in emergent vs. young keratinocytes								
t-test		Genbank	Name	Alternate name	Full name	Function	Pathology		
0,0130921	up	NM_001069	TUBB2A	TUBB; TUBB2	tubulin beta 2A	Component of microtubules. A nuclear form exists, that binds Notch	Expression declines with age and increases in tumors.		
0,002169	up	XM_067193			similar to microtubule-associated proteine 6				
0,005209	up	NM_005909	MAP1B	MAP5; FUTSCH	microtubule-associated protein 1B	Microtubule assembly			
0,0130936	up	NM_002475	MYL6B	MLC1SA	myosin, light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle	ATPase motor protein			
8,8329654	down	NM_024430	PSTPIP2	МАҮР	proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2	PCH family. Cytoskeletal-associated protein. Regulates F-actin bundling. Enhances filopodia and motility			
7,381029	down	NM_004411	DYNC111	DNCI1, DNCIC1	dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 1	Binds to dynein			

Supplementary table 1C: Genes involved in senescence/oxidative stress/DNA damage up- or downregulated in emergent vs. young keratinocytes								
t-test		Genbank	Name	Alternate name	Full name	Function	Pathology	
0,0062973	up	NM_016258	YTHDF2	HGRG8, NY-REN-2	YTH domain family, member 2; high glucose-regulated protein 8		Possible role in longevity	
6,5387814	down	NM_006936	SUMO3		SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 3	SUMO2/3 conjugate with high molecular proteins following stress.	Induces premature senescence when overexpressed	
0,0208432	up	NM_012331	MSRA		methionine sulfoxide reductase A	Reduction of methionine sulfoxide to methionine. Repair of oxidative damage to proteins	Down-regulated during aging	
0,0249985	up	NM_175614	NDUFA11	B14.7	NADH dehydrogenase ubiquinone 1 alpha subcomplex 11	complex I of the respiratoiry chain		
0,0073091	up	NM_003298	NR2C2	TR4; TAK1; TR2R1	nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2	Orphan nuclear receptor. Stimulated by oxidative stress trhough FOXO3a. Apoptosis modulator via Bcl2 regulation		
0,0005229	up	NM_002833	PTPN9	MEG2; PTPMEG2	proteine tyrosine phosphatase, non- receptor type 9	Protein tyrosine phosphatase family (PTP). Role in secretory pathway. Modulator of insulin-dependent FOXO1 nuclear exclusion		
0,0086731	up	NM_031296	RAB33B		RAB33B, member of RAS oncogen family	GTPase, retrograde traffic between Golgi and ER. Golgi resident. Interacts with Atg16L and modulates autophagosome formation		
0,0117051	up	NM_014664	N4BP1		Nedd4 binding protein 1	Nedd4: E3 ubiquitine ligase. Also binds and inhibit Itch, a Nedd4 related E3. Nedd4 are involved in lysosomal and proteasomal degradation. Itch controls the stabilitty of p63 and p73	Several Nedd4 are overexpressed in cancer.	
8,169166	down	NM_000122	ERCC3	XPB; BTF2; GTF2H, RAD25; TFIIH	excision-repair cross-complementing rodent repai deficiency, complementation group 3 (xeroderma pigmentosum group B complementing)	ATP-dependent helicase that functions in nucleotide excision repair. Also the 89 kda subunit of TFIIH	Defects in Xeroderma pigmentosum type B. Reduced expression in oesophagial cancer. Low expression associated with the risk of head and neck squamous cell carcinoma	

Supplementary table 1D: Genes involved in cell cycle progression or cell death up- or downregulated in emerging vs. young keratinocytes								
t-test		Genbank	Name	Alternate name	Full name	Function	Pathology	
6,7475028	down	NM_014456	PDCD4		programmed cell death 4 -neoplastic transformation inhibitor)	Localized to the nucleus in proliferating cells. Role in apoptosis but not defined	Down-regulation promotes colonic neoplatic transformation	
0,0033949	up	NM_005134	PPP4R1	PP4R1; PP4(Rmeg)	protein phosphatase 4, regulatory subunit 1	Phosphatase whose substrates are: HDAC3, NFkB p65. Pro-apoptotic. DNA damage response. Centrosome maturation		
0,0096995	up	NM_001353	AKR1C1	C9; DD1; DDH; H- 37; MBAB; HAKCR; 2-ALPHA-HDS; 20- ALPHA-HDS	aldo-keto reductase family 1, member C1; dihydrodiol dehydrogenase 1, 20-alpha (3- alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase	Degrades progesterone	Counteract apoptosis. Lost in breast cancer	
0,0073746	up	NM_001952	E2F6		E2F6	Transcription factor of the E2F family. Repressor? Anti-apoptotic via BRCA1 inhibition, couteraction on E2F1 activity		
5,2624523	down	NM_152431	PIWIL4		piwi-like 4.	Belongs to argonaute family. Involved in chromatin remodelling by inducing histone methylation. Induces methylation at the p16 locus		
0,0184663	up	NM_006341	MAD2L2	REV7; MAD2B	MAD2 mitotic arrest deficient-like 2	Component of the mitotic spindle assembly checlpoint that prevents anaphase	Upregulation associated with colorectal and breast tumors	
0,0197041	up	NM_001201	BMP3	BMP-3A	bone morphogenetic protein 3	Structurally divergent member of BMP family. Limits BMP and TGFbeta1 signalling	Inactivated by hypermethylation in colorectal cancer	
12,610363	down	NM_014184	CNIH4	HSPC163	cornichon homolog 4	Transmenbrane protein. Involved in TGFbeta/EGF secretion		
0,0202565	up	BC027302	FLT4	PCL; VEGFR3	fms-related tyrosine kinase 4	VEGF C and D receptor. Involved in lymphangiogenesis and maintenance of the lymphatic endothelium	Highly expressed in dermis and epidermis in sporiasis. Mutations cause hereditary lymphedema type IA	

Table 1E: Genes involved in cancer up- or downregulated in emergent vs. young keratinocytes								
t-test		Genbank	Name	Alternate name	Full name	Function	Pathology	
0,0022539	up	NM_006279	ST3GAL3	ST3N; SIAT6; ST3GALIII	beta-galactoside alpha-2,3- sialyltransferase 3	Type II membrane protein that catalyzes the transfert of sialic acid to galactose- containning substrates. Localizes to Golgi.	Increased in cancer	
0,0081051	up	NM_000782	CYP24A1	СР24; СҮР24	cytochrome p450, family 24, subfamily A, polypeptide 1	Monooxygenase which catalyzes the degradation of 1,25-dihydroxyvitamin D3, the active form of vitamin D3. Localizes to mitochondria	Known as an oncogene. VitD deficiency is associated with risk of developping colorectal cancer	
5,3117958	down	S69025	HOX A1		homeobox A1	Transcription factor	hypermethylated in adenocarcinomas	
5,385203	down	NM_021220	OVOL2	movol2; movo2	ovo-like 2	Zinc-finger transcription factor. Role in epithelial and germ cell development by modulating the balance between proliferation and differentiation of progenitor cells		
0,0199481	up	NM_003173	SUV39H1	MG44; KMT1A; SUV39H	suppressor of variegation 3-9 homolog 1	Histone methyl transferase with a chromodomain and a SET domain. Moves to centromeres during mitosis. Required for pericentric heterochromatin organization, chromosome segregation, mitotic progression		
0,0194713	up	NM_020892	DTX2	RNF58	deltex homolog 2	E3 ubiquitin ligase. Notch signalling		
0,0186087	up	NM_002516	NOVA2	ANOVA; NOVA3	neuro-oncological ventral antigen 2	RNA-binding protein. Splicing factor. Expression restricted to astrocytes.	Involved in gliomas?	
0,0213609	up	NM_013956	NRG1	GGF; HGL; HRG; NDF; ARIA; GGF2; HRG1; HRGA; SMDF	neuregulin1	ErbB ligand. Involved in growth and differentiation of several cell types, including epithelial cells	Expressed in 80% breast cancers	
10,265332	down	NM_005423	TFF2	SP; SML1	trefoil factor 2/spamolytic protein1	Stable secreted protein with a trefoil motif. May protect mucosa	Reduced expression in precancerous conditions	
9,6394007	down	NM_030774	OR51E2	PSGR; PSGR2; OR52A2; OR51E3P	olfactory receptor, family 51, subfamily E, member 2	prostate-specific G protein-coupled receptor	Down-regulated in prostatic intraepithelial neoplasia	

	Number of wells with one cell	Number of wells with emergence	% emergence
Experiment 1	42	31	73.8
Experiment 2	117	91	77

Supplementary table 2: Almost all young NHEKs have an emergence potential Young NHEKs were diluted to one cell per well and cultured to senescence and emergence. The numbers of cultures performed and the percentages of cultures having developed emerging clones by the end of the experiment are given.

3.2. Les kératinocytes accumulent plus de dommages oxydants à l'ADN à la sénescence que les fibroblastes : rôle dans l'initiation cancéreuse.

a) Introduction

Alors qu'on observe l'émergence systématique de cellules transformées à partir des kératinocytes sénescents, les fibroblastes de derme peuvent se maintenir au plateau de sénescence pendant de longues périodes, allant jusque plusieurs années, sans jamais s'en échapper spontanément. Afin d'approfondir les mécanismes impliqués dans l'initiation cancéreuse, et de comprendre les différences de capacité à émerger de ces deux types cellulaires, nous avons mené une étude comparative des mécanismes de sénescence des kératinocytes et des fibroblastes.

b) Résultats

Nous avons vu précédemment que le stress oxydant induit par la voie NF- κ B>MnSOD>H₂O₂ participait à l'initiation cancéreuse. Nous avons voulu dans un premier temps déterminer si l'induction d'un stress oxydant dans les fibroblastes pouvait mimer une telle émergence dans ces cellules. Nous montrons que le traitement de fibroblastes jeunes avec des doses sub-toxiques et prolongées de H₂O₂ induit une sénescence prématurée, suivie d'une émergence de clones de cellules ayant réacquis une capacité proliférative. Des résultats similaires ont été obtenus en sur-exprimant la MnSOD (données non publiées).

Bien que l'activité Rel/NF-κB ne soit pas induite au cours de la sénescence des fibroblastes, nous mettons en évidence une augmentation d'expression de la MnSOD dans ces cellules, accompagnée par une élévation du niveau de ROS à des taux comparables à ceux observés dans les kératinocytes. Cependant, l'analyse comparative des dommages oxydants dans les deux types cellulaires montre que les kératinocytes accumulent d'avantage de dommages oxydants au cours de la sénescence et ce plus particulièrement au niveau du noyau. En effet, alors que les fibroblastes sénescents présentent des dommages AIP essentiellement dans le cytoplasme, ces dommages s'accumulent dans le noyau des kératinocytes sénescents. Ceci laissait présager une accumulation de dommages oxydants au niveau de l'ADN plus importante dans les kératinocytes que dans les fibroblastes. Des essais comètes, ainsi que des expériences d'immunofluorescence anti-8-oxo-dG révèlent que les kératinocytes sénescents présentent des taux de cassures simple-brin et de 8-oxodG, deux dommages oxydants potentiellement mutagènes, plus importants que ceux observés dans les fibroblastes sénescents. Cette accumulation plus importante de dommages oxydants dans les kératinocytes s'explique probablement par une résistance accrue des fibroblastes au stress oxydant par rapport aux kératinocytes. En effet, le traitement de ces deux types cellulaires avec des doses croissantes de H₂O₂ induit une sénescence prématurée : la prolifération est inhibée et l'activité SA-βgal augmentée. Cependant, les effets sont beaucoup plus importants dans les kératinocytes que dans les fibroblastes et s'établissent pour des concentrations en H₂O₂ plus faibles.

Les cellules émergentes ont réacquis un potentiel de prolifération. Il semble donc nécessaire que les cellules sénescentes qui les génèrent possèdent des télomères suffisamment longs. Nous montrons que dans les fibroblastes sénescents les télomères sont raccourcis, entrainant une activation des voies de réponse aux cassures double-brin d'ADN. A l'inverse, les kératinocytes sénescents semblent conserver des télomères relativement longs, et ne montrent pas d'activation des voies de réponse aux cassures double-brin, alors que l'induction d'un stress oxydant dans des fibroblastes jeunes permet de reproduire une sénescence et une émergence, ce type de traitement est inefficace dans des fibroblastes pré-sénescents aux télomères devenus trop courts. Nous mettons ainsi en évidence l'importance de l'état des télomères dans l'initiation cancéreuse.

c) Conclusions

Ainsi, dans les fibroblastes, des dommages oxydants insuffisants et des télomères raccourcis induisant un arrêt du cycle irréversible empêcheraient l'émergence de cellules transformées à partir de la sénescence. Dans les kératinocytes, l'accumulation de dommages oxydants potentiellement mutagènes et des télomères suffisamment longs confèreraient à ces cellules ayant encore un potentiel prolifératif une probabilité de s'engager vers une transformation néoplasique.

Ces résultats font l'objet d'un article en préparation présenté ci-après :

Article 5 : « Skin keratinocytes accumulate more oxidative DNA damage than fibroblasts during senescence: involvement in cancerous initiation »

SKIN KERATINOCYTES ACCUMULATE MORE OXIDATIVE DNA DAMAGE THAN FIBROBLASTS DURING SENESCENCE: INVOLVEMENT IN CANCEROUS INITIATION

Sébastien MARTIEN¹, Chantal VERCAMER¹, Sébastien PINTE², Eric GILSON², Peter Ostoich³, Laure SABATIER³, Julie BERTOUT¹, Karo GOSSELIN¹, Christian SLOMIANNY⁴, Yvan De LAUNOIT¹ and Corinne ABBADIE^{1*}

¹ UMR8161, CNRS/Institut Pasteur de Lille/Université Lille 1, Institut de Biologie de Lille, 1 rue Calmette, 59021 Lille Cedex, France

² Laboratory of Molecular Biology of the Cell, CNRS UMR5239, IFR128, Faculté de Médecine Lyon Sud, Université Lyon 1, 69495 Pierre Bénite, France

³ Radiobiology and Oncology Unit, CEA Life Science Division, BP6, 92265 Fontenay-aux-Roses, France

⁴ Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U800, Centre Commun de Mesures -Imagerie Cellulaire, UFR de Biologie, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

* Corresponding author

Abstract

Senescence was proposed to be a barrier against tumorigenesis. However, neoplasic cells can spontaneously emerge from the senescence plateau of normal human epithelial cells such as keratinocytes or mammary cells. In contrast, normal human senescent fibroblasts never generate such emerging cells. We show here that senescence in keratinocytes is accompanied by an accumulation of oxidative damages in the nucleus (DNA single-strand breaks, oxidized guanines, and cross-linkings) potentially mutagenic. Telomeres are weakly eroded and cell cycle arrest pathways are not activated. In comparison, senescent fibroblasts display fewer nuclear oxidative damages, very short telomeres, and γ -H2AX and 53BP1 foci indicative of the activation of cell cycle arrest pathways. This suggests that the senescence-associated oxidative stress could generate mutations that could result in neoplasic emergence, if telomeres are still enough long. Therefore, senescence could behave as a tumor suppressor or as a tumor promoter event, depending on its oxidative versus telomere status.

Introduction

Primary cells have a limited lifespan (1). It was particularly well established for human fibroblasts. After a finite number of population doublings (PDs), human fibroblasts enter senescence: they stop to divide, acquire a flattened and spread morphology and display a SA- β -galactosidase activity at pH6 (2). They can maintain in this state for long period. It is well established that the shortening of telomeres at each division is one trigger of senescence. Once telomeric DNA has reached a critical length, the telomeric structure is destabilized. The uncapped chromosome ends then generate a signal equivalent to DNA double-strand breaks (DSB) which triggers a DNA-damage response and thereafter an irreversible cell cycle arrest (3). Uncapped telomeres can alternatively induce a repair pathway generating chromosome end-to-end fusions. The dicentric fused chromosomes then lead to a series of so-called Breakage-Fusion-Bridge cycles (BFB cycles), generating chromosomal instability and genome-wide mutations (4). Hence, senescence was considered as a barrier against tumorigenesis because it induces an irreversible cell cycle arrest of damaged cells that have become potentially transformed (5).

Although normal human epithelial cells experience as fibroblasts a senescence growth plateau after a limited number of doublings, they differ from fibroblasts in their ability to spontaneously escape from senescence. In contrast to human senescent fibroblasts that remain arrested at the plateau for several months, senescent mammary epithelial cells (HMEC) or epidermal keratinocytes (NHEK) spontaneously and sporadically generate clones of small and refractile cells that recapitulate growth (6)(and submitted article). In both cell types, the emergence frequency is about 10⁻⁴, a value considerably higher than 10⁻⁷, the frequency of immortalization of SV40-transformed human fibroblasts (7, 8). These emergent cells were named post-selection cells by the group of Tlsty and post-senescent emergent cells by us, and will be referred here as PS emergent cells

These PS emergent cells have reacquired a growth potential since they undergo a second exponential growth phase, but are not immortalized since this growth phase ends up in a second plateau that is not completely similar to the senescence one (9) (and submitted article). However, in the case of keratinocytes, the PS emergent cells were demonstrated to be moderately transformed, and moderately tumorigenic when injected in nude mice. We therefore propose the phenomenon of PS emergence of keratinocytes as a model for studying the molecular basis of carcinogenesis initiation.

We previously demonstrated that the NF-kappaB>MnSOD>H₂O₂ pro-oxidant pathway is activated during keratinocyte senescence (10) and plays a major role in the process of PS emergence (submitted article). The hypothesis is that this pathway generates oxidative DNA damage at the origin of genomic alterations. These alterations could stochastically mutate a cocktail of oncogenes, tumor suppressor genes or other crucial regulators of cell proliferation, differentiation or death favorable to neoplasic transformation. Here, in order to support the involvement of DNA oxidative damage in the process of PS emergence, we investigated the level of reactive oxygen species at senescence, the intracellular targets of oxidative damage, and the consequences of oxidative damage, comparatively in human dermal fibroblasts, that never emerge, and human epidermal keratinocytes that do. We also compared the status of telomere in both cell types at the senescence plateau. We show that PS emergence of neoplasic keratinocytes would result from mutations of oxidative origin and would be permitted by still enough long telomeres. In fibroblasts, the oxidative DNA damages would be too low to induce sufficient neoplasic mutations, and too much shortened telomeres would irreversibly arrest the cell divisions. Therefore, the level of oxidative DNA damages and the telomere length status would be two key elements in cancerous initiation.

Material and Methods

Cell culture

Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDFs) and Epidermal Keratinocytes (NHEKs), purchased from Clonetics. NHDFs were from the donor 2F1958, a Caucasian female of 37 years old. NHEKs used in most experiments were isogenic, or from another donor, the 4F0315, a Caucasian female of 31 years old. Cells were grown at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ in the ad hoc medium supplied by Clonetics (FGM-2 and KGM-2 bulletKit systems for NHDFs and NHEKs respectiveley). Cells were seeded as recommended by the supplier and subcultured at 70% confluence. The number of population doublings (PDs) was calculated at each passage by using the following equation: PD=ln(number of collected cells/number of plated cells)/ln2. NHDFs and NHEKs were able to achieve approximately 50-60 PDs and 15-20 PDs respectively in our culture conditions before they senesce. Different donors, all females, of different ages and races were used in different experiments. SA- β -Gal assays were performed as described by Dimri et al.(2). For H₂O₂ treatments, H₂O₂ solutions were prepared from a 30% hydrogen peroxide solution (Merck, Perhydrol®) and diluted in medium.

Western-Blotting

Cells were lysed in Hepes 27.5mM pH7.6, urea 1.1M, NaCl 0.33M, EGTA 0.1M, EDTA 2mM, KCl 60mM, DTT 1mM and NP40 1.1%, and the total protein concentration was measured with the Bio-Rad protein assay. Proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane (Immobilon-P transfer membrane, Millipore). Primary antibodies used were: mouse anti-PCNA IgG (M0879, Dako), anti-Peroxiredoxin (ad16765, Abcam), sheep anti-MnSOD IgG (574596, Calbiochem), anti-CuZnSOD IgG (574597,

Calbiochem), anti-Catalase IgG (PC136, The Binding Site), anti-GPx IgG (PC097, The Binding Site), goat anti-Actin IgG (C-11/SC-1615, Santa Cruz). Secondary antibodies used were a peroxidase-conjugated rabbit anti-sheep IgG, goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories), or donkey anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Peroxidase activity was revealed using an enhanced chemiluminescence kit (Amersham).

Measurement of ROS level

ROS level was measured using non-fluorescent DCFDA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) (D399, Molecular Probes) which diffuses across membranes and is oxidized to fluorescent DCF. Cells were rinsed in PBS, incubated with DCFDA diluted in medium at 5µM for 15min at 37°C, and then trypsinized, washed, and re-suspended in pre-warmed PBS at 37°C. After 10min incubation at 37°C, fluorescence was measured using a flow cytometer (Coulter EPICS XL-MCL) with FITC filters.

Immunofluorescence

For γ -H₂AX immunofluorescence experiments, cells were fixed in methanol/acetone (vol/vol) 10min, and washed in PBS. For 1-Amino-3-IminoPropen bridges, cells were fixed in paraformaldehyde 4% in PBS, and permeabilized with 0.2% Triton-X100. For 8-oxo-dG, they were fixed in 99% methanol 20min at -20°c. Cells were incubated with anti-AIP mouse IgM produced by (11), or anti-80xoG mouse IgG (Trevigen 4357-MC-100), 1h at 37°c, and washed with PBS-Tween 0.05%, and incubated respectively with Rhodamine coupled anti-Mouse IgM, anti-IgG mouse, or anti-IgG rabbit (Jackson Immuno Research Laboratories). Finally, they were washed in PBS-Tween 0.05% and nuclei were stained by Hoechst 33258 at 1 µg/ml in PBS for 3 min. Cells were observed under an epifluorescence microscope

(Axioplan2, and apotome axio observer Z1, Zeiss) equipped with filter sets for Hoechst and Rhodamine.

For 53BP1 and TRF1 immunodetection, cells were seeded on labtek chambers. Cells were fixed in methanol for 20 minutes at -20°C. Non specific binding of the antibodies was blocked by incubating the cells in 0.8X PBS, 50 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 3% milk (blocking solution). Cells were incubated with rabbit polyclonal anti-53BP1 (Novus Biologicals) and mouse monoclonal anti-TRF1 (Abcam), 1h at 37°C. Cells were washed in 0.8X PBS, 50 mM NaCl, 1.5% milk. Then cells were incubated with Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit antibodies (Molecular Probes) and Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit (Molecular Probes) in blocking solution, 1h at 37°C. Then they were washed in 0.8X PBS, 50 mM NaCl, 0.1% Triton X-100. Analyses were done on the Confocal Axioplan2 LSM510 (Zeiss).

Comet Assay

For each condition, 10,000 cells were suspended in 80µl of 0.5% low melting point agarose at 37°C. The suspension was immediately pipetted onto a TREVIGEN Inc. cometslide. Agarose was allowed to solidify at 4°C, 30 minutes. The cometslides were immersed in prechilled lysis solution (2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1% Triton, pH=10) and left at 4°C, for 90 minutes in the dark. Cometslides were placed in a horizontal electrophoresis unit, and equilibrated in electrophoresis buffer for 30 minutes at 4°C, in the dark. For assessing all types of DNA breaks (double strand, single strand breaks and alkali labile sites), the migration was performed in 300mM NaOH, 1mM EDTA at pH=13 for 20 minutes at 1Volt/cm. After migration, slides were neutralized with 0.4M Tris (pH=7.5) and stained with propidium iodide (2.5 μ g/mL). Quantitative analysis (tail moment) was performed using the tritek Comet Score freeware. Tail moment is the product of the tail length and the fraction of DNA in the tail (tail moment= tail length x (DNA in the tail/total DNA)).

FISH experiments

Metaphase spreads were got using a standard method. Briefly, cells were incubated 1hr in Karyomax Colcemid (Invitrogen Corporation), trypsinised, and incubated in a 60mM KCl hypotonic buffer. Cells were fixed with freshly made methanol/acetic acid solution (3:1 v/v), spread onto frozen slides and air dried overnight. Slides were fixed in 4% formaldehyde in PBS for 2min, washed 3 times in PBS, and treated with pepsin (P-7000, Sigma) at 1mg/ml for 10min at 37°C at pH2.0. After a brief wash in PBS, formaldehyde fixation and washes were repeated and the slides were dehydrated with ethanol and air dried. The hybridization mixture, containing 70% formamide, the nucleic acid probes labelled with Cy3 at 0.3µg/µL (Perceptive Biosystems, Ramsey, MN), 1% (W/V) blocking reagent (Boehringer-Mannheim, Gmbh) in 10mM Tris pH7.2, was laid down, a coverslip was added and DNA was denatured for 3min at 80°C. After 2hrs hybridization at RT, slides were washed with 70% formamide/10mM Tris pH 7.2 (2*15 min) and with 0.05M Tris 0.15M NaCl pH 7.5 containing 0.05% Tween-20 (3*5 min). Slides were then counterstained with 1µg/mL DAPI and mounted in antifade solution (VectaShield, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). FISH experiments were performed with keratinocytes and fibroblasts derived from the same donor.

RESULTS

Inducing an oxidative stress in young fibroblasts recapitulates senescence and emergence

In order to assay the importance of oxidative stress in the phenomenon of PS emergence of keratinocytes, we induced an oxidative stress in young normal human dermal fibroblasts (NHDFs) that mimics that occurring during keratinocyte senescence, and then we monitored for a PS emergence-like. Oxidative stress was induced by applying reiterative sub-toxic dose of H_2O_2 (50µM), every 48h, on exponentially growing NHDFs until the induction of a stable senescent phenotype in the whole culture. This state was reached after 15 days of such treatment: mainly all fibroblasts stopped to divide, acquired an enlarged and spread morphology, and displayed a SA- β -gal activity at pH=6 (fig. 1). Then, the treatment was stopped, and cells were monitored for emergence. Cells maintained in the senescence plateau for about 20 days and thereafter some groups of small cells appeared in the culture, generally in the vicinity of a senescent cell (fig. 1). A SA- β -gal activity anymore (fig. 1B). These cells continued to proliferate for about 15 PD and then reached a second growth plateau. Thus, both senescence and post-senescence emergence can be recapitulated in fibroblasts by inducing an oxidative stress.

The redox status is similar in senescent fibroblasts and keratinocytes

Since oxidative stress was involved in senescence of many cell types including fibroblasts (10, 12-15), we wanted to understand why this oxidative stress was unable to induce a post-senescence emergence in fibroblasts. Our first simplest hypothesis was that the level of this oxidative stress was too low, at least lower than in senescent keratinocytes. We

therefore comparatively measured reactive oxygen species (ROS) levels in NHDFs and NHEKs by flow cytometry using a DCFDA probe which fluoresces in the presence of ROS. We observed a 4-fold increase in ROS levels at the senescence plateau in both fibroblasts and keratinocytes, without any significant difference between the two cell types (fig. 2A), hence infirming our hypothesis.

We then postulated that the origin of the ROS or the anti-oxidant defenses could differ between the two cell types. Since we had previously shown that senescence in keratinocytes is, in part, due to the accumulation of H_2O_2 resulting from an up-regulation of MnSOD, a mitochondrial enzyme (10), and that this pathway was necessary for keratinocyte emergence (submitted article), we examined the expression of MnSOD in both cell types by western-blotting. The results show that the expression of MnSOD was increased at senescence similarly in both cell types (fig. 2B), again infirming our hypothesis. We then checked the expression of other antioxidant enzymes, implicated either in the production or the degradation of H_2O_2 : CuZnSOD which degrades O_2° - to form H_2O_2 , and Peroxiredoxin, Catalase and Glutathione Peroxidase (GPX) which ultimately degrade H_2O_2 into water. Any significant changes were observed either for the expression of GPX was increased in senescent fibroblasts, whereas it was undetectable in keratinocytes (Fig. 2B). Taken together, these results indicate that the redox status at senescence is globally similar in keratinocytes and fibroblasts.

Senescent keratinocytes display more DNA oxidative damage than senescent fibroblasts

Since the differential ability of fibroblasts and keratinocytes to undergo postsenescence emergence cannot be explained by differences in the redox status between the two
cell types at senescence, we next postulated it could rely on differences regarding the nature of the molecular or cellular components suffering from oxidative damage during senescence.

We first investigated 1-Amino-3-Iminopropen bridges (AIP Bridges), a damage resulting from the reaction of primary amino groups of protein with malondialdehyde, an end product of lipid peroxidation (11). Immunofluorescence experiments using an antibody against AIP showed an accumulation of this damage during senescence in both fibroblasts and keratinocytes. However, the sub-cellular localization of this damage was remarkably different in the two cell types: AIP bridges accumulated in senescent fibroblasts mainly in the cytoplasm, whereas they accumulated mainly in the nuclei of senescent keratinocytes (fig. 3).

This result suggesting that differences between fibroblasts and keratinocytes could concern the nuclear compartment, we then focused on DNA oxidative damage, specially DNA breaks and base oxidation which are the most frequent DNA oxidative damages (16-18). We used comet assays in denaturing alkaline conditions to detect single- and double-strand breaks. We observed an increase in the percentage of cells displaying DNA breaks at senescence in both cell types, but this increase was greater in keratinocytes than in fibroblasts (Fig. 4A). Moreover, the tail moments, which are a measure of the extent of DNA breaks per comet-positive cell, were nearly 2 fold higher in senescent keratinocytes than in senescent fibroblasts (fig. 4B). Therefore, at senescence, keratinocytes suffer from more DNA breaks than fibroblasts.

We next investigated the accumulation of 8-oxo-7-hydrodeoxyguanosine (8-oxo-dG), the most frequent base damage resulting from oxidative stress (19, 20). Immunofluorescence experiments showed that almost all fibroblasts and keratinocytes displayed 8-oxo-dG staining at senescence, with keratinocytes showing a more important staining intensity than fibroblasts (Fig. 4B). The staining was both cytoplasmic and nuclear. An analysis with a microscope equipped with an Apotome system that enables optic sections revealed that the nuclear staining co-localized with euchromatin areas. These foci of 8-oxo-dG in euchromatin were bigger in keratinocytes than in fibroblasts (fig. 4C). Taken together, these results indicate that keratinocytes accumulate more oxidative DNA damage than fibroblasts during senescence.

DNA oxidative damages are recapitulated in fibroblasts undergoing H₂O₂-induced senescence and emergence

In order to establish whether these DNA oxidative damages could contribute to PS emergence, we examined whether these alterations appear in young fibroblasts submitted to the H_2O_2 treatment that recapitulates senescence and PS emergence. DNA breaks, evidenced by comet assays, were induced as soon as 24h, in a dose response manner (Fig. 5A). Similarly, AIP bridges appeared in nearly 70% of H_2O_2 -induced senescent fibroblasts (Fig. 5B). Therefore, the DNA oxidative damages appearing at keratinocytes senescence are recapitulated in fibroblasts undergoing H_2O_2 -induced senescence and emergence, suggesting they could contribute to the phenomenon of PS emergence.

Keratinocytes are more prone than fibroblasts to undergo DNA damage and premature senescence upon oxidative stress

We next wanted to know whether the weaker accumulation of nuclear oxidative damages in fibroblasts than in keratinocytes could be explained by a higher resistance of these cells to oxidative stress. First, we compared the responsiveness of both cell types to H_2O_2 in term of premature senescence induction. Young NHDF and NHEK were treated with different concentrations of H_2O_2 , and after 3 days-treatment, proliferation and SA- β -gal activity were measured. Proliferation was significantly inhibited after H_2O_2 treatment in both cell types, but the effects were much more drastic in keratinocytes than in fibroblasts: keratinocytes were arrested at about 80% by 60μ M whereas fibroblasts were arrested at only 50% (fig. 6A).

Similarly, the SA- β -gal activity increased in both cell types following the H₂O₂ treatment, but the percentage of SA- β -Gal positive cells reached about 50% in keratinocytes, whereas it reached only 25% in fibroblasts (fig. 6B)

We also compared the sensitivity of fibroblast and keratinocyte nuclei to oxidative attacks. Cells were treated by H_2O_2 and the appearance of AIP-bridges was followed. They appeared in almost all keratinocyte nuclei after 48h treatment, whereas in the meantime almost no fibroblasts developed this damage (Fig. 6C)

Taken together these results indicate that fibroblasts are less prone than keratinocytes to undergo nuclear damage and premature senescence upon oxidative stress.

Enough long telomeres are necessary for emergence

We have shown in a previous work that PS emergent keratinocytes have not reactivated their telomerase, but have telomeres only slightly shortened, potentially explaining why they can undergo supplementary divisions (submitted article). Therefore, we postulated here that senescence in keratinocytes would not result from a telomere shortening as important as in fibroblasts. To test this hypothesis, we first compared telomere lengths at senescence in the two cell types. FISH experiments with a PNA probe specific for telomere sequence were performed on isogenic keratinocytes and fibroblasts in order to exclude any differences due to individual polymorphisms (21, 22). As expected, we observed a drastic decrease in telomere signal in fibroblasts at senescence (fig. 7A). In keratinocytes in contrast, most of the chromosomes displayed still long telomeres at senescence. Since it was shown that only few shortened telomere is sufficient to induce a cell cycle arrest (23), we counted the number of metaphases having at least one chromosome lacking a visible telomere. The percentage of such metaphases increased at senescence in both cell types, but two fold less in

keratinocytes than in fibroblasts (fig. 7B). Therefore, many senescent keratinocytes could have enough long telomeres to generate emerging cells with still a doubling potential.

In order to further support the notion that enough long telomeres are necessary for emergence, we speculated that senescent fibroblasts with their short telomeres should not be able to undergo emergence upon an oxidative stress as do their young counterparts with still short telomeres. We therefore treated in parallel NHDF at the exponential growth phase or near the senescent plateau by H_2O_2 until cells at the exponential growth phase enter a premature senescent plateau. We then stopped the treatment of both cultures, and monitored for emergence. As already shown in Fig1, cells treated when they were young did undergo emergence, whereas those treated when they were almost senescent did not and maintained in a senescent state for weeks before dying (fig. 8). From these results, we can conclude that shortened telomeres constitute a barrier against post-senescence emergence.

Senescent fibroblasts activate cell-cycle arrest pathways; senescent keratinocytes do not

It is established that shortened telomeres become uncapped, hence resembling damaged DNA. In senescent cells, shortened telomeres become associated with DNA damage response factors such as 53BP1, phosphorylated H2AX (γ -H2AX) and ATM (3). We performed comparative immunofluorescence experiments against 53BP1 and γ -H2AX in senescent NHDF and NHEK in order to detect putative differences in the activation of DNA damage pathways. Nearly 90% and 100% of senescent fibroblasts displayed γ -H2AX and 53BP1 foci respectively. In opposite, we observed only a slight increase in the percentage of keratinocytes displaying γ -H2AX foci at senescence, and a total absence of 53BP1 foci (Fig. 9). To investigate whether the H2AX and 53BP1 foci were associated with telomeres, we performed a codetection of these foci and of the telomeric protein TRF1. The results indicated that in senescent fibroblasts some but not all DNA damage foci are associated with telomeres

(Fig. 10). Therefore, fibroblasts at senescence activate DNA damage pathways in response to shorten telomeres and perhaps other double strand breaks. In contrast, senescent keratinocytes do not activate DNA-damage response pathways.

Discussion

In humans, carcinomas are the most frequent cancers and their incidence dramatically increases with advancing age, whereas sarcomas are much rarer and their incidence is not linked to age (NCI Statistics). Skin keratinocytes and fibroblasts resume these differences during their in vitro behavior. Indeed, moderately transformed and tumorigenic cells systematically and spontaneously emerge from the senescent plateau of keratinocytes, whereas fibroblasts are totally refractory to this phenomenon. Therefore, the post-senescence emergence of keratinocytes could be a relevant model to understand the molecular basis of cancer initiation. Taking advantage of the comparison of the molecular mechanisms involved in keratinocytes versus fibroblasts senescence, we show in this work that accumulation of oxidative DNA damages and telomere shortening are two elements that act in opposite directions for cancer initiation.

Senescence-associated oxidative DNA damage would be a mutagenic motor for cancer initiation

We show in this study that senescence in keratinocytes is accompanied by the accumulation of oxidative damages in the nucleus, including DNA breaks, 8-oxo-guanines and AIP bridges. In fibroblasts in contrast, most of the oxidative damages do not affect the nucleus. Both DNA breaks and 8-oxo-guanines are potentially mutagenic (19, 20, 24). Hence, senescent keratinocytes might accumulate stochastic mutations in numerous genes. The resulting perturbations might affect some key pathways whose deregulation might sustain emergence.

Senescent fibroblasts display less mutagenic DNA damages than keratinocytes. The question is why? Indeed, they accumulate the same amount of ROS at senescence than

keratinocytes and similarly express the most ubiquitous anti-oxydant enzymes. In addition, they repair DNA breaks induced by H_2O_2 at a speed similar to that of keratinocytes (data not shown). In contrast, they are more resistant to the effects of H_2O_2 -induced premature senescence and develop very few nuclear AIP bridges upon the H_2O_2 treatment. These AIP bridges, which are poorly studied in the literature, would affect the organization and functionality of the chromatin. Hence they would favor the occurrence of mutations by, for example favoring erroneous reparations.

Dysfunctionnal telomeres might severely impede escape from senescence

As already shown by others for different types of human fibroblasts (ref), we demonstrate here that senescent fibroblasts of dermal origin display short telomeres that induce the ATM DNA damage response pathway, as revealed by the presence of γ -H2AX and 53BP1 foci in the nucleus. The activation of the ATM pathway may block these cells in an irreversible cell cycle arrest that would inhibit the emergence of transformed cells from senescence. In contrast, senescent keratinocytes display still long telomeres at senescence, and the DNA damage response pathway involving γ -H2AX and 53BP1 is not induced at all, hence allowing these cells to resume proliferation. This total lack of ATM pathway activation is intriguing, because 15% of senescent keratinocytes do lack at least one telomere, and because more than 50% of senescent keratinocytes do have DNA breaks. A study similarly showed that the expression of the dominant-negative $TRF2^{\Delta B\Delta M}$ induces premature senescence in epidermal keratinocytes, but only a weak activation of DNA damage response pathways could be observed (25). One explanation could be that the breaks occurring in telomeres or elsewhere in the genome of keratinocytes would not be recognizable by the classical ATM pathway. Indeed, it was shown that the endogenous oxidative stress or the oxidative stress induced by low dose ionizing radiation can induce clustered DNA lesions, i.e.

more than one single-strand break and/or modified base in less than 10 bp, in the same or opposite strand. Although poorly studied, these clustered lesions were shown to be repair-resistant. For example, it was recently shown that a double-strand break with a 8-oxo-G in the vicinity of the ligatable extremities leads to both a decrease in the removal of the 8-oxo-G and a delay in the rejoining (26). The keratinocyte genome could especially suffer from this type of damage at senescence, since we have previously shown that the occurrence of senescence in this cell type is mainly dependent on oxidative stress (10). Moreover, it was demonstrated that the telomere sequence is highly sensitive to oxidative damages (27, 28). Hence, the rare shortened telomeres in senescent keratinocytes would not be recognized by the ATM pathway because of the presence in the vicinity of the chromosomal end of an oxidative damage to a base.

Conclusion

The outcome of senescence might be diametrically opposed when considering fibroblasts or keratinocytes. Senescence in fibroblasts seems to be driven mainly by telomere erosion, whereas senescent epithelial cells keep relatively long telomeres and seem suffering mainly from oxidative stress. Fibroblasts seem less sensitive to ROS insults than keratinocytes. Consequently, senescent fibroblasts have reached a telomere limit, which persistently activates cell-cycle arrest pathways, and have a genome still poorly damaged. As a result, they can not further evolve neither towards immortalization nor transformation. Senescence for these cells might indeed be tumour-suppressor. In contrast, keratinocytes at senescence are arrested, not because of shortened telomeres, but probably because of general oxidative damage, and could accumulate numerous mutations of oxidative origin. Therefore, senescence in these cells would not be irreversible and could be overcome owing to these mutations; as such, senescence has to be considered as a tumour-promoter state.

From these in vitro results, we can speculate that aging-associated oxidative DNA damages could favour the initial steps of cancer initiation. Amongst the multiple studies evidencing the presence of oxidative DNA damage in cancer cells, some demonstrate their presence already in early lesions at levels lower (29, 30), similar (31), or even greater (32) than in high grade progressing tumours, supporting the notion that the initial events in tumorigenesis could be of oxidative origin. This notion is also supported by caloric restriction (CR) experiments. CR is able to dramatically extend lifespan in mammals and other organisms. It also reduces the occurrence of age-associated diseases, including cancer (33). Mechanisms by which CR proceeds are not completely clear, but growing body of evidence involves oxidative stress. It was shown that CR decreases the rate of mitochondrial H_2O_2 production (34) and mitochondrial and nuclear accumulation of 80xoG(35), resulting in a decrease in spontaneous and induced mutations(36, 37). Hence, CR, this very physiological experiment at the level of an entire organism, highlights the causative links between aging, tumor occurrence and DNA oxidative damage.

Acknowledgements

We wish to thank Julie Bertout at the IBL FACS facility, Sébastien Pinte for technical help and expertise in TIF analysis, Géraldine Pottier for excellent technical help in Telo-FISH analysis. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, Universities Lille 1 and Lille 2, the PPF Bioinformatique of the Lille 1 University, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Ligue contre le Cancer (comités du Nord et de l'Aisne), the Institut Pasteur de Lille, the Conseil Régional Nord/Pasde-Calais, the European Regional Development Fund, the European Integrated Project RISC-RAD, contract number FI6R-CT2003-508842, and Contract EDF V3-103. EG's laboratory is supported by the Ligue Nationale contre le Cancer, équipe labellisée. S. Martien had a fellowship from the French Ministry of Research and from the Fondation pour la Recherche Médicale. K. Gosselin had a fellowship from the Institut Pasteur de Lille and the Région Nord/Pas-de-Calais and from the Société Française du Cancer. P. Ostoich is funded by the CEA.

Figure legends

Figure 1 – Induction of oxidative stress with H_2O_2 recapitulates senescence and emergence in fibroblasts

Young fibroblasts were treated with 50 μ M H₂O₂, every 48h. The treatment was stopped after the induction of a stable senescence growth plateau and then cells were followed for emergence. (A) Growth curve. Cells were subcultured at 70% confluence, counted and the population doubling number was calculated. This experience was performed in triplicate. Each bar represents the mean +/- SD of the 3 counts. The length of the H₂O₂ treatment is indicated on the growth curve by a bar. (B) Percentage of SA- β -gal positive cells at day 15, during the H2O2 induced growth plateau, and 52 during emergence. Each bar represents the mean +/- SD of the 3 counts. P values were calculated using t-test. *** signifies p<0.001 (C) Observation of the cell morphology under a contrast phase microscope at day 15 (H₂O2induced plateau) and 52 (emergence). At 52 days, note the presence of a large senescent cell underlined by a dotted line, from which a string of small cells (arrows) seem to emerge. Bar represents 100 μ m.

Figure 2 – Redox status of senescent fibroblasts and keratinocytes

(A) Measurement of ROS level using a DCFDA probe. Young and senescent NHDFs or NHEKs were stained with DCFDA as indicated in Materials and Methods and the fluorescence intensity was measured using a cytometer with FITC filter. 10 000 events were measured for each condition. Histograms represent the means +/- SD of 2 measures. (B) Western blot analysis of total proteins extracted from young and senescent NDDFs and NHEKs for the main antioxidant enzymes: manganese superoxide dismutase (MnSOD), cupper/zinc superoxide dismutase (Cu/ZnSOD), catalase (Cat), glutathion peroxidase (GPx)

and peroxiredoxin (Prx). PCNA was used to ascertain the stage at which the protein extracts were performed, and actin was used as a loading control.

Figure 3 – Senescent keratinocytes display more AIP bridges in the nucleus than senescent fibroblasts

(A) Immunofluorescence anti-AIP bridges were performed with fibroblasts and keratinocytes at young and senescent stages. Bar represents $25\mu m$ (B) Cells displaying an AIP bridge staining in their nucleus were counted on 5 different microscopic fields. The percentages (%) of AIP bridge-positive nuclei are given as the mean +/- SD of the 5 counts. P values were calculated using t-test. *** signifies p<0.001

Figure 4 – Senescent keratinocytes display more DNA damages than senescent fibroblasts

(A) Comet assays were performed on young and senescent cells in alkaline conditions (pH>13) to detect single- and double-strand breaks. The percentage (%) of comet-positive cells was assessed in each condition. Each bar represents the mean +/- SD of 10 random counts. Tail moments of comet-positive cells were calculated as described in materials and methods. Each bar represents the mean +/- SD of 22 measures. P values were calculated using a t-test. * signifies p<0.05, and *** p<0.001 (B) Immuno-staining experiments using an anti-8-oxo-dG antibody. Cells were analysed by an epifluorescent microscope. An overlay of Hoechst (blue) and 8-oxo-dG (orange) is presented. (C) Cells were also analysed with a microscop equipped with the Apotome system. An enlargement of a cross-section of nuclei is given. Note that the 8-oxo-dG signals co-localise preferentially in euchromatin. Bar represents 25μ m.

Figure 5 – DNA oxidative damages typical of senescent keratinocytes are recapitulated in fibroblasts undergoing H₂O₂-induced senescence and emergence

(A) Cells were treated with H_2O_2 at different concentrations (0, 30, 60, 120µM). Comet assays were performed after 24h of treatment and the number of comet-positive cells was counted. Each bar represents the mean +/- SD of 9 random counts. (B) Immunofluorescence against AIP bridges was performed after induction of premature senescence with 50 µM H_2O_2 as described in fig.1. Bar represents 25µm. The percentage of AIP-positive nuclei was calculated. Histogram presents means +/- SD of 12 random counts. P values were calculated using a t-test. *** signifies p<0.001

Figure 6 – Keratinocytes are more prone than fibroblasts to undergo DNA damage and premature senescence upon oxidative stress

Cells were treated with different H_2O_2 concentrations (0, 30, 60, 120µM) or not treated (NT). The experiment was done in triplicate (A) Cells were harvested and counted 72h after the treatment. The increase in cell number during the treatment was normalized to 1 in non treated cells. (B) SA-β-gal assays were performed on cells after 72h after the treatment. Each bar represents the mean +/- SD of SA-β-Gal-positive cells. (C) Cells were treated with 50µM H_2O_2 or non treated (NT), and AIP bridges were checked by immunofluorescence after 5, 24 and 48h. Each bar represents the mean +/- SD of 2 counts. ** signifies p<0.01, and ***

Figure 7 – TeloFISH analysis of telomere erosion during senescence of fibroblasts and keratinocytes.

(A) Fluorescent in situ hybridization experiments were performed with a PNA probe specific of telomeric sequence (TeloFISH) (pink signal). Chromosomes were counterstained with

Hoechst (blue signal). (B) Metaphases missing at least one visible telomere were counted amongst 30 to 74 total metaphases. The results are given as a percentage (%).

Figure 8 – Enough long telomere are necessary for post-senescence emergence

Young fibroblasts (A) and pre-senescent fibroblasts (B) were treated with 50μ M H₂O₂ as in Fig.1. The length of the H₂O₂ treatment is indicated on the growth curve by a bar. The induction of the senescent phenotype was assessed by a SA- β -gal analysis as in Fig.1. After induction of the senescent phenotype in both conditions, the treatment was stopped and the occurrence of emergence was followed. The experiments were done in triplicate. Growth curves were performed as in Fig.1.

Figure 9 – 53BP1 and γ-H2AX foci in senescent fibroblasts and keratinocytes

(A) Immunofluorescence experiments against 53BP1 (green) and γ -H2AX (red) were performed. Nuclei were counterstained by Hoechst (blue) in the detection of γ -H2AX foci. Overlays of γ -H2AX and Hoechst are given. Bar represents 20µm (B) The percentage (%) of positive nuclei for 53BP1 and γ -H2AX foci was calculated.

Figure 10 – Telomere dysfunction-induced foci (TIF) in senescent fibroblasts

Immunostaining of 53BP1 (green) and TRF1 (red) in senescent fibroblasts. The arrows point the co-localization of TRF1 with 53BP1 corresponding to telomere dysfunction-induced foci (TIF).

References

- 1. Hayflick, L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. Exp Cell Res, *37:* 614-636, 1965.
- 2. Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., and et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A, *92*: 9363-9367, 1995.
- 3. d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P., and Jackson, S. P. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. Nature, *426*: 194-198, 2003.
- 4. Lo, A. W., Sabatier, L., Fouladi, B., Pottier, G., Ricoul, M., and Murnane, J. P. DNA amplification by breakage/fusion/bridge cycles initiated by spontaneous telomere loss in a human cancer cell line. Neoplasia, *4*: 531-538, 2002.
- 5. Campisi, J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. Trends Cell Biol, *11*: S27-31, 2001.
- 6. Romanov, S. R., Kozakiewicz, B. K., Holst, C. R., Stampfer, M. R., Haupt, L. M., and Tlsty, T. D. Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. Nature, *409:* 633-637, 2001.
- 7. Shay, J. W. and Wright, W. E. Quantitation of the frequency of immortalization of normal human diploid fibroblasts by SV40 large T-antigen. Exp Cell Res, *184:* 109-118, 1989.
- 8. Huschtscha, L. I. and Holliday, R. Limited and unlimited growth of SV40-transformed cells from human diploid MRC-5 fibroblasts. J Cell Sci, *63*: 77-99, 1983.
- 9. Garbe, J. C., Holst, C. R., Bassett, E., Tlsty, T., and Stampfer, M. R. Inactivation of p53 function in cultured human mammary epithelial cells turns the telomere-length dependent senescence barrier from agonescence into crisis. Cell Cycle, *6*: 1927-1936, 2007.
- 10. Bernard, D., Gosselin, K., Monte, D., Vercamer, C., Bouali, F., Pourtier, A., Vandenbunder, B., and Abbadie, C. Involvement of Rel/nuclear factor-kappaB transcription factors in keratinocyte senescence. Cancer Res, *64:* 472-481, 2004.
- Martinon, O., Poulet, J. P., Chancerelle, Y., Viret-Soropogui, R., Mathieu, J., and Kergonou, J. F. Immunization of mice with proteins reacted with malonic dialdehyde (MDA): comparison between autologous and heterologous modified proteins. Biochem Mol Biol Int, *34*: 135-145, 1994.
- 12. Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J. D., Yan, L. J., and Ames, B. N. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 92: 4337-4341, 1995.
- 13. Wolf, F. I., Torsello, A., Covacci, V., Fasanella, S., Montanari, M., Boninsegna, A., and Cittadini, A. Oxidative DNA damage as a marker of aging in WI-38 human fibroblasts. Exp Gerontol, *37:* 647-656, 2002.
- 14. Kaneko, T., Tahara, S., Taguchi, T., and Kondo, H. Accumulation of oxidative DNA damage, 8-oxo-2'-deoxyguanosine, and change of repair systems during in vitro cellular aging of cultured human skin fibroblasts. Mutat Res, *487:* 19-30, 2001.
- 15. Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. Nat Cell Biol, *5:* 741-747, 2003.

- 16. Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. Faseb J, *17*: 1195-1214, 2003.
- 17. Marnett, L. J. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis, *21*: 361-370, 2000.
- 18. Klaunig, J. E. and Kamendulis, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. Annu Rev Pharmacol Toxicol, *44*: 239-267, 2004.
- 19. Sekiguchi, M. and Tsuzuki, T. Oxidative nucleotide damage: consequences and prevention. Oncogene, *21:* 8895-8904, 2002.
- 20. Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S., and Loeb, L. A. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. J Biol Chem, *267:* 166-172, 1992.
- 21. Gilson, E. and Londono-Vallejo, A. Telomere length profiles in humans: all ends are not equal. Cell Cycle, *6*: 2486-2494, 2007.
- 22. Londono-Vallejo, J. A. Telomere length heterogeneity and chromosome instability. Cancer Lett, *212*: 135-144, 2004.
- 23. Zou, Y., Sfeir, A., Gryaznov, S. M., Shay, J. W., and Wright, W. E. Does a sentinel or a subset of short telomeres determine replicative senescence? Mol Biol Cell, *15:* 3709-3718, 2004.
- 24. Caldecott, K. W. Protein-protein interactions during mammalian DNA single-strand break repair. Biochem Soc Trans, *31*: 247-251, 2003.
- 25. Minty, F., Thurlow, J. K., Harrison, P. R., and Parkinson, E. K. Telomere dysfunction in human keratinocytes elicits senescence and a novel transcription profile. Exp Cell Res, *314*: 2434-2447, 2008.
- 26. Dobbs, T. A., Palmer, P., Maniou, Z., Lomax, M. E., and O'Neill, P. Interplay of two major repair pathways in the processing of complex double-strand DNA breaks. DNA Repair (Amst), *7*: 1372-1383, 2008.
- 27. von Zglinicki, T., Saretzki, G., Docke, W., and Lotze, C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? Exp Cell Res, *220*: 186-193, 1995.
- 28. Opresko, P. L., Fan, J., Danzy, S., Wilson, D. M., 3rd, and Bohr, V. A. Oxidative damage in telomeric DNA disrupts recognition by TRF1 and TRF2. Nucleic Acids Res, *33*: 1230-1239, 2005.
- 29. Zannoni, G. F., Faraglia, B., Tarquini, E., Camerini, A., Vrijens, K., Migaldi, M., Cittadini, A., and Sgambato, A. Expression of the CDK inhibitor p27kip1 and oxidative DNA damage in non-neoplastic and neoplastic vulvar epithelial lesions. Mod Pathol, *19:* 504-513, 2006.
- 30. Karihtala, P., Winqvist, R., Syvaoja, J. E., Kinnula, V. L., and Soini, Y. Increasing oxidative damage and loss of mismatch repair enzymes during breast carcinogenesis. Eur J Cancer, *42*: 2653-2659, 2006.
- 31. Tsurudome, Y., Hirano, T., Hirata, K., Higure, A., Nagata, N., Takahashi, K., Itoh, H., and Kasai, H. Age-associated increase of 8-hydroxydeoxyguanosine in human colorectal tissue DNA. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, *56:* B483-485, 2001.
- 32. Matsui, A., Ikeda, T., Enomoto, K., Hosoda, K., Nakashima, H., Omae, K., Watanabe, M., Hibi, T., and Kitajima, M. Increased formation of oxidative DNA damage, 8hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. Cancer Lett, *151:* 87-95, 2000.
- 33. Hart, R. W. and Turturro, A. Dietary restrictions and cancer. Environ Health Perspect, *105 Suppl 4:* 989-992, 1997.
- 34. Gredilla, R., Sanz, A., Lopez-Torres, M., and Barja, G. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. Faseb J, *15*: 1589-1591, 2001.

- 35. Hamilton, M. L., Van Remmen, H., Drake, J. A., Yang, H., Guo, Z. M., Kewitt, K., Walter, C. A., and Richardson, A. Does oxidative damage to DNA increase with age? Proc Natl Acad Sci U S A, *98*: 10469-10474, 2001.
- 36. Casciano, D. A., Chou, M., Lyn-Cook, L. E., and Aidoo, A. Calorie restriction modulates chemically induced in vivo somatic mutation frequency. Environ Mol Mutagen, *27*: 162-164, 1996.
- 37. Dempsey, J. L., Pfeiffer, M., and Morley, A. A. Effect of dietary restriction on in vivo somatic mutation in mice. Mutat Res, *291*: 141-145, 1993.











В

Α



		Young	Senescent
Fibroblasts	Hoechst		
	AIP (Rhodamine)		
locytes	Hoechst		
Keratin	AIP (Rhodamine)		

В

Α





С

В

Fibroblasts

Keratinocytes



Keratinocytes Fibroblasts

Senescent





В









Hours after treatment

Α



Α

Keratinocytes

В





53BP1





53BP1 γΗ2ΑΧ В 100 100 %of 53BP1-positive nuclei %of γ H2AX-positive nuclei 80 80 60 60 40 40 20 20 0 0 Senesc. Young Young Senesc. Young Senesc. Young Senesc. Fibroblasts Keratinocytes Fibroblasts Keratinocytes



Young

Senescent

DISCUSSION

1. LES FIBROBLASTES ET LES KERATINOCYTES DE PEAU PRESENTENT DES MECANISMES DE SENESCENCE DIFFERENTS

Deux principaux mécanismes sont impliqués dans la sénescence : le raccourcissement des télomères et l'accumulation de dommages oxydants. Nous montrons que ces deux mécanismes sont impliqués à des degrés différents dans les fibroblastes et les kératinocytes de peau.

1.1. Importance relative des ROS dans la sénescence et la mort des kératinocytes et des fibroblastes

Au laboratoire, il a été montré que la sénescence des kératinocytes s'accompagne d'une augmentation de l'activité des facteurs Rel/NF- κ B, entrainant l'induction d'un de leurs gènes cibles, la MnSOD, et ainsi l'accumulation de H₂O₂. Cette accumulation de ROS est responsable en partie de l'établissement du phénotype sénescent, tant d'un point de vue altérations cellulaires que d'un point de vue arrêt dans le cycle. De plus, dans la plupart des cellules sénescentes, les altérations oxydantes induites par cette voie MnSOD>H₂O₂ semblent suffisantes pour induire la mort par macro-autophagie.

Dans les fibroblastes, nous n'observons pas d'augmentation de l'activité Rel/NF-κB au cours de la sénescence (donnée non publiée). Cependant, nous observons quand même une augmentation d'expression de la MnSOD qui est accompagnée par une élévation du niveau de ROS à des taux comparables à ceux observés dans les kératinocytes sénescents. Malgré cette augmentation du niveau de stress oxydant au cours de la sénescence, la culture des fibroblastes en présence de différents antioxydants ne retarde pas de manière significative leur sénescence, suggérant que les ROS ne sont pas l'inducteur principal de la sénescence normale des fibroblastes. De même, les fibroblastes sénescents étant très peu enclins à mourir, les dommages induits par ces ROS seraient insuffisants pour activer un processus macro-autophagique létal.

1.2. Importance relative du raccourcissement des télomères dans la sénescence des kératinocytes et des fibroblastes

Il est maintenant bien décrit que la sénescence des fibroblastes est essentiellement dépendante des télomères (Bodnar et al., 1998; Hayflick, 2000). Les télomères raccourcis et déprotégés sont reconnus comme des cassures double-brin induisant une réponse aux dommages à l'ADN, ce qui entraine un arrêt du cycle cellulaire. Nous montrons par des expériences de FISH avec une sonde spécifique des télomères que les kératinocytes, contrairement aux fibroblastes, conservent

à la sénescence une taille de télomère relativement longue. De plus, dans les fibroblastes sénescents, nous mettons en évidence une induction massive des voies de réponse aux dommages à l'ADN de type cassure double-brin, révélée par la présence de nombreux foyers γ H₂AX et 53BP1. A l'inverse, dans les kératinocytes sénescents, nous n'avons pas observé l'induction de ces voies de réponse aux cassures double-brin. Ainsi, contrairement aux fibroblastes, la sénescence des kératinocytes ne dépendrait pas du raccourcissement des télomères.

1.3. Rôle de la COX-2, des prostaglandines et du glutathion dans la sénescence des fibroblastes

La sénescence normale des fibroblastes ou induite par un stress oxydant ou oncogénique s'accompagne de l'induction de l'expression de la COX-2 et de l'augmentation de la production de PGE₂, la prostaglandine majoritaire dans la plupart des tissus. La PGE₂ induit la sénescence de manière auto-/paracrine probablement *via* les récepteur EP couplés aux protéines G, mais également et surtout de manière intracrine. Nous démontrons que l'augmentation de la concentration intracellulaire en PGE₂ engendre une déplétion du stock de GSH qui contribue à l'établissement du phénotype sénescent. Ce dernier résultat peut paraitre en contradiction avec le fait que des traitements antioxydants ne retardent pas de manière significative la survenue du plateau de sénescence des fibroblastes. En fait, les traitements antioxydants utilisés dans nos expériences ciblent directement les ROS en les chélatant ou en les dégradant. Le glutathion libre agit quant à lui principalement sur les ponts disulphures (voir chapitre 1.3.e de l'introduction). C'est donc ce type d'altération oxydante, plus qu'une accumulation de ROS qui pourrait contribuer à la sénescence des fibroblastes.

Ainsi les mécanismes de sénescence des kératinocytes d'épiderme et de fibroblastes de derme semblent différents. La sénescence des kératinocytes est au moins en partie provoquée par l'accumulation de H₂O₂ induite par la voie Rel/NF-κB>MnSOD. Cette accumulation de H₂O₂ contribuerait à la fois à altérer la morphologie et le fonctionnement cellulaire et à induire l'arrêt dans le cycle. Ce mécanisme serait dominant par rapport au raccourcissement télomérique, car la sénescence des kératinocytes survient assez rapidement, alors que les télomères sont encore longs et protégés. Les fibroblastes au contraire semblent présenter une sénescence indépendante des facteurs Rel/NF-κB. Les ROS qui s'accumulent à la sénescence ne contribueraient qu'à induire des altérations morphologiques, *via* des dommages type ponts disulphure aux protéines, et leurs effets seraient favorisés par une déplétion en GSH. L'arrêt dans le cycle, qui intervient bien plus tardivement que dans les kératinocytes, serait la conséquence presque exclusive du raccourcissement des télomères. En effet, la seule expression ectopique de la télomérase dans ces cellules suffit à outrepasser le plateau de sénescence (Bodnar et al., 1998) alors qu'un traitement catalase ne fait que légèrement atténuer les altérations morphologiques sans retarder la survenue du plateau de croissance.

2. DES CELLULES TRANSFORMEES ET TUMORIGENES SONT CAPABLES D'EMERGER DE CELLULES EPITHELIALES SENESCENTES

2.1. Les cellules qui émergent du plateau de sénescence des kératinocytes sont transformées et tumorigènes bien que non immortalisées

Au cours du plateau de sénescence, les kératinocytes meurent massivement par autophagie en réponse à l'accumulation de nombreux dommages oxydants au noyau et aux mitochondries. Cependant, moins de 1% de ces cellules échappent à la mort par autophagie et génèrent de nouvelles cellules ayant perdu les caractéristiques de cellules sénescentes : elles ne présentent plus de vacuoles, ni d'activité SA- β -gal et elles expriment PCNA, un marqueur de prolifération, à un niveau comparable à celui des cellules jeunes. Ces cellules apparaissent en foyer, et ce à proximité des cellules sénescentes dont elles proviennent. Elles effectuent une dizaine de doublement avant d'entrer dans un second plateau de croissance qui partage certaines caractéristiques avec le plateau de sénescence dont une morphologie étalée, la présence de nombreuses vacuoles et une activité SA- β -gal. Puis, à une fréquence plus faible de l'ordre de 10⁻⁶-10⁻⁵, une seconde émergence a lieu à l'issu de ce second plateau. Ces secondes cellules émergentes, les ImK, ont une morphologie plus transformée que les précédentes et une durée de vie encore allongée.

Les cellules émergentes issues des deux plateaux présentent des caractères de transformation. Dans les ImK, ces caractères semblent plus marqués. En particulier, seules les ImK présentent des aberrations caryotypiques suggérant une instabilité chromosomique. Néanmoins, les deux types de cellules émergentes sont tumorigènes en souris *nude*. Elles forment après un délai d'au moins 8 mois après injection sous-cutannée des lésions métastatiques au niveau de la peau, de type carcinome non mélanocytaire, ainsi que dans de nombreux autres organes.

Nous ne nous attendions pas à ce que les premières cellules émergentes dont le génome est globalement normal forment des tumeurs. Nous ne savons pas à l'heure actuelle si les cellules émergentes en elles-mêmes sont capables de former des lésions métastatiques, ou bien si d'autres événements, notamment génétiques, ont pu se produire *in situ*, et leur permettre une évolution maligne. La recherche de marqueurs spécifiques aux cellules émergentes et ImK, ou de modifications génétiques présentes dans les lésions pourrait nous permettre d'éclaircir ce point. De plus, nous sommes actuellement en train de rechercher des modifications génétiques discrètes dans les cellules émergentes, type délétions/amplifications et mutations ponctuelles qui pourraient expliquer leur potentiel tumorigène.

Une émergence de cellules transformées similaire à celle que nous décrivons a été rapportée dans les cellules épithéliales mammaires (Romanov et al., 2001). Cependant, ces cellules n'ont pas été décrites comme tumorigènes. En effet, le délai d'obtention des lésions métastatiques a été très long, ce qui expliquerait que nos collègues ne l'aient pas observé. Ce long délai pourrait refléter le fait comme mentionné ci-dessus que des événements génétiques supplémentaires ayant lieu in vivo

soient nécessaires. Cela pourrait refléter aussi le fait que ces tumeurs ne peuvent se développer que dans un environnement devenu lui aussi vieillissant. Un étudiant dans notre équipe travaille actuellement sur cette hypothèse et ses résultats préliminaires semblent aller dans ce sens.

Enfin, il faut noter que les cellules émergentes comme les ImK sont tumorigènes alors qu'elles ne sont pas immortalisées. Nous avons en effet quelques éléments in vitro indiquant que les ImK atteignent un troisième plateau après un maximum de 60 doublements. Nous pensons, sans l'avoir pour l'instant vérifié, que les cellules pourraient avoir à ce stade épuisé leur potentiel télomérique, car ce nombre de doublements correspond au nombre maximal de doublements effectués par des fibroblastes isogéniques. Donc, ce seul allongement de durée de vie sans véritable immortalisation serait suffisant pour générer des tumeurs *in vivo*. Il a été montré que chez la souris seulement 40 à 50 divisions sont nécessaires à une cellule unique pour générer une tumeur mesurable (Blasco et al., 1997).

2.2. Les cellules sénescentes donnent naissance aux cellules émergentes par bourgeonnement

Par différentes approches, nous montrons que les cellules émergentes proviennent bien des cellules sénescentes, et ne sont pas le fait d'une sous population de cellules présentes dans la culture à l'origine, comme des cellules souches ou des cellules déjà pré-transformées qui seraient contresélectionnées au plateau de sénescence. Le mécanisme par lequel les cellules sénescentes donnent naissance aux cellules émergentes est tout à fait différent de ceux classiquement connus dans le domaine de la division cellulaire normale. La cellule sénescente subit une multinucléation via un processus encore non élucidé mais qui pourrait s'apparenter à de l'endomitose, c'est-à-dire des mitoses sans cytokinèse. La cellule sénescente devenue alors polynuclée donne naissance aux cellules émergentes par un processus de bourgeonnement. Les noyaux néoformés sont libérés via des cytokinèses asymétriques ou par une mitose supplémentaire asymétrique et donnent naissance à des cellules émergentes de petite taille. Ces cellules filles se divisent ensuite par un mécanisme de mitose classique. Ce mécanisme de division a déjà été décrit par deux équipes et a été nommé « néosis » (Sundaram et al., 2004; Walen, 2004) et ce type de division a été associé à la transformation des cellules. Nous n'avons pour l'instant abordé aucun des mécanismes contrôlant ce type de division. Nous ne savons pas non plus si ce mécanisme peut avoir lieu *in vivo*. Cependant, la mise en évidence de la présence de cellules sénescentes dans les tumeurs bénignes mélanocytaires (Gray-Schopfer et al., 2006), de la prostate (Choi et al., 2000) ou d'autres organes (Burnworth et al., 2007; Collado et al., 2005; Paradis et al., 2001) va dans ce sens.

3. Les dommages a l'adn : un element cle du devenir des cellules senescentes

Ainsi, après avoir effectué un nombre de divisions limité dans le temps, les kératinocytes entrent en sénescence, puis meurent massivement par autophagie. Cependant, un petit nombre de cellules échappe au processus de mort et donne naissance à des cellules présentant des caractéristiques transformées capables d'évoluer vers un phénotype pleinement malin. Nous proposons que ce phénomène d'émergence à partir de la sénescence constitue un modèle *in vitro* d'initiation cancéreuse des cellules épithéliales. Utilisant ce modèle, nous avons étudié les mécanismes impliqués dans l'initiation cancéreuse, et nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle du stress oxydant.

3.1. Les dommages oxydants à l'ADN : le moteur mutagénique de l'initiation cancéreuse

La sénescence des kératinocytes s'accompagne de l'activation de la voie NF-κB>MnSOD>H₂O₂. Il s'avère que cette voie, de par les dommages oxydants qu'elle entraine, participe à l'initiation cancéreuse des kératinocytes. En effet, nous montrons que la sénescence des kératinocytes s'accompagne de l'accumulation de dommages oxydants à l'ADN dont des cassures simple-brin et des 8-oxo-dG. Ces dommages sont mutagènes ; ils peuvent notamment engendrer la création de mutations ponctuelles (Caldecott, 2003; Cheng et al., 1992; Sekiguchi & Tsuzuki, 2002). Ces dommages sont nécessaires à l'émergence puisque l'inhibition de la voie Rel/NF-κB, ou la réduction du niveau de stress oxydant retarde la survenue de la sénescence des kératinocytes et diminue la fréquence d'émergence des kératinocytes. Dans des fibroblastes jeunes, qui n'émergent jamais spontanément, l'induction d'un stress oxydant avec des traitements prolongés et sub-toxiques de H₂O₂ permet l'induction d'une sénescence prématurée et l'émergence de clones à partir des cellules sénescentes. L'étude comparative du statut redox des fibroblastes et kératinocytes à la sénescence nous a permis de montrer que les kératinocytes accumulent d'avantage de ces dommages oxydants à l'ADN au cours de la sénescence.

Ainsi, les dommages oxydants à l'ADN associées à la sénescence joueraient un rôle essentiel dans l'initiation cancéreuse. Ces dommages à l'ADN favoriseraient l'accumulation de mutations affectant un cocktail d'oncogènes, suppresseur de tumeurs, ou autres régulateurs de la différenciation ou mort cellulaire initiant l'émergence de cellules transformées à partir de la sénescence. Dans les fibroblastes, le niveau de dommages oxydants à l'ADN serait insuffisant pour permettre une telle émergence. Nous recherchons actuellement les gènes affectés dans les kératinocytes émergents par des approches à grande échelle type CGH et SNP arrays. Nous vérifierons que ces gènes sont aussi affectés dans des fibroblastes qui ont été induits à sénescer et émerger par traitement H₂O₂.

3.2. Les dommages télomériques: un frein à l'initiation cancéreuse ?

Les télomères raccourcis, source d'instabilité génétique, sont reconnus comme des cassures double-brin induisant une réponse aux dommages à l'ADN ce qui entraine un arrêt du cycle. Ce mécanisme constitue ainsi une barrière au développement tumoral en empêchant la prolifération de cellules potentiellement devenues instables génétiquement de part leurs télomères raccourcis. Nous montrons dans ces travaux que l'état des télomères joue un rôle important dans l'initiation cancéreuse. En effet, les kératinocytes, contrairement aux fibroblastes, conservent à la sénescence une taille de télomères relativement longue, leur conférant ainsi un potentiel prolifératif, et n'activent pas les voies d'arrêt dans le cycle. Au contraire, dans les fibroblastes sénescents, les télomères sont très courts, et l'induction massive des voies de réponse aux dommages à l'ADN maintiendrait les cellules dans un arrêt de croissance irréversible faisant obstacle à toute transformation néoplasique.

Ce rôle suppresseur de tumeur des télomères dysfonctionnels est appuyé par différentes études menées sur des modèles de souris déficientes pour l'activité télomérase. Comme il a été décrit en introduction, les souris possèdent des télomères très longs et maintiennent une activité télomérase dans la plupart des tissus à l'âge adulte. Afin d'étudier le rôle des télomères dans le vieillissement et la tumorigenèse, des modèles de souris déficientes pour la télomérase ont été développés. Dans ces modèles, il faut attendre 5 à 6 générations avant d'obtenir des souris présentant des télomères raccourcis. Le rôle suppresseur de tumeur des télomères raccourcis est illustré dans un modèle de souris *mTERC^{-/-} Apc^{Min}*. Les souris Apc^{Min} développent des microadénomes intestinaux bénins et des macroadénomes suite à la perte de l'allèle sauvage Apc. Dans les générations précoces de souris mTERC^{-/-} Apc^{Min}, il est observé une prédominance d'adénome à des stades précoces qui pour la plupart progressent vers la forme plus agressive de macroadénome. A l'inverse, dans des souris mTERC^{-/-} Apc^{Min} de 6^{ème} génération, seule la présence de microadénomes est relevée (Rudolph et al., 2001). Dans des modèles de lymphome de Burkitt, des souris transgéniques Eµ-Myc ont été croisées avec des souris mTerc-/-. Dans ces souris, la formation de tumeur est fortement diminuée dans les générations les plus avancées (Feldser & Greider, 2007). Les auteurs montrent que la sénescence joue un rôle dans la suppression des tumeurs dans ce modèle. L'induction de la sénescence et son rôle dans la suppression de la croissance tumorale a été également décrite dans les souris $mTERC^{\prime-}$ $53^{p/p}$ (Cosme-Blanco et al., 2007).

Bien qu'activant les voies d'arrêt dans le cycle, des télomères dysfonctionnels induisent aussi de l'instabilité génétique qui pourrait être promoteur de tumorigenèse. La protéine suppresseur de tumeur p53 pourrait jouer un rôle clé dans la dualité suppresseur *versus* promoteur de tumeur. En effet, des télomères déprotégés sont reconnus comme des cassures double-brin et induisent un arrêt du cycle dépendant de p53 (Gire & Wynford-Thomas, 1998). Dans un modèle de souris *mTERC*^{-/-}, la perte de p53 provoque une augmentation des fusions télomériques et une accélération de la carcinogenèse. Les cellules issues de ces souris montrent une susceptibilité accrue à la transformation par Myc et Ras (Cosme-Blanco et al., 2007). A l'inverse, dans des modèles de souris présentant une protéine p53 encore fonctionnelle, les télomères raccourcis inhibent la croissance des

tumeurs en induisant un programme d'arrêt du cycle et en induisant la sénescence ou la mort des cellules par apoptose (Feldser & Greider, 2007; Rudolph et al., 2001). Ces données confirment le rôle primordial de p53 dans la suppression tumorale, mis en exergue par le fait que p53 est inactif dans plus de 60% des cancers humains (Lowe et al., 2004).

Ainsi, dans les kératinocytes sénescents des télomères ayant conservé une taille relativement longue laisseraient à ces cellules un potentiel prolifératif. Leur arrêt dans le cycle cellulaire serait principalement le résultat de dommages oxydants et serait réversible. De plus, ce stress oxydant pourrait engendrer dans ces cellules l'accumulation de mutations favorables la transformation et/ou la prolifération. Dans les fibroblastes, les télomères devenus très courts induiraient un arrêt irréversible du cycle s'opposant à toute émergence tumorale. De plus, les dommages oxydants nucléaires subits par ces cellules pourraient être trop faibles pour être transformants.

4. LA SENESCENCE : ETAPE INITIALE VERS LA CARCINOGENESE ?

4.1. L'initiation cancéreuse passe par la sénescence, pas par son évitement

La sénescence est généralement considérée comme une barrière à la tumorigenèse car elle arrête de manière irréversible dans le cycle des cellules endommagées, c'est-à-dire potentiellement devenues cancéreuses. Cependant, nos résultats semblent indiquer que la sénescence pourrait constituer une étape initiale de la carcinogenèse : dans les cellules épithéliales, les cellules sénescentes peuvent donner naissance à des cellules transformées et tumorigènes. Ainsi la carcinogenèse pourrait avoir comme étape initiale la sénescence et non l'échappement à la sénescence. Le stress oxydant jouerait un rôle important dans ce processus de cancérisation et constituerait un carcinogène endogène. En revanche, dans les fibroblastes, puisque la sénescence est accompagnée d'un fort raccourcissement télomérique, toute transformation tumorale devrait survenir avant le plateau de sénescence.

Si les cellules tumorales proviennent des cellules sénescentes, elles devraient en porter les traces. Et en effet, bien que divergeant complètement sur le critère prolifératif, les cellules sénescentes et tumorales présentent des similitudes moléculaires. Tout d'abord, le stress oxydant, responsable en partie de la sénescence est retrouvé à un niveau élevé dans la plupart des cellules tumorales et lignées de cellules transformées (Halliwell, 2007; Pelicano et al., 2004; Toyokuni et al., 1995). Plusieurs lignées tumorales humaines, comme les carcinomes, les mélanomes et neuroblastomes montrent une production de H₂O₂ élevée, comparable à celle décrite dans des neutrophiles durant leur activation (Szatrowski & Nathan, 1991). Les mitochondries sont la principale source des ROS, et sont donc l'une des premières cibles des effets délétères des ROS, notamment au niveau de leur ADN qui n'est pas protégé par des histones. L'une des délétions causée à l'ADN

mitochondrial par les ROS est une délétion de 4977 paires de base qui est retrouvée dans différents types de cancer, mais aussi dans les tissus d'individus âgés (Carew & Huang, 2002; Pak et al., 2003; Wei & Lee, 2002). L'un des dommages oxydants à l'ADN s'accumulant lors de la sénescence, la 8-oxo-dG, est retrouvé dans les cellules cancéreuses, à un niveau directement corrélé au grade tumoral (Karihtala et al., 2006). Le second point marquant de ressemblance entre cellules sénescentes et tumorales est la présence de télomères raccourcis dans les cellules tumorales, suggérant que ces cellules sont bien passées par un plateau de sénescence. Plus de 80% des cellules cancéreuses présentent des télomères raccourcis, et leur longueur est stabilisée par la réactivation de la télomérase ou la mise en place du système ALT (Engelhardt et al., 1997; Kim et al., 1994; Meeker & Argani, 2004). Autre similarité, les cellules sénescentes et tumorales sont dans les deux cas résistantes à l'apoptose (Green & Evan, 2002; Wang, 1995). Enfin, l'activité NF-κB qui est fréquemment constitutive dans les cellules tumorales, participe à l'établissement de la sénescence (Gosselin & Abbadie, 2003; Rayet & Gelinas, 1999). Toutes ces ressemblances suggèrent l'existence d'une filiation entre cellules sénescentes et tumorales.

4.2. La sénescence, étape initiale de la tumorigenèse in vivo ?

Nous proposons que le mécanisme d'émergence que nous décrivons *in vitro* constitue un modèle de tumorigenèse des cellules épithéliales *in vivo*. Des arguments épidémiologiques viennent appuyer cette hypothèse. Chez l'homme, les cancers les plus fréquents sont les carcinomes et leur incidence augmente très fortement avec l'âge. Les cancers d'origine mésenchymateuse et hématopoïétique sont beaucoup plus rares, et surviennent à un âge moins avancé (Statistiques du National Cancer Institute pour l'année 2000 aux USA). Chez la souris, au contraire, les cancers spontanés les plus fréquents sont des lymphomes et des sarcomes. Ils surviennent préférentiellement dans les souris âgées (DePinho, 2000). In vitro, les cellules épithéliales humaines normales, cellules mammaires et kératinocytes d'épiderme, ainsi que les fibroblastes de souris sont capables d'émerger. Les fibroblastes humains normaux, de glande mammaire et de derme présentent une sénescence qui survient très lentement et n'émergent jamais. Il y a donc une corrélation entre l'incidence des cancers *in vivo* et la capacité à émerger *in vitro*.

Si la sénescence est une étape initiale de carcinogenèse *in vivo*, nous pourrions nous attendre à observer la présence de cellules sénescentes dans les tumeurs, tout du moins dans les phases précoces. Il s'avère que plusieurs études décrivent la présence de cellules sénescentes dans des lésions pré-malignes notamment d'origine épithéliale : les hyperplasies prostatiques (Choi et al., 2000; Zhang et al., 2006), les lésions cervicales utérines (Feng et al., 2007), les hépatocarcinomes (Paradis et al., 2001), les naevi (grains de beauté) (Gray-Schopfer et al., 2006; Michaloglou et al., 2005), les carcinomes squameux de la peau (Burnworth et al., 2007) ou encore les lésions pulmonaires ou hépatiques dans des modèles de souris exprimant K-rasV12 spécifiquement dans ces organes (Collado et al., 2005). Dans ces lésions pré-malignes est décrite l'augmentation d'expression de p16 et SA-β-Gal et leur évolution maligne est dans la plupart des cas associée à une perte de ces marqueurs.

In vitro, beaucoup de cellules épithéliales présentent une sénescence indépendante des télomères, mettant en jeu l'activation de la voie p16, la voie p53 n'étant quant à elle pas activée : c'est le cas par exemple des kératinocytes (Dickson et al., 2000), des cellules épithéliales mammaires (Brenner et al., 1998), des cellules épithéliales de la prostate (Sandhu et al., 2000) et des cellules urothéliales de la vessie (Puthenveettil et al., 1999). Il a été proposé par Ramirez et al. que cette sénescence résultait de mauvaises conditions de culture (Ramirez et al., 2001). Cependant, la présence de cellules sénescentes présentant une activation de p16 dans les tumeurs suggère que ce type de sénescence existe in vivo. De plus, comme il est observé in vitro, la voie p53 n'est pas activée dans ces lésions pré-malignes, ce qui suppose une sénescence indépendante des télomères. Dans les naevi et les hyperplasies bénignes de la prostate, aucune différence significative de longueur de télomère n'est décrite entre les cellules de la lésion pré-maligne et les cellules du tissu normal environnant. Plusieurs données semblent suggérer que ces cellules sénescentes sont induites suite à l'activation d'un oncogène. La voie p16 est bien connue pour être induite par l'activation d'un oncogène (Benanti & Galloway, 2004; Dimri et al., 2002; Serrano et al., 1997). Dans le cas des naevi par exemple, il a été montré que l'induction en sénescence résultait de la mutation et l'activation de l'oncogène BRAF^{E600} (Michaloglou et al., 2005). La surexpression de l'oncogène K-rasV12 dans les poumons ou le foie chez la souris, induit l'apparition d'adénomes dans lesquels les cellules sont sénescentes et présentent une expression de p16 (Collado et al., 2005).

Ainsi in vivo, lors de l'activation d'un oncogène pouvant résulter de mutations causées par le stress oxydant par exemple, la voie p16 serait activée entrainant une sénescence prématurée des cellules et stoppant leur croissance. L'inactivation de p16 semble être nécessaire à l'évolution maligne des cellules, puisque *in vivo* les carcinomes sont souvent caractérisés par la perte de fonction de p16. Dans notre modèle d'émergence de kératinocytes en deux étapes, p16 est induit lors de la sénescence et mais également à des niveaux élevés lors du second plateau de croissance, suggérant que les cellules émergentes ont conservé une voie p16 fonctionnelle. Néanmoins, son niveau d'expression diminue fortement dans les cellules ImK, ce qui semble compatible avec une extinction épi-génétique dans ces cellules, comme cela a été rapporté dans les cellules émergentes épithéliales mammaires (Romanov et al., 2001). L'étape supplémentaire qui semble nécessaire à l'évolution maligne est l'inactivation de p53 et/ou l'acquisition d'une activité télomérase. Alors que dans les lésions pré-malignes, les télomères ne semblent pas significativement plus courts que dans le tissu normal, l'évolution maligne est souvent associée à une réduction de la taille des télomères : c'est le cas de l'hépatocarcinome, du cancer de la prostate, du mélanome. Cette érosion s'explique probablement par le nombre de divisions important qu'effectuent les cellules tumorales et l'absence d'activité télomérase tout du moins lors des phases précoces du carcinome. Dans le cas des carcinomes squameux de la peau, impliquant des kératinocytes, les télomères ne sont probablement que très peu érodés : en effet, contrairement à la plupart des cellules somatiques, les kératinocytes d'épiderme ont une activité télomérase faible mais significative, et l'érosion des télomères avec l'âge dans ces cellules est très faible (Harle-Bachor & Boukamp, 1996; Taylor et al., 1996). Dans les
carcinomes squameux, l'expression *de novo* de la télomérase n'est donc pas nécessaire à l'évolution maligne, de même qu'elle n'est pas nécessaire non plus *in vitro* pour l'émergence (données de l'article 4).

Dans les cellules transformées ne présentant pas de réactivation de la télomérase, les télomères raccourcis pourraient, comme il a été discuté précédemment, constituer une entrave à l'évolution maligne. Les naevi atypiques issus de patients avec des mutations bi-alléliques de p16 ont tendance à être larges. Dans ces naevi ou p16 est non fonctionnel, les cellules sénescentes présentent alors une expression de p53. Ceci suggère que dans ces cellules, la voie p16 n'ayant pu être activée, les cellules ont continué de proliférer jusqu'à atteindre une taille télomérique critique induisant une sénescence dépendante de p53. Cela rappelle le comportement de cellules épithéliales *in vitro* qui, lorsque p16 est inactivé, ont une durée de vie augmentée et prolifèrent jusqu'à atteindre leur limite télomérique induisant une sénescence *via* la voie p53 (Garbe et al., 2007; Rheinwald et al., 2002).

Dans notre modèle de kératinocytes, p16 est induit lors de la sénescence et mais également à des niveaux élevés lors du second plateau de croissance (données de l'article 4). De même l'activité SA- β -gal est présente aux deux plateaux. Dans les tumeurs bénignes décrites dans les études citées précédemment, les cellules arrêtées dans le cycle, avec une activité SA- β -gal et une forte expression de p16 sont interprétées comme des cellules sénescentes. En faisant le parallèle avec notre modèle *in vitro*, nous proposons que l'activité SA- β -gal et l'induction de p16 observées dans les lésions prémalignes correspondraient non pas à des cellules sénescentes mais à des cellules au second plateau de croissance, c'est-à-dire issues d'une première émergence. Ainsi, nous proposons le modèle suivant de carcinogenèse associé à l'âge :

Au cours du vieillissement, l'accumulation de ROS pourraient engendrer des dommages à l'ADN et la création de mutations. Ces mutations pourraient affecter un ensemble de gènes favorisant entre autres la prolifération. En réponse à ce signal mitogène anormal, la voie p16 serait activée entrainant la sénescence prématurée des cellules, et ce, avant que leurs télomères ne soient fortement raccourcis. De ces cellules induites en sénescence, un petit nombre de cellules cancéreuses initiées pourrait émerger, si les mutations affectent également des gènes favorisant la transformation. Ces cellules cancéreuses initiées, présentant certaines caractéristiques transformées et à la durée de vie allongée pourraient former des hyperplasies bénignes. Leur croissance serait secondairement arrêtée lors d'un second plateau de croissance, résultant probablement lui aussi de stress oxydant. En effet, nous avons montré qu'au second plateau la MnSOD est réinduite fortement et que de fortes concentrations de ROS s'accumulent, ce qui active à nouveau la voie p16 (données non publiées). Ces cellules cancéreuses bénignes arrêtées dans le cycle pourraient donc subir des dommages oxydants mutagènes supplémentaires et plus importants, comme des translocations. Les translocations pourraient également être le résultat de quelques fusions-cassures-fusions engendrées par les quelques télomères raccourcis. En association avec une extinction épigénétique de p16 qui pourrait également résulter de dommages oxydants à l'ADN, ces cellules pourraient évoluer vers des

cellules pleinement cancéreuses. D'autres altérations comme la perte de p53 et/ou la réactivation de la télomérase pourraient alors s'ajouter et contribuer à une évolution encore plus agressive.



Figure 26 : Proposition de modèle de cancérisation des cellules épithéliales

4.3. La mort par autophagie : un processus suppresseur de tumeur ?

Nous avons vu que lors de la sénescence des kératinocytes de nombreuses mitochondries sont endommagées, et certaines d'entre elles se retrouvent englobées dans des vacuoles autophagiques. Les mitochondries, sources principales de ROS dans la cellule, constituent de ce fait l'une des premières cibles des dommages occasionnés par les ROS. Ces dommages aux mitochondries et notamment au niveau de leur ADN, peuvent mener à terme à leur dysfonctionnement et à la surproduction de ROS (Wei & Lee, 2002). Les mitochondries peuvent êtres dégradées par un processus autophagique de manière sélective, cela s'appelle la mitophagie (Kim et al., 2007). La mitophagie joue probablement un rôle essentiel dans la protection des cellules contre le stress oxydant et le vieillissement en éliminant les mitochondries altérées (de Grey, 1997; Lemasters, 2005).

Il contribue ainsi à éliminer les mitochondries dysfonctionnelles et donc limiter la production de ROS par ces mitochondries endommagées.

Le vieillissement se traduit à l'échelle cellulaire par l'accumulation de dommages oxydants aux différents composants cellulaires et à l'accumulation de mitochondries altérées. Dans la plupart des organismes étudiés, il a été décrit une diminution de l'activité protéolytique lysosomale lors du vieillissement (Martinez-Vicente et al., 2005). Plusieurs maladies humaines sont associées à un déclin de l'activité autophagique, plus particulièrement dans les cellules non-prolifératives des systèmes nerveux et musculaires : les myopathies vacuolaires (Nishino, 2003), les maladies de Parkinson (Anglade et al., 1997), Alzheimer (Cataldo et al., 1996), Huntington (Kegel et al., 2000) et l'encéphalopathie spongiforme transmissible (maladie à prion) (Liberski et al., 2004). Ce déclin de l'activité autophagique engendre probablement l'accumulation d'organelles endommagées, notamment les mitochondries, entrainant une élévation du stress oxydant et contribuant au vieillissement. Les cellules et les organismes déficients en autophagie présentent une élévation de la production de ROS (Jin, 2006; Kim et al., 2007; Komatsu et al., 2005; Kuma et al., 2004). Cette augmentation de la production de ROS peut contribuer, en causant des dommages à l'ADN, à l'instabilité génétique et à la tumorigenèse. Certaines études montrent que l'autophagie augmente la résistance au stress métabolique, mais aussi limite l'instabilité génétique suggérant un rôle de l'autophagie dans la suppression des tumeurs (Jin & White, 2007; Jin & White, 2008; Mathew et al., 2007b). Des souris transgéniques ayant une seule copie du gène codant pour Beclin-1 développent des tumeurs (Qu et al., 2003; Yue et al., 2003). Des mutations de type perte de fonction au niveau de la voie autophagique sont retrouvées dans un certain nombre de tumeurs humaines et sont associées avec la progression tumorale (Mathew et al., 2007a). Enfin, il a été montré que les gènes suppresseurs de tumeurs comme PTEN ou p53 stimulent l'autophagie (Kondo & Kondo, 2006), à l'inverse, la protéine anti-apoptotique et oncogène Bcl-2 l'inhibe (Levine et al., 2008). Enfin, la restriction calorique, connue pour retarder le vieillissement et diminuer la fréquence des cancers, favorise l'activité autophagique et contribue certainement à une meilleure dégradation des dommages oxydants aux protéines et mitochondries (Bergamini, 2006; Bergamini et al., 2007; Hansen et al., 2008; Wohlgemuth et al., 2007). Ainsi, l'autophagie jouerait un rôle suppresseur de tumeur.

Au vu du rôle suppresseur de tumeur qu'on peut attribuer au processus autophagique, nous pourrions émettre l'hypothèse que la mort des kératinocytes sénescents par autophagie constituerait une barrière à la transformation en entrainant la mort de cellules les plus fortement endommagées par le stress oxydant et donc celles devenues potentiellement les plus cancéreuses. En conséquence, les cellules qui émergent le feraient soit à partir des cellules sénescentes les moins endommagées par le stress oxydant, soit suite à des mutations dans des gènes contrôlant le processus autophagique qui leur permettraient d'échapper à ce processus. Un étudiant de notre groupe travaille actuellement à tester cette hypothèse.

4.4. La sénescence : une arme à double tranchant ?

En conclusion générale, en entrainant un arrêt dans le cycle de cellules potentiellement devenues cancéreuses, la sénescence pourrait constituer une barrière à la tumorigenèse. L'échappement à la sénescence serait l'une des étapes précoces de la tumorigenèse. Cependant, contrairement à l'apoptose ou à l'autophagie qui permettent d'éliminer des cellules fortement endommagées, la sénescence maintient les cellules dans un arrêt de croissance, et ces dernières maintiennent une activité métabolique. La sénescence se caractérisant par une élévation du niveau de stress oxydant, le maintien des cellules favoriserait l'accumulation pendant le plateau de mutations permettant l'échappement à la mort et/ou l'acquisition de nouvelles propriétés de croissance, d'adhérence, de migration, etc.... c'est ce qu'indiquent nos travaux, au moins dans le cas des kératinocytes d'épiderme. Ainsi, la sénescence pourrait constituer une barrière à la tumorigenèse, quoique moins efficace que la mort cellulaire programmée, mais aussi un terrain propice à la transformation. Ces deux débouchés de la sénescence pourrait plus ou moins préférentiellement en fonction des conditions environnementales, notamment des conditions de stress, ou en fonction de prédispositions génétiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aggarwal, B.B., Totpal, K., LaPushin, R., Chaturvedi, M.M., Pereira-Smith, O.M. & Smith, J.R. (1995). Exp Cell Res, **218**, 381-8.
- Aikata, H., Takaishi, H., Kawakami, Y., Takahashi, S., Kitamoto, M., Nakanishi, T., Nakamura, Y., Shimamoto, F., Kajiyama, G. & Ide, T. (2000). *Exp Cell Res*, **256**, 578-82.
- Alcorta, D.A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D. & Barrett, J.C. (1996). *Proc Natl Acad Sci* U S A, **93**, 13742-7.
- Allsopp, R.C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W. & Harley, C.B. (1992). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10114-8.
- Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M.T., Michel, P.P., Marquez, J., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Hirsch, E.C. & Agid, Y. (1997). *Histol Histopathol*, **12**, 25-31.
- Anisimov, V.N. (2001). Mech Ageing Dev, 122, 1221-55.
- Appelkvist, E.L., Aberg, F., Guan, Z., Parmryd, I. & Dallner, G. (1994). *Mol Aspects Med*, **15 Suppl**, s37-46.
- Armstrong, R.N. (1997). Chem Res Toxicol, 10, 2-18.
- Atamna, H., Paler-Martinez, A. & Ames, B.N. (2000). J Biol Chem, 275, 6741-8.
- Atamna, H., Robinson, C., Ingersoll, R., Elliott, H. & Ames, B.N. (2001). Faseb J, 15, 2196-204.
- Badawi, A.F., Liu, Y., Eldeen, M.B., Morrow, W., Razak, Z.R., Maradeo, M. & Badr, M.Z. (2004). *Carcinogenesis*, **25**, 1681-8.
- Balaban, R.S., Nemoto, S. & Finkel, T. (2005). Cell, 120, 483-95.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., Takaoka, M., Nakagawa, H., Tort, F., Fugger, K., Johansson, F., Sehested, M., Andersen, C.L., Dyrskjot, L., Orntoft, T., Lukas, J., Kittas, C., Helleday, T., Halazonetis, T.D., Bartek, J. & Gorgoulis, V.G. (2006). *Nature*, **444**, 633-7.
- Beattie, T.L., Zhou, W., Robinson, M.O. & Harrington, L. (1998). Curr Biol, 8, 177-80.
- Bechter, O.E., Shay, J.W. & Wright, W.E. (2004). Cell Cycle, 3, 547-9.
- Bechter, O.E., Zou, Y., Shay, J.W. & Wright, W.E. (2003). EMBO Rep, 4, 1138-43.
- Beckman, K.B. & Ames, B.N. (1997). J Biol Chem, 272, 19633-6.
- Benanti, J.A. & Galloway, D.A. (2004). Mol Cell Biol, 24, 2842-52.
- Bender, C.F., Sikes, M.L., Sullivan, R., Huye, L.E., Le Beau, M.M., Roth, D.B., Mirzoeva, O.K., Oltz, E.M. & Petrini, J.H. (2002). *Genes Dev*, **16**, 2237-51.
- Ben-Porath, I. & Weinberg, R.A. (2005). Int J Biochem Cell Biol, 37, 961-76.
- Bergamini, E. (2006). Mol Aspects Med, 27, 403-10.
- Bergamini, E., Cavallini, G., Donati, A. & Gori, Z. (2007). Ann N Y Acad Sci, 1114, 69-78.
- Berger, R., Febbo, P.G., Majumder, P.K., Zhao, J.J., Mukherjee, S., Signoretti, S., Campbell, K.T., Sellers, W.R., Roberts, T.M., Loda, M., Golub, T.R. & Hahn, W.C. (2004). *Cancer Res*, **64**, 8867-75.
- Bernard, D., Gosselin, K., Monte, D., Vercamer, C., Bouali, F., Pourtier, A., Vandenbunder, B. & Abbadie, C. (2004). *Cancer Res*, **64**, 472-81.
- Bernard, D., Mont, D., Vandenbunder, B. & Abbadie, C. (2001a). ScientificWorldJournal, 1, 67.
- Bernard, D., Monte, D., Vandenbunder, B. & Abbadie, C. (2002). Oncogene, 21, 4392-402.
- Bernard, D., Quatannens, B., Begue, A., Vandenbunder, B. & Abbadie, C. (2001b). *Cancer Res*, **61**, 2656-64.
- Bianchi, A., Stansel, R.M., Fairall, L., Griffith, J.D., Rhodes, D. & de Lange, T. (1999). *Embo J*, **18**, 5735-44.
- Bienert, G.P., Moller, A.L., Kristiansen, K.A., Schulz, A., Moller, I.M., Schjoerring, J.K. & Jahn, T.P. (2007). *J Biol Chem*, **282**, 1183-92.
- Bienert, G.P., Schjoerring, J.K. & Jahn, T.P. (2006). *Biochim Biophys Acta*, 1758, 994-1003.
- Biroccio, A., Rizzo, A., Elli, R., Koering, C.E., Belleville, A., Benassi, B., Leonetti, C., Stevens, M.F., D'Incalci, M., Zupi, G. & Gilson, E. (2006). *Eur J Cancer*, **42**, 1881-8.
- Blackburn, E.H. (2000). Nature, 408, 53-6.
- Blasco, M.A. (2005). Nat Rev Genet, 6, 611-22.
- Blasco, M.A., Lee, H.W., Hande, M.P., Samper, E., Lansdorp, P.M., DePinho, R.A. & Greider, C.W. (1997). *Cell*, **91**, 25-34.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S. & Wright, W.E. (1998). *Science*, **279**, 349-52.

- Bokov, A., Chaudhuri, A. & Richardson, A. (2004). Mech Ageing Dev, 125, 811-26.
- Boulanger, C.A. & Smith, G.H. (2001). Oncogene, 20, 2264-72.
- Brenner, A.J., Stampfer, M.R. & Aldaz, C.M. (1998). Oncogene, 17, 199-205.
- Bringold, F. & Serrano, M. (2000). Exp Gerontol, 35, 317-29.
- Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L. & de Lange, T. (1997). Nat Genet, 17, 231-5.
- Brown-Borg, H.M. & Rakoczy, S.G. (2000). Exp Gerontol, 35, 199-212.
- Brunk, U.T. & Terman, A. (2002). Eur J Biochem, 269, 1996-2002.
- Bryan, T.M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S. & Reddel, R.R. (1995). Embo J, 14, 4240-8.
- Buchkovich, K.J. & Greider, C.W. (1996). *Mol Biol Cell*, 7, 1443-54.
- Burnworth, B., Arendt, S., Muffler, S., Steinkraus, V., Brocker, E.B., Birek, C., Hartschuh, W., Jauch, A. & Boukamp, P. (2007). *Eur J Cell Biol*, **86**, 763-80.
- Busciglio, J. & Yankner, B.A. (1995). Nature, 378, 776-9.
- Busuttil, R.A., Rubio, M., Dolle, M.E., Campisi, J. & Vijg, J. (2003). Aging Cell, 2, 287-94.
- Cabelof, D.C., Yanamadala, S., Raffoul, J.J., Guo, Z., Soofi, A. & Heydari, A.R. (2003). DNA Repair (Amst), **2**, 295-307.
- Cairney, C.J. & Keith, W.N. (2008). Biochimie, 90, 13-23.
- Caldecott, K.W. (2003). Biochem Soc Trans, 31, 247-51.
- Caldecott, K.W. (2008). Nat Rev Genet, 9, 619-31.
- Callen, E. & Surralles, J. (2004). *Mutat Res*, 567, 85-104.
- Campisi, J. (2000). In Vivo, 14, 183-8.
- Campisi, J. (2001). Trends Cell Biol, 11, S27-31.
- Cao, L., Li, W., Kim, S., Brodie, S.G. & Deng, C.X. (2003). Genes Dev, 17, 201-13.
- Carew, J.S. & Huang, P. (2002). Mol Cancer, 1, 9.
- Casolini, P., Catalani, A., Zuena, A.R. & Angelucci, L. (2002). J Neurosci Res, 68, 337-43.
- Cataldo, A.M., Hamilton, D.J., Barnett, J.L., Paskevich, P.A. & Nixon, R.A. (1996). *J Neurosci*, **16**, 186-99.
- Celli, G.B. & de Lange, T. (2005). Nat Cell Biol, 7, 712-8.
- Chae, H.Z., Kang, S.W. & Rhee, S.G. (1999a). Methods Enzymol, 300, 219-26.
- Chae, H.Z., Kim, H.J., Kang, S.W. & Rhee, S.G. (1999b). Diabetes Res Clin Pract, 45, 101-12.
- Chae, H.Z., Robison, K., Poole, L.B., Church, G., Storz, G. & Rhee, S.G. (1994a). *Proc Natl Acad Sci* U S A, **91**, 7017-21.
- Chae, H.Z., Uhm, T.B. & Rhee, S.G. (1994b). Proc Natl Acad Sci U S A, 91, 7022-6.
- Chainiaux, F., Magalhaes, J.P., Eliaers, F., Remacle, J. & Toussaint, O. (2002). Int J Biochem Cell Biol, **34**, 1331-9.
- Chan, B.S., Endo, S., Kanai, N. & Schuster, V.L. (2002). Am J Physiol Renal Physiol, 282, F1097-102.
- Chang, S., Khoo, C.M., Naylor, M.L., Maser, R.S. & DePinho, R.A. (2003). Genes Dev, 17, 88-100.
- Chang, S., Multani, A.S., Cabrera, N.G., Naylor, M.L., Laud, P., Lombard, D., Pathak, S., Guarente, L. & DePinho, R.A. (2004). *Nat Genet*, **36**, 877-82.
- Chen, J.H., Hales, C.N. & Ozanne, S.E. (2007a). Nucleic Acids Res, 35, 7417-28.
- Chen, J.H., Ozanne, S.E. & Hales, C.N. (2005). DNA Repair (Amst), 4, 1140-8.
- Chen, J.H., Stoeber, K., Kingsbury, S., Ozanne, S.E., Williams, G.H. & Hales, C.N. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 49439-46.
- Chen, Q. & Ames, B.N. (1994). Proc Natl Acad Sci U S A, 91, 4130-4.
- Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J.D., Yan, L.J. & Ames, B.N. (1995). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 4337-41.
- Chen, Q.M., Bartholomew, J.C., Campisi, J., Acosta, M., Reagan, J.D. & Ames, B.N. (1998). *Biochem J*, **332 (Pt 1)**, 43-50.
- Chen, Q.M., Liu, J. & Merrett, J.B. (2000). Biochem J, 347, 543-51.
- Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S.J. & Gibson, S.B. (2007b). J Cell Sci, 120, 4155-66.
- Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S.J. & Gibson, S.B. (2008). *Cell Death Differ*, **15**, 171-82.
- Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S. & Loeb, L.A. (1992). J Biol Chem, 267, 166-72.
- Chin, L., Artandi, S.E., Shen, Q., Tam, A., Lee, S.L., Gottlieb, G.J., Greider, C.W. & DePinho, R.A. (1999). *Cell*, **97**, 527-38.
- Chio, K.S. & Tappel, A.L. (1969). Biochemistry, 8, 2821-6.
- Choi, J., Shendrik, I., Peacocke, M., Peehl, D., Buttyan, R., Ikeguchi, E.F., Katz, A.E. & Benson, M.C. (2000). Urology, **56**, 160-6.
- Chu, G. (1997). J Biol Chem, 272, 24097-100.
- Chung, H.Y., Kim, H.J., Shim, K.H. & Kim, K.W. (1999). *Mech Ageing Dev*, **111**, 97-106.
- Churikov, D., Wei, C. & Price, C.M. (2006). *Mol Cell Biol*, **26**, 6971-82.

Colgin, L.M., Baran, K., Baumann, P., Cech, T.R. & Reddel, R.R. (2003). Curr Biol, 13, 942-6.

- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., Beach, D. & Serrano, M. (2005). *Nature*, **436**, 642.
- Cosme-Blanco, W., Shen, M.F., Lazar, A.J., Pathak, S., Lozano, G., Multani, A.S. & Chang, S. (2007). *EMBO Rep*, **8**, 497-503.
- Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B. & Bacchetti, S. (1992). *Embo J*, **11**, 1921-9.
- Counter, C.M., Hirte, H.W., Bacchetti, S. & Harley, C.B. (1994). Proc Natl Acad Sci U S A, 91, 2900-4.
- Court, R., Chapman, L., Fairall, L. & Rhodes, D. (2005). *EMBO Rep*, 6, 39-45.
- Crapo, J.D., Oury, T., Rabouille, C., Slot, J.W. & Chang, L.Y. (1992). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10405-9.
- Cristofalo, V.J. (1988). Exp Gerontol, 23, 297-307.
- Cristofalo, V.J., Allen, R.G., Pignolo, R.J., Martin, B.G. & Beck, J.C. (1998a). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10614-9.
- Cristofalo, V.J., Lorenzini, A., Allen, R.G., Torres, C. & Tresini, M. (2004). *Mech Ageing Dev*, **125**, 827-48.
- Cristofalo, V.J., Volker, C., Francis, M.K. & Tresini, M. (1998b). *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, **8**, 43-80.
- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P. & Jackson, S.P. (2003). *Nature*, **426**, 194-8.
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I. & Poirier, G.G. (1999). Biochem J, 342 (Pt 2), 249-68.
- de Boer, J., Andressoo, J.O., de Wit, J., Huijmans, J., Beems, R.B., van Steeg, H., Weeda, G., van der Horst, G.T., van Leeuwen, W., Themmen, A.P., Meradji, M. & Hoeijmakers, J.H. (2002). *Science*, **296**, 1276-9.
- de Boer, J. & Hoeijmakers, J.H. (2000). Carcinogenesis, 21, 453-60.
- de Grey, A.D. (1997). Bioessays, 19, 161-6.
- de Lange, T. (2002). Oncogene, **21,** 532-40.
- de Lange, T. (2005). Genes Dev, 19, 2100-10.
- de Lange, T., Shiue, L., Myers, R.M., Cox, D.R., Naylor, S.L., Killery, A.M. & Varmus, H.E. (1990). *Mol Cell Biol*, **10**, 518-27.
- Debacq-Chainiaux, F., Borlon, C., Pascal, T., Royer, V., Eliaers, F., Ninane, N., Carrard, G., Friguet, B., de Longueville, F., Boffe, S., Remacle, J. & Toussaint, O. (2005). *J Cell Sci*, **118**, 743-58.
- DePinho, R.A. (2000). Nature, 408, 248-54.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., Maestro, R., Pelicci, P.G. & d'Adda di Fagagna, F. (2006). *Nature*, **444**, 638-42.
- Dickson, M.A., Hahn, W.C., Ino, Y., Ronfard, V., Wu, J.Y., Weinberg, R.A., Louis, D.N., Li, F.P. & Rheinwald, J.G. (2000). *Mol Cell Biol*, **20**, 1436-47.
- Dimri, G., Band, H. & Band, V. (2005). Breast Cancer Res, 7, 171-9.
- Dimri, G.P. & Campisi, J. (1994). Exp Cell Res, 212, 132-40.
- Dimri, G.P., Itahana, K., Acosta, M. & Campisi, J. (2000). Mol Cell Biol, 20, 273-85.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. & et al. (1995). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9363-7.
- Dimri, G.P., Martinez, J.L., Jacobs, J.J., Keblusek, P., Itahana, K., Van Lohuizen, M., Campisi, J., Wazer, D.E. & Band, V. (2002). *Cancer Res*, **62**, 4736-45.
- Djordjevic, V.B. (2004). Int Rev Cytol, 237, 57-89.
- Dong, C.K., Masutomi, K. & Hahn, W.C. (2005). Crit Rev Oncol Hematol, 54, 85-93.
- Du, X., Shen, J., Kugan, N., Furth, E.E., Lombard, D.B., Cheung, C., Pak, S., Luo, G., Pignolo, R.J., DePinho, R.A., Guarente, L. & Johnson, F.B. (2004). *Mol Cell Biol*, **24**, 8437-46.
- Engelhardt, M., Drullinsky, P., Guillem, J. & Moore, M.A. (1997). Clin Cancer Res, 3, 1931-41.
- Espejel, S., Martin, M., Klatt, P., Martin-Caballero, J., Flores, J.M. & Blasco, M.A. (2004). *EMBO Rep*, **5**, 503-9.
- Esworthy, R.S., Ho, Y.S. & Chu, F.F. (1997). Arch Biochem Biophys, 340, 59-63.
- Feldser, D.M. & Greider, C.W. (2007). Cancer Cell, 11, 461-9.
- Feng, J., Funk, W.D., Wang, S.S., Weinrich, S.L., Avilion, A.A., Chiu, C.P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., Yu, J. & et al. (1995). *Science*, **269**, 1236-41.
- Feng, W., Xiao, J., Zhang, Z., Rosen, D.G., Brown, R.E., Liu, J. & Duan, X. (2007). *Mod Pathol*, **20**, 961-6.
- Fischer, T.W., Slominski, A., Zmijewski, M.A., Reiter, R.J. & Paus, R. (2008). Exp Dermatol.
- Flohe, L., Gunzler, W.A. & Schock, H.H. (1973). FEBS Lett, 32, 132-4.

- Flores, E.R., Sengupta, S., Miller, J.B., Newman, J.J., Bronson, R., Crowley, D., Yang, A., McKeon, F. & Jacks, T. (2005). *Cancer Cell*, **7**, 363-73.
- Fortini, P. & Dogliotti, E. (2007). DNA Repair (Amst), 6, 398-409.
- Friguet, B. (2006). FEBS Lett, 580, 2910-6.
- Friguet, B., Bulteau, A.L., Chondrogianni, N., Conconi, M. & Petropoulos, I. (2000). Ann N Y Acad Sci, **908**, 143-54.
- Fujikawa, K., Kamiya, H., Yakushiji, H., Nakabeppu, Y. & Kasai, H. (2001). *Nucleic Acids Res*, **29**, 449-54.
- Gajewski, E., Rao, G., Nackerdien, Z. & Dizdaroglu, M. (1990). Biochemistry, 29, 7876-82.
- Garbe, J.C., Holst, C.R., Bassett, E., Tlsty, T. & Stampfer, M.R. (2007). Cell Cycle, 6, 1927-36.
- Genova, M.L., Pich, M.M., Biondi, A., Bernacchia, A., Falasca, A., Bovina, C., Formiggini, G., Parenti Castelli, G. & Lenaz, G. (2003). *Exp Biol Med (Maywood)*, **228**, 506-13.
- Ghebranious, N. & Donehower, L.A. (1998). Oncogene, 17, 3385-400.
- Gire, V. & Wynford-Thomas, D. (1998). Mol Cell Biol, 18, 1611-21.
- Gosselin, K. & Abbadie, C. (2003). Exp Gerontol, 38, 1271-83.
- Gottlieb, T.M. & Jackson, S.P. (1993). Cell, 72, 131-42.
- Goukassian, D., Gad, F., Yaar, M., Eller, M.S., Nehal, U.S. & Gilchrest, B.A. (2000). Faseb J, 14, 1325-34.
- Gray-Schopfer, V.C., Cheong, S.C., Chong, H., Chow, J., Moss, T., Abdel-Malek, Z.A., Marais, R., Wynford-Thomas, D. & Bennett, D.C. (2006). *Br J Cancer*, **95**, 496-505.
- Gredilla, R. & Barja, G. (2005). Endocrinology, 146, 3713-7.
- Gredilla, R., Sanz, A., Lopez-Torres, M. & Barja, G. (2001). Faseb J, 15, 1589-91.
- Green, D.R. & Evan, G.I. (2002). Cancer Cell, 1, 19-30.
- Greider, C.W. & Blackburn, E.H. (1985). Cell, 43, 405-13.
- Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H. & de Lange, T. (1999). *Cell*, **97**, 503-14.
- Guan, J.Z., Maeda, T., Sugano, M., Oyama, J., Higuchi, Y. & Makino, N. (2007). *Mol Cell Biochem*, **304**, 353-60.
- Haendeler, J., Hoffmann, J., Diehl, J.F., Vasa, M., Spyridopoulos, I., Zeiher, A.M. & Dimmeler, S. (2004). *Circ Res*, **94**, 768-75.
- Halliwell, B. (2007). Biochem J, 401, 1-11.
- Hamilton, M.L., Van Remmen, H., Drake, J.A., Yang, H., Guo, Z.M., Kewitt, K., Walter, C.A. & Richardson, A. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10469-74.
- Hansen, M., Chandra, A., Mitic, L.L., Onken, B., Driscoll, M. & Kenyon, C. (2008). PLoS Genet, 4, e24.
- Harle-Bachor, C. & Boukamp, P. (1996). Proc Natl Acad Sci U S A, 93, 6476-81.
- Harley, C.B., Futcher, A.B. & Greider, C.W. (1990). Nature, 345, 458-60.
- Harley, C.B., Kim, N.W., Prowse, K.R., Weinrich, S.L., Hirsch, K.S., West, M.D., Bacchetti, S., Hirte, H.W., Counter, C.M., Greider, C.W. & et al. (1994). *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **59**, 307-15.
- Harman, D. (1956). J Gerontol, 11, 298-300.
- Harman, D. (1972). J Am Geriatr Soc, 20, 145-7.
- Hart, R.W. & Turturro, A. (1997). Environ Health Perspect, **105 Suppl 4**, 989-92.
- Hauck, S.J. & Bartke, A. (2000). Free Radic Biol Med, 28, 970-8.
- Hayflick, L. (1965). Exp Cell Res, 37, 614-36.
- Hayflick, L. (2000). Br J Cancer, 83, 841-6.
- Helenius, M., Hanninen, M., Lehtinen, S.K. & Salminen, A. (1996). Biochem J, 318 (Pt 2), 603-8.
- Helenius, M., Makelainen, L. & Salminen, A. (1999). Exp Cell Res, 248, 194-202.
- Henson, J.D., Neumann, A.A., Yeager, T.R. & Reddel, R.R. (2002). Oncogene, 21, 598-610.
- Herbig, U., Ferreira, M., Condel, L., Carey, D. & Sedivy, J.M. (2006). Science, 311, 1257.
- Holmgren, A. (1989). J Biol Chem, 264, 13963-6.
- Holmquist, L., Stuchbury, G., Berbaum, K., Muscat, S., Young, S., Hager, K., Engel, J. & Munch, G. (2007). *Pharmacol Ther*, **113**, 154-64.
- Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Geloen, A., Even, P.C., Cervera, P. & Le Bouc, Y. (2003). *Nature*, **421**, 182-7.
- Huang, S., Risques, R.A., Martin, G.M., Rabinovitch, P.S. & Oshima, J. (2008). *Exp Cell Res*, **314**, 82-91.
- Ide, H. & Kotera, M. (2004). Biol Pharm Bull, 27, 480-5.
- Ikeno, Y., Bronson, R.T., Hubbard, G.B., Lee, S. & Bartke, A. (2003). *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **58**, 291-6.
- Imlay, J.A. & Linn, S. (1988). Science, 240, 1302-9.

- Irani, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Sollott, S.J., Der, C.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., Finkel, T. & Goldschmidt-Clermont, P.J. (1997). *Science*, **275**, 1649-52.
- Itahana, K., Campisi, J. & Dimri, G.P. (2004). *Biogerontology*, 5, 1-10.
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Matsuoka, S., Takubo, K., Hamaguchi, I., Nomiyama, K., Hosokawa, K.,
- Sakurada, K., Nakagata, N., Ikeda, Y., Mak, T.W. & Suda, T. (2004). *Nature*, **431**, 997-1002.
- Iwano, T., Tachibana, M., Reth, M. & Shinkai, Y. (2004). J Biol Chem, 279, 1442-8.
- Jackson, S.P. (2002). Carcinogenesis, 23, 687-96.
- Janero, D.R. (1990). Free Radic Biol Med, 9, 515-40.
- Janknecht, R. (2004). FEBS Lett, **564**, 9-13.
- Jeyapalan, J.C., Ferreira, M., Sedivy, J.M. & Herbig, U. (2007). Mech Ageing Dev, 128, 36-44.
- Jezek, P. & Hlavata, L. (2005). Int J Biochem Cell Biol, 37, 2478-503.
- Jiang, W.Q., Zhong, Z.H., Henson, J.D., Neumann, A.A., Chang, A.C. & Reddel, R.R. (2005). *Mol Cell Biol*, **25**, 2708-21.
- Jin, S. (2006). Autophagy, 2, 80-4.
- Jin, S. & White, E. (2007). Autophagy, 3, 28-31.
- Jin, S. & White, E. (2008). Autophagy, 4, 563-6.
- Johnson, F.B., Marciniak, R.A., McVey, M., Stewart, S.A., Hahn, W.C. & Guarente, L. (2001). *Embo J*, **20**, 905-13.
- Jolly, R.D., Palmer, D.N. & Dalefield, R.R. (2002). Arch Gerontol Geriatr, 34, 205-17.
- Kaneko, T., Tahara, S., Taguchi, T. & Kondo, H. (2001). Mutat Res, 487, 19-30.
- Kang, C.M., Kristal, B.S. & Yu, B.P. (1998). Free Radic Biol Med, 24, 148-54.
- Kang, D., Nishida, J., Iyama, A., Nakabeppu, Y., Furuichi, M., Fujiwara, T., Sekiguchi, M. & Takeshige, K. (1995). *J Biol Chem*, **270**, 14659-65.
- Kang, M.K., Kim, R.H., Shin, K.H., Zhong, W., Faull, K.F. & Park, N.H. (2005a). *Exp Cell Res*, **310**, 186-95.
- Kang, M.K., Shin, K.H., Yip, F.K. & Park, N.H. (2005b). Mech Ageing Dev, 126, 475-9.
- Kang, M.K., Swee, J., Kim, R.H., Baluda, M.A. & Park, N.H. (2002). *Mech Ageing Dev*, **123**, 585-92.
- Karihtala, P., Winqvist, R., Syvaoja, J.E., Kinnula, V.L. & Soini, Y. (2006). Eur J Cancer, 42, 2653-9.
- Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S. & de Lange, T. (1999). Science, 283, 1321-5.
- Kegel, K.B., Kim, M., Sapp, E., McIntyre, C., Castano, J.G., Aronin, N. & DiFiglia, M. (2000). J Neurosci, **20**, 7268-78.
- Kelly, K.A., Havrilla, C.M., Brady, T.C., Abramo, K.H. & Levin, E.D. (1998). *Environ Health Perspect*, **106**, 375-84.
- Keyes, W.M. & Mills, A.A. (2006). Cell Cycle, 5, 260-5.
- Keyes, W.M., Wu, Y., Vogel, H., Guo, X., Lowe, S.W. & Mills, A.A. (2005). Genes Dev, 19, 1986-99.
- Kim, H., You, S., Farris, J., Kong, B.W., Christman, S.A., Foster, L.K. & Foster, D.N. (2002). *Exp Cell Res*, **272**, 199-208.
- Kim, H.J., Kim, K.W., Yu, B.P. & Chung, H.Y. (2000). *Free Radic Biol Med*, **28**, 683-92.
- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S. & Lemasters, J.J. (2007). Arch Biochem Biophys, 462, 245-53.
- Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L. & Shay, J.W. (1994). *Science*, **266**, 2011-5.
- Kim, Y.C., Masutani, H., Yamaguchi, Y., Itoh, K., Yamamoto, M. & Yodoi, J. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 18399-406.
- Kiyono, T., Foster, S.A., Koop, J.I., McDougall, J.K., Galloway, D.A. & Klingelhutz, A.J. (1998). *Nature*, **396**, 84-8.
- Klaunig, J.E. & Kamendulis, L.M. (2004). Annu Rev Pharmacol Toxicol, 44, 239-67.
- Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K. & Chiba, T. (2005). *J Cell Biol*, **169**, 425-34.
- Kondo, Y. & Kondo, S. (2006). Autophagy, 2, 85-90.
- Kontos, H.A., Wei, E.P., Povlishock, J.T., Dietrich, W.D., Magiera, C.J. & Ellis, E.F. (1980). *Science*, **209**, 1242-5.
- Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M.R., Kovalev, G.I., Al-Regaiey, K., Su, L. & Sharpless, N.E. (2004). *J Clin Invest*, **114**, 1299-307.
- Krokan, H.E., Nilsen, H., Skorpen, F., Otterlei, M. & Slupphaug, G. (2000). FEBS Lett, 476, 73-7.
- Krokan, H.E., Standal, R. & Slupphaug, G. (1997). Biochem J, 325 (Pt 1), 1-16.
- Kryukov, G.V., Castellano, S., Novoselov, S.V., Lobanov, A.V., Zehtab, O., Guigo, R. & Gladyshev, V.N. (2003). *Science*, **300**, 1439-43.
- Kulju, K.S. & Lehman, J.M. (1995). Exp Cell Res, 217, 336-45.
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T. & Mizushima, N. (2004). *Nature*, **432**, 1032-6.

- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y. & Erusalimsky, J.D. (2000). J Cell Sci, 113 (Pt 20), 3613-22.
- Kveiborg, M., Kassem, M., Langdahl, B., Eriksen, E.F., Clark, B.F. & Rattan, S.I. (1999). *Mech Ageing Dev*, **106**, 261-71.
- Kyng, K.J. & Bohr, V.A. (2005). Ageing Res Rev, 4, 579-602.
- Lass, A., Sohal, B.H., Weindruch, R., Forster, M.J. & Sohal, R.S. (1998). *Free Radic Biol Med*, **25**, 1089-97.
- Lebel, M. & Leder, P. (1998). Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 13097-102.
- Lee, H.C., Yin, P.H., Chi, C.W. & Wei, Y.H. (2002). J Biomed Sci, 9, 517-26.
- Lei, M., Podell, E.R. & Cech, T.R. (2004). Nat Struct Mol Biol, 11, 1223-9.
- Lemasters, J.J. (2005). Rejuvenation Res, 8, 3-5.
- Levine, B., Sinha, S. & Kroemer, G. (2008). Autophagy, 4, 600-6.
- Li, G.Z., Eller, M.S., Firoozabadi, R. & Gilchrest, B.A. (2003). Proc Natl Acad Sci U S A, 100, 527-31.
- Li, G.Z., Eller, M.S., Hanna, K. & Gilchrest, B.A. (2004). Exp Cell Res, 301, 189-200.
- Li, Y., Huang, T.T., Carlson, E.J., Melov, S., Ursell, P.C., Olson, J.L., Noble, L.J., Yoshimura, M.P., Berger, C., Chan, P.H., Wallace, D.C. & Epstein, C.J. (1995). *Nat Genet*, **11**, 376-81.
- Liberski, P.P., Sikorska, B., Bratosiewicz-Wasik, J., Gajdusek, D.C. & Brown, P. (2004). Int J Biochem Cell Biol, **36**, 2473-90.
- Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U. & Schwarz, K. (2003). Nat Rev Mol Cell Biol, 4, 712-20.
- Lin, A.W., Barradas, M., Stone, J.C., van Aelst, L., Serrano, M. & Lowe, S.W. (1998). *Genes Dev*, **12**, 3008-19.
- Lindahl, T. (1993). Nature, 362, 709-15.
- Lindahl, T. & Wood, R.D. (1999). Science, 286, 1897-905.
- Linnane, A.W., Marzuki, S., Ozawa, T. & Tanaka, M. (1989). Lancet, 1, 642-5.
- Liu, D., O'Connor, M.S., Qin, J. & Songyang, Z. (2004). J Biol Chem, 279, 51338-42.
- Liu, L., Bailey, S.M., Okuka, M., Munoz, P., Li, C., Zhou, L., Wu, C., Czerwiec, E., Sandler, L.,
 - Seyfang, A., Blasco, M.A. & Keefe, D.L. (2007). Nat Cell Biol, 9, 1436-41.
- Lombard, D.B., Beard, C., Johnson, B., Marciniak, R.A., Dausman, J., Bronson, R., Buhlmann, J.E., Lipman, R., Curry, R., Sharpe, A., Jaenisch, R. & Guarente, L. (2000). *Mol Cell Biol*, **20**, 3286-91.
- Lombard, D.B., Chua, K.F., Mostoslavsky, R., Franco, S., Gostissa, M. & Alt, F.W. (2005). *Cell*, **120**, 497-512.
- Londono-Vallejo, J.A., Der-Sarkissian, H., Cazes, L., Bacchetti, S. & Reddel, R.R. (2004). *Cancer Res*, **64**, 2324-7.
- Lowe, S.W., Cepero, E. & Evan, G. (2004). Nature, 432, 307-15.
- Lundberg, A.S., Randell, S.H., Stewart, S.A., Elenbaas, B., Hartwell, K.A., Brooks, M.W., Fleming, M.D., Olsen, J.C., Miller, S.W., Weinberg, R.A. & Hahn, W.C. (2002). *Oncogene*, **21**, 4577-86.
- Macieira-Coelho, A. (1966). Experientia, 22, 390-1.
- Maier, B., Gluba, W., Bernier, B., Turner, T., Mohammad, K., Guise, T., Sutherland, A., Thorner, M. & Scrable, H. (2004). *Genes Dev*, **18**, 306-19.
- Maiorino, M., Thomas, J.P., Girotti, A.W. & Ursini, F. (1991). *Free Radic Res Commun*, **12-13 Pt 1**, 131-5.
- Mallette, F.A., Gaumont-Leclerc, M.F. & Ferbeyre, G. (2007). Genes Dev, 21, 43-8.
- Mammone, T., Gan, D. & Foyouzi-Youssefi, R. (2006). Cell Biol Int, 30, 903-9.
- Marcotte, R., Lacelle, C. & Wang, E. (2004). Mech Ageing Dev, 125, 777-83.
- Marklund, S. (1980). Acta Physiol Scand Suppl, 492, 19-23.
- Marnett, L.J. (1999). *Mutat Res*, **424**, 83-95.
- Marnett, L.J. (2000). Carcinogenesis, 21, 361-70.
- Marnett, L.J., Wlodawer, P. & Samuelsson, B. (1975). J Biol Chem, 250, 8510-7.
- Martinez-Vicente, M., Sovak, G. & Cuervo, A.M. (2005). Exp Gerontol, 40, 622-33.
- Mary, J., Vougier, S., Picot, C.R., Perichon, M., Petropoulos, I. & Friguet, B. (2004). *Exp Gerontol*, **39**, 1117-23.
- Maser, R.S., Monsen, K.J., Nelms, B.E. & Petrini, J.H. (1997). Mol Cell Biol, 17, 6087-96.
- Mason, P.J. (2003). *Bioessays*, 25, 126-33.
- Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V. & White, E. (2007a). Nat Rev Cancer, 7, 961-7.
- Mathew, R., Kongara, S., Beaudoin, B., Karp, C.M., Bray, K., Degenhardt, K., Chen, G., Jin, S. & White, E. (2007b). *Genes Dev*, **21**, 1367-81.
- McFarland, G.A. & Holliday, R. (1994). Exp Cell Res, 212, 167-75.
- McWhir, J., Selfridge, J., Harrison, D.J., Squires, S. & Melton, D.W. (1993). Nat Genet, 5, 217-24.
- Mecocci, P., MacGarvey, U., Kaufman, A.E., Koontz, D., Shoffner, J.M., Wallace, D.C. & Beal, M.F. (1993). Ann Neurol, **34**, 609-16.

Meeker, A.K. & Argani, P. (2004). J Mammary Gland Biol Neoplasia, 9, 285-96.

Melk, A., Kittikowit, W., Sandhu, I., Halloran, K.M., Grimm, P., Schmidt, B.M. & Halloran, P.F. (2003). *Kidney Int*, **63**, 2134-43.

- Melk, A., Schmidt, B.M., Takeuchi, O., Sawitzki, B., Rayner, D.C. & Halloran, P.F. (2004). *Kidney Int*, **65**, 510-20.
- Melov, S., Hinerfeld, D., Esposito, L. & Wallace, D.C. (1997). Nucleic Acids Res, 25, 974-82.
- Meyer, J.N., Boyd, W.A., Azzam, G.A., Haugen, A.C., Freedman, J.H. & Van Houten, B. (2007). *Genome Biol*, **8**, R70.
- Meyerson, M., Counter, C.M., Eaton, E.N., Ellisen, L.W., Steiner, P., Caddle, S.D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R.L., Davidoff, M.J., Liu, Q., Bacchetti, S., Haber, D.A. & Weinberg, R.A. (1997). *Cell*, **90**, 785-95.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J. & Peeper, D.S. (2005). *Nature*, **436**, 720-4.
- Milyavsky, M., Shats, I., Erez, N., Tang, X., Senderovich, S., Meerson, A., Tabach, Y., Goldfinger, N., Ginsberg, D., Harris, C.C. & Rotter, V. (2003). *Cancer Res*, **63**, 7147-57.
- Minamino, T., Miyauchi, H., Yoshida, T., Tateno, K., Kunieda, T. & Komuro, I. (2004). J Mol Cell Cardiol, 36, 175-83.
- Moore, R.B., Mankad, M.V., Shriver, S.K., Mankad, V.N. & Plishker, G.A. (1991). *J Biol Chem*, **266**, 18964-8.
- Morin, G.B. (1989). Cell, 59, 521-9.
- Moriwaki, S., Ray, S., Tarone, R.E., Kraemer, K.H. & Grossman, L. (1996). Mutat Res, 364, 117-23.
- Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L. & Wu, J.R. (1988). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 6622-6.
- Mu, D., Hsu, D.S. & Sancar, A. (1996). J Biol Chem, 271, 8285-94.
- Mu, D., Wakasugi, M., Hsu, D.S. & Sancar, A. (1997). J Biol Chem, 272, 28971-9.
- Muggleton-Harris, A.L. & Hayflick, L. (1976). Exp Cell Res, 103, 321-30.
- Muller, F.L., Liu, Y. & Van Remmen, H. (2004). J Biol Chem, 279, 49064-73.
- Munoz, P., Blanco, R. & Blasco, M.A. (2006). Cell Cycle, 5, 718-21.
- Munoz, P., Blanco, R., Flores, J.M. & Blasco, M.A. (2005). Nat Genet, 37, 1063-71.
- Murai, M., Enokido, Y., Inamura, N., Yoshino, M., Nakatsu, Y., van der Horst, G.T., Hoeijmakers, J.H., Tanaka, K. & Hatanaka, H. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13379-84.
- Murakami, S., Salmon, A. & Miller, R.A. (2003). Faseb J, 17, 1565-6.
- Nakamura, H., Matsuda, M., Furuke, K., Kitaoka, Y., Iwata, S., Toda, K., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Ozawa, K. & Yodoi, J. (1994). *Immunol Lett*, **42**, 75-80.
- Nakamura, T.M. & Cech, T.R. (1998). Cell, 92, 587-90.
- Nakamura, T.M., Morin, G.B., Chapman, K.B., Weinrich, S.L., Andrews, W.H., Lingner, J., Harley, C.B. & Cech, T.R. (1997). Science, **277**, 955-9.
- Nick McElhinny, S.A., Snowden, C.M., McCarville, J. & Ramsden, D.A. (2000). *Mol Cell Biol*, **20**, 2996-3003.
- Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y. & Noguchi, N. (2005). Biochem Biophys Res Commun, 338, 668-76.
- Nishino, I. (2003). Curr Neurol Neurosci Rep, 3, 64-9.
- Nittis, T., Guittat, L. & Stewart, S.A. (2008). Biochimie, 90, 5-12.
- Nordberg, J. & Arner, E.S. (2001). Free Radic Biol Med, 31, 1287-312.
- O'Connor, M.S., Safari, A., Liu, D., Qin, J. & Songyang, Z. (2004). J Biol Chem, 279, 28585-91.
- O'Connor, M.S., Safari, A., Xin, H., Liu, D. & Songyang, Z. (2006). Proc Natl Acad Sci U S A, 103, 11874-9.
- Ohlemiller, K.K., McFadden, S.L., Ding, D.L., Flood, D.G., Reaume, A.G., Hoffman, E.K., Scott, R.W., Wright, J.S., Putcha, G.V. & Salvi, R.J. (1999). *Audiol Neurootol*, **4**, 237-46.
- Opresko, P.L., Fan, J., Danzy, S., Wilson, D.M., 3rd & Bohr, V.A. (2005). *Nucleic Acids Res*, **33**, 1230-9.
- Pak, J.W., Herbst, A., Bua, E., Gokey, N., McKenzie, D. & Aiken, J.M. (2003). Aging Cell, 2, 1-7.
- Pallardo, F.V., Degan, P., d'Ischia, M., Kelly, F.J., Zatterale, A., Calzone, R., Castello, G., Fernandez-Delgado, R., Dunster, C., Lloret, A., Manini, P., Pisanti, M.A., Vuttariello, E. & Pagano, G. (2006). *Biogerontology*, **7**, 211-20.
- Palmero, I., McConnell, B., Parry, D., Brookes, S., Hara, E., Bates, S., Jat, P. & Peters, G. (1997). Oncogene, **15**, 495-503.
- Papp, L.V., Lu, J., Holmgren, A. & Khanna, K.K. (2007). Antioxid Redox Signal, 9, 775-806.
- Paradis, V., Youssef, N., Dargere, D., Ba, N., Bonvoust, F., Deschatrette, J. & Bedossa, P. (2001). Hum Pathol, **32**, 327-32.

- Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S. & Campisi, J. (2003). Nat Cell Biol, 5, 741-7.
- Pelicano, H., Carney, D. & Huang, P. (2004). Drug Resist Updat, 7, 97-110.
- Perrem, K., Bryan, T.M., Englezou, A., Hackl, T., Moy, E.L. & Reddel, R.R. (1999). Oncogene, 18, 3383-90.
- Pervaiz, S. & Clement, M.V. (2007). Int J Biochem Cell Biol, 39, 1297-304.
- Pfeiffer, P., Goedecke, W. & Obe, G. (2000). *Mutagenesis*, **15**, 289-302.
- Pignolo, R.J., Rotenberg, M.O. & Cristofalo, V.J. (1994). In Vitro Cell Dev Biol Anim, 30A, 471-6.
- Pratico, D., Iuliano, L., Amerio, G., Tang, L.X., Rokach, J., Sabatino, G. & Violi, F. (2000). *Ann Neurol*, **48**, 795-8.
- Prise, K.M., Davies, S. & Michael, B.D. (1989). Int J Radiat Biol, 55, 583-92.
- Prowse, K.R. & Greider, C.W. (1995). Proc Natl Acad Sci U S A, 92, 4818-22.
- Puthenveettil, J.A., Burger, M.S. & Reznikoff, C.A. (1999). Adv Exp Med Biol, 462, 83-91.
- Puzianowska-Kuznicka, M. & Kuznicki, J. (2005). Int J Biochem Cell Biol, 37, 947-60.
- Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E.L.,
- Mizushima, N., Ohsumi, Y., Cattoretti, G. & Levine, B. (2003). *J Clin Invest*, **112**, 1809-20.
- Ramirez, R.D., Morales, C.P., Herbert, B.S., Rohde, J.M., Passons, C., Shay, J.W. & Wright, W.E. (2001). *Genes Dev*, **15**, 398-403.
- Ramsden, D.A. & Gellert, M. (1998). Embo J, 17, 609-14.
- Rao, K.S. (2007). Neuroscience, **145**, 1330-40.
- Rayet, B. & Gelinas, C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer.
- Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown, R.H., Jr., Scott, R.W. & Snider, W.D. (1996). *Nat Genet*, **13**, 43-7.
- Reddel, R.R., Bryan, T.M. & Murnane, J.P. (1997). *Biochemistry (Mosc)*, 62, 1254-62.
- Requena, J.R., Fu, M.X., Ahmed, M.U., Jenkins, A.J., Lyons, T.J., Baynes, J.W. & Thorpe, S.R. (1997). *Biochem J*, **322 (Pt 1),** 317-25.
- Ressler, S., Bartkova, J., Niederegger, H., Bartek, J., Scharffetter-Kochanek, K., Jansen-Durr, P. & Wlaschek, M. (2006). *Aging Cell*, **5**, 379-89.
- Rheinwald, J.G., Hahn, W.C., Ramsey, M.R., Wu, J.Y., Guo, Z., Tsao, H., De Luca, M., Catricala, C. & O'Toole, K.M. (2002). *Mol Cell Biol*, **22**, 5157-72.
- Richter, T., Saretzki, G., Nelson, G., Melcher, M., Olijslagers, S. & von Zglinicki, T. (2007). *Mech Ageing Dev*, **128**, 340-5.
- Romanick, M.A., Rakoczy, S.G. & Brown-Borg, H.M. (2004). Mech Ageing Dev, 125, 269-81.
- Romanov, S.R., Kozakiewicz, B.K., Holst, C.R., Stampfer, M.R., Haupt, L.M. & Tlsty, T.D. (2001). *Nature*, **409**, 633-7.
- Rotilio, G., Calabrese, L., Bossa, F., Barra, D., Agro, A.F. & Mondovi, B. (1972). *Biochemistry*, **11**, 2182-7.
- Rudolph, K.L., Chang, S., Lee, H.W., Blasco, M., Gottlieb, G.J., Greider, C. & DePinho, R.A. (1999). *Cell*, **96**, 701-12.
- Rudolph, K.L., Millard, M., Bosenberg, M.W. & DePinho, R.A. (2001). Nat Genet, 28, 155-9.
- Rufer, N., Migliaccio, M., Antonchuk, J., Humphries, R.K., Roosnek, E. & Lansdorp, P.M. (2001). Blood, **98**, 597-603.
- Sakai, Y., Furuichi, M., Takahashi, M., Mishima, M., Iwai, S., Shirakawa, M. & Nakabeppu, Y. (2002). J Biol Chem, **277**, 8579-87.
- Sampey, A.V., Monrad, S. & Crofford, L.J. (2005). Arthritis Res Ther, 7, 114-7.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K. & Linn, S. (2004). Annu Rev Biochem, 73, 39-85.
- Sandhu, C., Peehl, D.M. & Slingerland, J. (2000). Cancer Res, 60, 2616-22.
- Sastre, J., Pallardo, F.V. & Vina, J. (2003). Free Radic Biol Med, 35, 1-8.
- Satoh, M.S., Jones, C.J., Wood, R.D. & Lindahl, T. (1993). Proc Natl Acad Sci U S A, 90, 6335-9.
- Sayre, L.M., Smith, M.A. & Perry, G. (2001). Curr Med Chem, 8, 721-38.
- Scandalios, J.G. (2005). Braz J Med Biol Res, 38, 995-1014.
- Schaur, R.J. (2003). Mol Aspects Med, 24, 149-59.
- Scherz-Shouval, R. & Elazar, Z. (2007). Trends Cell Biol, 17, 422-7.
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E. & Elazar, Z. (2007a). Autophagy, 3, 371-3.
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L. & Elazar, Z. (2007b). *Embo J*, **26**, 1749-60.
- Sedelnikova, O.A., Horikawa, I., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Bonner, W.M. & Barrett, J.C. (2004). Nat Cell Biol, 6, 168-70.
- Sekiguchi, M. & Tsuzuki, T. (2002). Oncogene, 21, 8895-904.

- Serra, V., von Zglinicki, T., Lorenz, M. & Saretzki, G. (2003). J Biol Chem, 278, 6824-30.
- Serrano, M., Lee, H., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D. & DePinho, R.A. (1996). Cell, 85, 27-37.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D. & Lowe, S.W. (1997). Cell, 88, 593-602.
- Shay, J.W. & Wright, W.E. (2000). Nat Rev Mol Cell Biol, 1, 72-6.
- Sherwood, S.W., Rush, D., Ellsworth, J.L. & Schimke, R.T. (1988). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 9086-90.
- Siems, W.G., Grune, T., Beierl, B., Zollner, H. & Esterbauer, H. (1992). Exs, 62, 124-35.
- Sies, H. & Stahl, W. (1995). Am J Clin Nutr, 62, 1315S-1321S.
- Slatter, D.A., Murray, M. & Bailey, A.J. (1998). FEBS Lett, 421, 180-4.
- Slominski, A., Tobin, D.J., Zmijewski, M.A., Wortsman, J. & Paus, R. (2008). Trends Endocrinol Metab, 19, 17-24.
- Slupphaug, G., Kavli, B. & Krokan, H.E. (2003). Mutat Res, 531, 231-51.
- Smith, J.R. & Pereira-Smith, O.M. (1996). Science, 273, 63-7.
- Smith, S., Giriat, I., Schmitt, A. & de Lange, T. (1998). Science, 282, 1484-7.
- Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M.R., Schnapp, G. & de Lange, T. (2000). *Mol Cell Biol*, **20**, 1659-68.
- Sohal, R.S. (2002). Free Radic Biol Med, 33, 37-44.
- Sohal, R.S., Arnold, L.A. & Sohal, B.H. (1990). Free Radic Biol Med, 9, 495-500.
- Sohal, R.S. & Dubey, A. (1994). Free Radic Biol Med, 16, 621-6.
- Sohal, R.S. & Sohal, B.H. (1991). *Mech Ageing Dev*, **57**, 187-202.
- Spyrou, G., Enmark, E., Miranda-Vizuete, A. & Gustafsson, J. (1997). J Biol Chem, 272, 2936-41.
- Stavropoulos, D.J., Bradshaw, P.S., Li, X., Pasic, I., Truong, K., Ikura, M., Ungrin, M. & Meyn, M.S. (2002). *Hum Mol Genet*, **11**, 3135-44.
- Stuart, J.A., Karahalil, B., Hogue, B.A., Souza-Pinto, N.C. & Bohr, V.A. (2004). Faseb J, 18, 595-7.
- Sundaram, M., Guernsey, D.L., Rajaraman, M.M. & Rajaraman, R. (2004). *Cancer Biol Ther*, **3**, 207-18.
- Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Sulciner, D.J., Gutkind, J.S., Irani, K., Goldschmidt-Clermont, P.J. & Finkel, T. (1996). *Biochem J*, **318 (Pt 2)**, 379-82.
- Sung, P. (1994). Science, 265, 1241-3.
- Szatrowski, T.P. & Nathan, C.F. (1991). Cancer Res, 51, 794-8.
- Takahashi, K., Akasaka, M., Yamamoto, Y., Kobayashi, C., Mizoguchi, J. & Koyama, J. (1990). *J* Biochem, **108**, 145-8.
- Takai, H., Smogorzewska, A. & de Lange, T. (2003). Curr Biol, 13, 1549-56.
- Takeda, T., Matsushita, T., Kurozumi, M., Takemura, K., Higuchi, K. & Hosokawa, M. (1997). *Exp Gerontol*, **32**, 117-27.
- Taniguchi, Y., Taniguchi-Ueda, Y., Mori, K. & Yodoi, J. (1996). Nucleic Acids Res, 24, 2746-52.
- Tarsounas, M., Munoz, P., Claas, A., Smiraldo, P.G., Pittman, D.L., Blasco, M.A. & West, S.C. (2004). *Cell*, **117**, 337-47.
- Taylor, R.S., Ramirez, R.D., Ogoshi, M., Chaffins, M., Piatyszek, M.A. & Shay, J.W. (1996). J Invest Dermatol, 106, 759-65.
- Thannickal, V.J. & Fanburg, B.L. (2000). Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 279, L1005-28.
- Thomas, J.P. & Girotti, A.W. (1988). Biochim Biophys Acta, 962, 297-307.
- Tian, M., Shinkura, R., Shinkura, N. & Alt, F.W. (2004). Mol Cell Biol, 24, 1200-5.
- Todaro, G.J. & Green, H. (1963). *J Cell Biol*, **17**, 299-313.
- Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J. & Hiai, H. (1995). FEBS Lett, 358, 1-3.
- Traber, M.G. & Atkinson, J. (2007). Free Radic Biol Med, 43, 4-15.
- 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. & Pelicci, P.G. (2002). *Oncogene*, **21**, 3872-8.
- Tsutsui, T., Kumakura, S., Tamura, Y., Tsutsui, T.W., Sekiguchi, M., Higuchi, T. & Barrett, J.C. (2003). *Carcinogenesis*, **24**, 953-65.
- Tsutsui, T., Tanaka, Y., Matsudo, Y., Hasegawa, K., Fujino, T., Kodama, S. & Barrett, J.C. (1997). *Mol Carcinog*, **18**, 7-18.
- Tyner, S.D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., Hee Park, S., Thompson, T., Karsenty, G., Bradley, A. & Donehower, L.A. (2002). *Nature*, **415**, 45-53.

Unterluggauer, H., Hampel, B., Zwerschke, W. & Jansen-Durr, P. (2003). *Exp Gerontol*, **38**, 1149-60. Ursini, F., Maiorino, M. & Gregolin, C. (1985). *Biochim Biophys Acta*, **839**, 62-70.

Utomo, A., Jiang, X., Furuta, S., Yun, J., Levin, D.S., Wang, Y.C., Desai, K.V., Green, J.E., Chen, P.L. & Lee, W.H. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 43522-9.

- Utsunomiya, H., Komatsu, N., Yoshimura, S., Tsutsumi, Y. & Watanabe, K. (1991). *J Histochem Cytochem*, **39**, 1167-74.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. & Telser, J. (2007). *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 44-84.
- van Bladeren, P.J. (2000). Chem Biol Interact, **129**, 61-76.
- van Steensel, B. & de Lange, T. (1997). Nature, **385**, 740-3.
- van Steensel, B., Smogorzewska, A. & de Lange, T. (1998). Cell, 92, 401-13.
- Varela, I., Cadinanos, J., Pendas, A.M., Gutierrez-Fernandez, A., Folgueras, A.R., Sanchez, L.M., Zhou, Z., Rodriguez, F.J., Stewart, C.L., Vega, J.A., Tryggvason, K., Freije, J.M. & Lopez-Otin, C. (2005). *Nature*, **437**, 564-8.
- Vasile, E., Tomita, Y., Brown, L.F., Kocher, O. & Dvorak, H.F. (2001). Faseb J, 15, 458-66.
- Vaziri, H. & Benchimol, S. (1998). Curr Biol, 8, 279-82.
- Vernet, P., Rigaudiere, N., Ghyselinck, N., Dufaure, J.P. & Drevet, J.R. (1996). *Biochem Cell Biol*, **74**, 125-31.
- Vogel, H., Lim, D.S., Karsenty, G., Finegold, M. & Hasty, P. (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 10770-5.
- von Zglinicki, T., Pilger, R. & Sitte, N. (2000). Free Radic Biol Med, 28, 64-74.
- von Zglinicki, T., Saretzki, G., Docke, W. & Lotze, C. (1995). Exp Cell Res, 220, 186-93.
- von Zglinicki, T., Saretzki, G., Ladhoff, J., d'Adda di Fagagna, F. & Jackson, S.P. (2005). *Mech Ageing Dev*, **126**, 111-7.
- Voss, P. & Siems, W. (2006). Free Radic Res, 40, 1339-49.
- Vyjayanti, V.N. & Rao, K.S. (2006). Neurosci Lett, 393, 18-22.
- Walen, K.H. (2004). In Vitro Cell Dev Biol Anim, 40, 150-8.
- Wang, E. (1995). Cancer Res, Vol. 55, pp 2284-92.
- Wang, F., Podell, E.R., Zaug, A.J., Yang, Y., Baciu, P., Cech, T.R. & Lei, M. (2007). *Nature*, **445**, 506-10.
- Weeda, G., Donker, I., de Wit, J., Morreau, H., Janssens, R., Vissers, C.J., Nigg, A., van Steeg, H., Bootsma, D. & Hoeijmakers, J.H. (1997). *Curr Biol*, **7**, 427-39.
- Wei, W. & Sedivy, J.M. (1999). Exp Cell Res, 253, 519-22.
- Wei, Y.H. (1992). Mutat Res, 275, 145-55.
- Wei, Y.H. & Lee, H.C. (2002). Exp Biol Med (Maywood), 227, 671-82.
- Weindruch, R. (1989). J Gerontol, 44, 67-71.
- Weinrich, S.L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V.M., Holt, S.E., Bodnar, A.G., Lichtsteiner, S., Kim, N.W., Trager, J.B., Taylor, R.D., Carlos, R., Andrews, W.H., Wright, W.E., Shay, J.W., Harley, C.B. & Morin, G.B. (1997). *Nat Genet*, **17**, 498-502.
- Weisiger, R.A. & Fridovich, I. (1973). J Biol Chem, 248, 4793-6.
- Wilson, D.M., 3rd & Bohr, V.A. (2007). DNA Repair (Amst), 6, 544-59.
- Wingler, K. & Brigelius-Flohe, R. (1999). Biofactors, 10, 245-9.
- Wohlgemuth, S.E., Julian, D., Akin, D.E., Fried, J., Toscano, K., Leeuwenburgh, C. & Dunn, W.A., Jr. (2007). *Rejuvenation Res*, **10**, 281-92.
- Wolf, F.I., Torsello, A., Covacci, V., Fasanella, S., Montanari, M., Boninsegna, A. & Cittadini, A. (2002). *Exp Gerontol*, **37**, 647-56.
- Wong, K.K., Maser, R.S., Bachoo, R.M., Menon, J., Carrasco, D.R., Gu, Y., Alt, F.W. & DePinho, R.A. (2003). *Nature*, **421**, 643-8.
- Wood, R.D., Mitchell, M., Sgouros, J. & Lindahl, T. (2001). Science, 291, 1284-9.
- Wood, Z.A., Schroder, E., Robin Harris, J. & Poole, L.B. (2003). Trends Biochem Sci, 28, 32-40.
- Wright, W.E. & Hayflick, L. (1975). Exp Cell Res, 96, 113-21.
- Wu, D. & Meydani, S.N. (2004). Brain Behav Immun, 18, 487-94.
- Wu, G., Lee, W.H. & Chen, P.L. (2000). J Biol Chem, 275, 30618-22.
- Wu, L., Multani, A.S., He, H., Cosme-Blanco, W., Deng, Y., Deng, J.M., Bachilo, O., Pathak, S., Tahara, H., Bailey, S.M., Behringer, R.R. & Chang, S. (2006). *Cell*, **126**, 49-62.
- Xin, H., Liu, D., Wan, M., Safari, A., Kim, H., Sun, W., O'Connor, M.S. & Songyang, Z. (2007). *Nature*, **445**, 559-62.
- Yang, J., Chang, E., Cherry, A.M., Bangs, C.D., Oei, Y., Bodnar, A., Bronstein, A., Chiu, C.P. & Herron, G.S. (1999). *J Biol Chem*, **274**, 26141-8.
- Ye, J.Z., Donigian, J.R., van Overbeek, M., Loayza, D., Luo, Y., Krutchinsky, A.N., Chait, B.T. & de Lange, T. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 47264-71.
- Yeager, T.R., Neumann, A.A., Englezou, A., Huschtscha, L.I., Noble, J.R. & Reddel, R.R. (1999). Cancer Res, 59, 4175-9.
- Yin, D. (1996). Free Radic Biol Med, 21, 871-88.

- Yoshioka, T., Homma, T., Meyrick, B., Takeda, M., Moore-Jarrett, T., Kon, V. & Ichikawa, I. (1994). *Kidney Int*, **46**, 405-13.
- Young, J.I. & Smith, J.R. (2001). J Biol Chem, 276, 19610-6.
- Youngman, L.D., Park, J.Y. & Ames, B.N. (1992). Proc Natl Acad Sci U S A, 89, 9112-6.
- Yu, C.L., Liu, C.L., Tsai, C.Y., Sun, K.H., Liao, T.S., Lin, W.M., Chen, H.L. & Yu, H.S. (1993). Agents Actions, 40, 191-9.
- Yudoh, K., Matsuno, H., Nakazawa, F., Katayama, R. & Kimura, T. (2001). *J Bone Miner Res*, **16**, 1453-64.

Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J. & Heintz, N. (2003). Proc Natl Acad Sci U S A, 100, 15077-82.

- Zalenskaya, I.A. & Zalensky, A.O. (2002). Int Rev Cytol, 218, 37-67.
- Zarkovic, N. (2003). Mol Aspects Med, 24, 281-91.
- Zhang, Z., Rosen, D.G., Yao, J.L., Huang, J. & Liu, J. (2006). Mod Pathol, 19, 1339-43.
- Zhu, J., Woods, D., McMahon, M. & Bishop, J.M. (1998). Genes Dev, 12, 2997-3007.
- Zhu, X.D., Kuster, B., Mann, M., Petrini, J.H. & de Lange, T. (2000). Nat Genet, 25, 347-52.
- Zhu, X.D., Niedernhofer, L., Kuster, B., Mann, M., Hoeijmakers, J.H. & de Lange, T. (2003). *Mol Cell*, **12**, 1489-98.