

Université de Montréal

**Vieillesse vasculaire chez des patients
athérosclérotiques : sénescence prématurée des
cellules endothéliales ?**

Par :

Guillaume Voghel

Département de physiologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph.D. en Physiologie

Mars, 2009

© Guillaume Voghel, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Vieillesse vasculaire chez des patients
athérosclérotiques : sénescence prématurée des cellules
endothéliales ?**

Présentée par :

Guillaume Voghel

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

- Dr Marc Servant, président-rapporteur
- Dr Éric Thorin, directeur de recherche
- Dr Sylvain Meloche, membre du jury
- Dr Michel Lebel, examinateur externe
- Dr Réjean Couture, représentant du doyen de la FES

Résumé

La dysfonction de l'endothélium vasculaire, associée à une diminution de ses propriétés vasorelaxantes et anti-thrombogéniques, survient avec le vieillissement mais également chez de plus jeunes patients athérosclérotiques présentant plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire. Au niveau cellulaire, le vieillissement des cellules endothéliales (CE) mène à un état irréversible de non division cellulaire appelé sénescence. Ces cellules sénescents présentent des changements spécifiques au niveau de leur morphologie et de l'expression génique, menant à leur dysfonction. La sénescence dite répllicative est déclenchée par le raccourcissement des télomères survenant à chaque division cellulaire, mais peut également être induite prématurément par le stress oxydant (SIPS). L'objectif principal de cette étude est de caractériser la sénescence de CE vasculaires isolées à partir de patients athérosclérotiques, et d'observer l'impact des facteurs de risque sur cette sénescence. Afin de confirmer la contribution des deux principales voies de la sénescence, nous avons par la suite étudié conjointement ou séparément, l'impact d'un traitement chronique avec un antioxydant sur la sénescence de CE, et d'une surexpression de la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT), une enzyme responsable de l'allongement des télomères.

Nous avons isolé et cultivé des CE provenant d'artères mammaires internes prélevées lors de pontages coronariens. Selon les études, les cellules ont été infectées ou non avec un lentivirus surexprimant la hTERT, et cultivées *in vitro* jusqu'à sénescence, en présence ou en absence de l'antioxydant *N*-acétyl-*L*-cystéine (NAC). Différents marqueurs des deux principales voies de la sénescence (répllicative ou SIPS) ont été quantifiés.

La sénescence cellulaire se développe exponentiellement avec le temps et est associée à une réduction de la viabilité et de la prolifération cellulaires. Chez les patients athérosclérotiques, le vieillissement des CE passe par les deux principales voies de la sénescence : des télomères courts initialement en culture et la durée d'exposition *in vivo* aux facteurs de risque cardiovasculaire prédisent une apparition prématurée de la sénescence. Toutefois, chez les fumeurs, la sénescence est exclusivement du type SIPS. Ces facteurs de risque cardiovasculaire et principalement l'hypertension, semblent accélérer le vieillissement biologique et favoriser la dysfonction des CE. Lorsque traitées chroniquement avec le NAC, les CE présentant initialement de moindres dommages cellulaires et moléculaires ainsi qu'une meilleure défense antioxydante développent une sénescence retardée. Lorsque le NAC est combiné à une surexpression de la hTERT, les deux voies de la sénescence sont bloquées et une immortalisation cellulaire est observée. À l'inverse, dans les CE les plus endommagées par les ROS *in vivo*, le NAC n'a aucun effet sur le développement de la sénescence, la hTERT, seule ou en combinaison avec le NAC, retarde légèrement la sénescence mais aucune immortalisation n'est observée lorsque ces traitements sont combinés.

En conclusion, nos études démontrent que l'exposition chronique au stress oxydant associé aux facteurs de risque cardiovasculaire accélère le développement de la sénescence de CE vasculaires, contribuant potentiellement à l'athérogénèse. Dans les cellules de patients athérosclérotiques, il semble exister un seuil de dommages cellulaires et moléculaires subis *in vivo* au-delà duquel, aucun traitement (antioxydant ou hTERT) ne peut être bénéfique.

Mots clés : Athérosclérose, facteurs de risque cardiovasculaire, endothélium, artère mammaire interne, sénescence répllicative, sénescence induite par le stress, télomère, télomérase, stress oxydant, antioxydant.

Abstract

Vascular aging is associated with a decrease in endothelial dilatory and antithrombotic functions. This typical endothelial dysfunction, however, is also present in younger patients with cardiovascular diseases (CVD). At the cellular level, aging of healthy vascular endothelial cells (EC) leads to senescence, a state of permanent growth arrest. Senescence is characterized by specific changes in cell morphology and gene expression, which reduce EC function and thus are proposed to be pro-atherogenic. Age-associated telomere shortening leads to replicative senescence of human endothelial cells, but senescence can also be induced prematurely by oxidative stress (SIPS). Our aim was to characterize senescence of EC isolated from atherosclerotic patients and look at the influence of risk factors for CVD on the onset of senescence. To confirm the contribution of each of the two main pathways triggering senescence, we then looked at the impact on senescence of a chronic treatment with an antioxidant combined or not with an overexpression of the catalytic subunit of telomerase (hTERT), a reverse transcriptase involved in telomere elongation.

We used EC isolated from internal mammary arteries discarded during coronary bypass graft surgery. Depending on the study, EC were infected or not with a lentivirus overexpressing hTERT, and cells were cultured *in vitro* until senescence, in the presence or the absence of the antioxidant *N*-acetyl-*L*-cysteine (NAC). Different markers of the two main pathways of senescence (replicative ou SIS) were quantified.

Senescence develops exponentially with time in culture and is associated with a decrease in cell viability and proliferation. In atherosclerotic patients, cellular aging displays an overlap between replicative and stress-induced senescence: short initial telomere length *in vitro* and a long exposure to risk factors for CVD *in vivo* predict the onset of a premature senescence. However, in smoking patients, premature senescence is exclusively induced by oxidative stress. Risk factors for CVD seem to accelerate the biological aging leading to EC dysfunction. When treated chronically with NAC, EC presenting initially lower levels of damage and a better endogenous antioxidant capacity develop a delayed senescence, probably due to a slight hTERT activation. When NAC is combined with an overexpression of hTERT, both pathways triggering senescence are blocked and cellular immortalization is observed. In contrast, in EC presenting higher levels of damage undergone *in vivo*, NAC has no effect by itself on the onset of senescence, hTERT delays the onset of senescence in combination or not with NAC, but no cellular immortalization was observed in NAC-hTERT cells.

In conclusion, our studies show that a chronic *in vivo* exposition to oxidative stress associated with risk factors for CVD accelerates the onset of vascular endothelial cells senescence that could potentially contribute to atherogenesis. EC having strong antioxidant defense capacity and DNA repair mechanisms may be rescued from replicative and stress-induced senescence unless EC have undergone an insurmountable cellular and molecular damage possibly due to uncontrolled free radical production associated with risk factors for CVD.

Keywords : Atherosclerosis, risk factors for cardiovascular disease, endothelium, internal mammary artery, replicative senescence, stress-induced senescence, telomere, telomerase, oxidative stress, antioxidant.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	vi
Table des matières.....	ix
Liste des tableaux.....	xvi
Liste des figures.....	xvii
Abréviations.....	xix
Remerciements.....	xxiv
1. Introduction.....	1
1.1. Les rôles de l'endothélium vasculaire sain.....	1
1.1.1. Le tonus vasomoteur.....	2
1.1.2. Les propriétés anti-thrombogéniques.....	5
1.1.3. Les propriétés anti-inflammatoires.....	6
1.1.4. Les propriétés anti-prolifératives des cellules musculaires lisses.....	8
1.1.5. Les cellules endothéliales progénitrices.....	9
1.2. Le vieillissement.....	12
1.2.1. Théorie des ROS (Harman 1956).....	12
1.2.2. La dysfonction endothéliale en conditions pro-athérogéniques : vieillesse accélérée?.....	13
1.2.3. L'athérosclérose.....	15
1.2.4. Les facteurs de risque cardiovasculaire.....	20
1.2.4.1. La dyslipidémie	20

1.2.4.2.	Le tabagisme	21
1.2.4.3.	Le diabète	23
1.2.4.4.	L'hypertension.....	25
1.2.4.5.	L'obésité.....	26
1.2.4.6.	L'âge.....	27
1.2.4.7.	La sédentarité ou l'absence d'effets bénéfiques.....	28
1.2.5.	Les cellules endothéliales progénitrices et les maladies cardiovasculaires.....	30
1.3.	Le vieillissement cellulaire.....	32
1.3.1.	Le cycle cellulaire.....	32
1.3.2.	La sénescence : vieillissement cellulaire ou réponse au stress?.....	37
1.3.2.1.	Molécules impliquées dans la sénescence.....	40
1.4.	Les télomères et le vieillissement.....	47
1.4.1.	Structure et fonctions.....	48
1.4.2.	<i>End-replication problem</i> et l'instabilité télomérique : dommages à l'ADN?.....	51
1.4.3.	Les mécanismes de maintenance des télomères.....	54
1.4.3.1.	La télomérase.....	54
1.4.3.1.1	L'activité télomérique.....	54
1.4.3.1.2	Les activités extra-télomériques.....	56
1.4.3.2.	L' <i>Alternative Lengthening of Telomeres</i> (ALT).....	57
1.5.	Les radicaux libres.....	59
1.5.1.	Les sources endogènes de radicaux libres.....	60
1.5.2.	Les fonctions physiologiques des radicaux libres.....	61

1.5.2.1.	Signalisation intracellulaire.....	61
1.5.2.2.	La défense immunitaire.....	62
1.5.2.3.	Le contrôle du tonus vasomoteur.....	62
1.5.2.4.	L'apoptose.....	63
1.5.2.5.	L'adhésion cellulaire.....	64
1.5.3.	Le stress oxydant et ses conséquences pathologiques.....	64
1.5.3.1.	Les dommages cellulaires et moléculaires.....	65
1.5.3.2.	Les pathologies associées au stress oxydant.....	68
1.5.3.2.1.	Les facteurs de risque cardiovasculaire.....	68
1.5.3.2.2.	Le cancer.....	70
1.6.	Les antioxydants.....	71
1.6.1.	Les antioxydants endogènes.....	72
1.6.1.1.	Les antioxydants enzymatiques.....	72
1.6.1.2.	Les antioxydants non-enzymatiques.....	72
1.6.2.	Les antioxydants exogènes.....	73
1.6.2.1.	Les polyphénols.....	73
1.6.2.2.	Le <i>N</i> -acétyl- <i>L</i> -cystéine.....	73
1.6.2.3.	Les statines.....	75
1.7.	Modèles expérimentaux de vieillissement.....	76
1.7.1.	Syndrome de Werner.....	77
1.7.2.	Syndrome Hutchinson-Gilford.....	78
1.7.3.	Ataxie télangiectasie.....	80
1.7.4.	Dyskeratosis congenita.....	81
1.8.	Biomarqueurs potentiels du vieillissement.....	82

1.8.1.	Les marqueurs de stress oxydant.....	83
1.8.2.	Les marqueurs de glycation protéique	84
1.8.3.	Les marqueurs d'inflammation	85
1.8.4.	Les télomères et la sénescence	86
1.8.5.	Les hormones et le vieillissement.....	87
2.	Raisonnement et démarches.....	89
	Étude #1.....	89
	Étude #2.....	90
	Étude #3.....	91
	Étude #4.....	92
3.	Méthodologie.....	93
3.1.	Modèle expérimental.....	93
3.2.	Culture cellulaire.....	94
3.2.1.	Première étude : caractérisation de la sénescence en conditions pathologiques.....	94
3.2.2.	Deuxième étude : Effets d'un traitement chronique avec un antioxydant.....	97
3.2.3.	Troisième étude : Effets d'un traitement chronique avec l'antioxydant NAC combiné ou non avec une surexpression de la sous-unité catalytique de la télomérase.....	98
3.2.4.	Quatrième étude : Identifier l'impact du tabagisme sur la sénescence cellulaire.....	99
3.3.	Détection de l'activité de la β -Galactosidase associée à la sénescence.....	100

3.3.1. Description de la méthode.....	101
3.4. Test de viabilité cellulaire (bleu de trypan).....	102
3.4.1. Description de la méthode.....	102
3.5. Mesure de la longueur des télomères par immunobuvardage de type Southern.....	103
3.5.1. Extraction de l'ADN génomique.....	105
3.5.2. Marquage radioactif des poids moléculaires et de la sonde d'oligonucléotides.....	107
3.5.3. Préparation des échantillons.....	108
3.5.4. Description de la méthode d'immunobuvardage de type Southern.....	109
3.6. Immunofluorescence.....	112
3.6.1. Description de la méthode.....	113
3.6.2. Fondements de la microscopie confocale à balayage laser (MCBL).....	115
3.6.3. Ajustement des signaux photoélectriques convertis en signaux numériques par déconvolution.....	117
3.7. Quantification des protéines cellulaires par immunobuvardage de type Western.....	118
3.7.1. Extraction des protéines.....	119
3.7.2. Description de la méthode d'immunobuvardage de type Western.....	120
3.8. Quantification de l'expression génique par pcr en temps réel.....	121
3.8.1. Isolation de l'ARN total.....	122

3.8.2.	Production du brin d'ADN complémentaire.....	123
3.8.3.	Design des amorces spécifiques.....	123
3.8.4.	Mise au point des courbes standards.....	124
3.8.5.	Acquisition des résultats.....	125
3.8.6.	Analyse et présentation des résultats.....	127
3.9.	Quantification de l'activité de la télomérase.....	128
3.9.1.	Extraction des protéines.....	131
3.9.2.	Description de la méthode du TRAP conventionnel sur gel	131
3.9.3.	Description de la méthode du TRAP en temps réel	132
3.10.	Quantification du stress oxydant et de la capacité antioxydante	134
3.10.1.	Quantification du stress oxydant.....	135
3.10.2.	Quantification de la capacité antioxydante endogène.....	135
3.11.	Infection lentivirale.....	137
3.11.1.	Description de la méthode.....	138
3.12.	Analyses statistiques.....	140
4.	Articles.....	142
	Étude #1.....	142
	Étude #2.....	178
	Étude #3.....	211
	Étude #4.....	250
5.	Discussion.....	280
5.1.	Sénescence cellulaire et vieillissement de l'organisme.....	280
5.1.1.	Sénescence cellulaire : cause du vieillissement <i>in vivo</i> ?.....	280

5.1.2. Sénescence cellulaire <i>in vivo</i> : télomères dépendante ou indépendante?.....	282
5.1.3. Extrapolation des études de sénescence <i>in vitro</i> au vieillissement <i>in vivo</i>	287
5.2. Sénescence et athérosclérose.....	288
5.2.1. Caractérisation de la sénescence des cellules endothéliales de patients athérosclérotiques: implications conjointes de la sénescence réplivative et celle induite prématurément par le stress oxydant.....	288
5.2.2. Rôle de la sénescence de cellules endothéliales vasculaires dans le développement de l'athérosclérose	293
5.3. Limitations	296
5.4. Perspectives.....	299
6. Conclusions.....	302
7. Bibliographie.....	304

Liste des tableaux

Tableau 1: Biomarqueurs potentiels du vieillissement (Selon Simm *et al.* 2008).....83

Tableau 2: Séquences des amorces utilisées.....124

Liste des figures

Figure 1: Origine et différenciation des cellules endothéliales progénitrices. (Selon Smadja <i>et al.</i> 2007).....	10
Figure 2: Changements fonctionnels au niveau de la paroi vasculaire associés au vieillissement (Selon Minamino <i>et al.</i> 2002).....	14
Figure 3: Dysfonction endothéliale dans l'athérogénèse (Selon Ross <i>et al.</i> 2003).....	16
Figure 4: Formation des dépôts lipidiques dans l'athérosclérose (Selon Ross <i>et al.</i> 2003).....	18
Figure 5: Formation d'une plaque athérosclérotique avancée (Selon Ross <i>et al.</i> 2003).....	19
Figure 6: Les facteurs de risque cardiovasculaire et les cellules endothéliales progénitrices (Selon Werner <i>et al.</i> 2004).....	31
Figure 7: La régulation du cycle cellulaire par les complexes CDK-cyclines. (Tiré du site internet www.Abcam.com).....	33
Figure 8: Représentation schématique de l'activation de E2F par le complexe CDK-cycline. (Selon Schafer <i>et al.</i> 1998).....	34
Figure 9: Activation des cascades de signalisation de la sénescence par différents stimuli. (Selon Ben-Porath & Weinberg, 2005).....	43
Figure 10: Stabilisation de la boucle télomérique (<i>t-loop</i>) par le complexe <i>shelterin</i> . (Selon Dreesen <i>et al.</i> 2007).....	49
Figure 11: <i>End-replication problem</i> . (Selon Shay and Wright, 2000).....	51
Figure 12: Mode d'action de la télomérase (Adapté de Autexier et Lue, 2006).....	55
Figure 13: Mécanisme d'élongation alternatif des télomères (ALT) proposé par Reddel. (Selon Muntoni et Reddel, 2005).....	58
Figure 14: Source d'espèces réactives oxygénées et azotées (Adapté de Fortunato et al. 2005).....	60
Figure 15: Déformation de l'enveloppe nucléaire associée au syndrome de Hutchinson-Gilford. (Selon Scaffidi <i>et al.</i> 2005).....	79

Figure 16: Marquage cytochimique de la SA- β -galactosidase dans des cellules non sènescentes (A) et sènescentes (B).....	87
Figure 17 : Hémacymètre permettant le compte cellulaire.....	96
Figure 18 : Description des groupes de cellules endothéliales (CE) dans la deuxième étude.....	98
Figure 19: Description des groupes de cellules endothéliales (CE) dans la troisième étude.....	99
Figure 20: Technique d'immunobuvardage de type Southern (Tiré de Goldsby <i>et al.</i> , 2000).....	105
Figure 21: Montage de la pompe à vide (<i>vacuum blotter</i>).....	110
Figure 22: Quantification de la longueur des télomères (TRF).....	112
Figure 23 : Technique de marquage immunofluorescent (Selon Goldsby RA 2000).....	113
Figure 24 : Principe de la microscopie confocale à balayage laser (Tiré de http://www.uni-paderborn.de/en).....	116
Figure 25 : Exemple d'images non-déconvoluées et déconvoluées par la PSF.....	118
Figure 26 : Exemple de courbe standard pour un gène donné (■ : standard, ▲ : échantillons).....	125
Figure 27 : Exemple de courbe d'amplification pour le gène ATM.....	126
Figure 28 : Exemple de courbes de dissociation de l'amplicon obtenu pour le gène ATM.....	126
Figure 29. Première étape du TRAP.....	130
Figure 30. Deuxième étape du TRAP.....	130
Figure 31: Quantification de la capacité antioxydante endogène	136
Figure 32: Infection par des lentivirus (Tiré de Goldsby <i>et al.</i> , 2000).....	138

Abréviations

8-OH-G	8-hydroxydeoxyguanosine
ADNc	ADN (Acide désoxyribonucléique) complémentaire
AGE	<i>Advanced Glycation End products</i>
ALT	<i>Alternative Lengthening of Telomere</i>
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AngII	Angiotensine II
ANOVA	<i>Analyse Of Variance</i>
ApoB	Apolipoprotéine de type B
ARNm	ARN (Acide ribonucléique) messenger
AT	Ataxie Télangiectasie
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3 related</i>
BSA	Albumine de sérum bovin (<i>Bovin Serum Albumin</i>)
c.p.m.	Compte par minute
Ca ²⁺	Ion calcium
CaCl ₂	Chlorure de calcium
Cav-1	Cavéoline-1
CD31	PECAM-1 (<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>)
CDK	Kinase dépendante des cyclines (<i>Cyclin Dependant Kinase</i>)
CE	Cellule Endothéliale
CKI	Inhibiteur des CDK
CM-H ₂ DCF-DA	5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester
CML	<i>CarboxyMethyl Lysine</i>
CMV	Cytomégalovirus
CO ₂	Dioxyde de Carbone
COX	Cyclooxygénase
CRP	Peptide Réactif de type C
Ct	<i>Cycle threshold</i>
D.O.	Densité Optique
DABCO	1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane
DC	Dyskératosis Congenita
ddH ₂ O	Eau bi-distillée
DEPC	Diethyl Pyrocarbonate
DHEA	Dihydroépiandrostérone
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDCF	Facteur contracteur dérivé de l'endothélium (<i>Endothelium-Derived Contracting Factor</i>)
EDHF	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (<i>Endothelium-Derived Hyperpolarising Factor</i>)
EDRF	Facteur relaxant dérivé de l'endothélium (<i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i>)
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique

EET	Acide époxyéicosatriénoïque
eNOS	NO synthase endothéliale (NOSIII)
EPC	Cellule Endothéliale Progénitrice (<i>Endothelial Progenitor Cell</i>)
ERK	<i>Extracellular signal-regulated protein kinase</i>
ET	Endothéline
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase
GC	Guanylate Cyclase
GH	Hormone de croissance (<i>Growth Hormone</i>)
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathione
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
hAoEC	Cellule endothéliale d'aorte humaine (<i>human Aortic Endothelial Cell</i>)
HBS	<i>Hanks Balanced Salt</i>
HCl	Acide chlorhydrique
hCoEC	Cellule endothéliale d'artère coronaire (<i>human Coronary Endothelial Cell</i>)
HDL	Lipoprotéine de forte densité (<i>High Density Lipoprotein</i>)
HEK	Cellule de reins d'embryons humains (<i>Human Embryonic Kidney</i>)
HETE	Hydroxyéicosatétraénoïques
HG	Hutchison-Gilford
HIF-1	Facteur inductible par l'hypoxie-1 (<i>Hypoxia Inducible Factor-1</i>)
hIMA	Artère mammaire interne humaine (<i>human Internal Mammary Artery</i>)
HMG-coA	3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA réductase
HNE	4-hydroxy-2-nonenal
HO ₂ [•]	Hydroperoxyl
HUVEC	Cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (<i>human umbilical veins endothelial cells</i>)
ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire-1 (<i>InterCellular Adhesion Molecule-1</i>)
IGF-1	Facteur de croissance analogue à l'insuline (<i>Insuline Growth factor 1</i>)
INF	Interféron
IL	Interleukine
iNOS	NO synthase inductible (NOSII)
LDL	Lipoprotéine de faible densité (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
LOX	<i>Lectin-like oxidized LDL receptor-1</i>
LVEF	<i>Left Ventricular Ejection Fraction</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCP-1	<i>Macrophage Chemottractant Protein-1</i>
M-CSF	<i>Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>

MDA	Malondialdéhyde
MEK	<i>MAPK/ERK kinase</i>
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
Na ₂ HPO ₄	Phosphate bisodique
NAC	N-acetyl-L-cystéine
NaCl	Chlorure de sodium
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NaH ₂ PO ₄	Phosphate dihydrogène monosodique
NaOH	Hydroxyde de sodium
NH ₄ OAC	Oxaloacétate d'ammonium
nNOS	NO synthase neuronale (NOSI)
NO	Monoxyde d'azote
NOS	NO synthase
NTC	<i>No Template Control</i>
O ₂ ^{•-}	Superoxyde
OH ^{•-}	Ion hydroxyle
ONOO ^{•-}	Peroxynitrite
P.M.	Poids Moléculaires
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>
PBS	Tampon phosphate salin (<i>Phosphate Buffered Solution</i>)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelets-Derived Growth Factor</i>
PDL	<i>Population Doubling Level</i>
PGI ₂	Prostacycline
PML	<i>Promyelocytic Leukemia</i>
Pot-1	<i>Protection Of Telomere</i>
PSF	<i>Point Spread Function</i>
r.p.m.	Rotation par minute
RAGE	Récepteur aux AGEs
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted</i>
Rb	Rétinoblastome
RNS	Espèces réactives azotées (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROO ^{•-}	Radicaux peroxy
ROS	Espèces réactives oxygénées (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SA-β-Gal	<i>Senescence Associated β-galactosidase</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodécyl sulfate poly acrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SIPS	Sénescence Induite Prématurément par le Stress (<i>Stress-Induced Premature Senescence</i>)
SOD	Superoxyde dismutase
SSC	Sodium chloride sodium citrate
TBST	Tampon Tris salin supplémenté de Tween (<i>Tris Buffered-Saline Tween</i>)
TERC	<i>Telomerase RNA Component</i>
TERT	<i>TElomere Reverse Transcriptase</i>

TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TNF- α	Facteur de nécrose tumoral α (<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>)
t-PA	Activateur tissulaire du plasminogène (<i>Tissue-type Plasminogen Activator</i>)
TR	<i>Telomerase RNA</i>
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAP	<i>Telomeric Repeat Amplification Protocol</i>
TRF	<i>Telomeric Restriction Fragment</i>
TRF-1/-2	<i>Telomere Repeat binding Factor -1/-2</i>
TXA ₂	Thromboxane A ₂
U.V.	Rayons Ultra-Violets
VCAM-1	Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1 (<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>)
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
VO ₂ max	Consommation maximale en oxygène utilisée par un muscle à l'effort
vWF	Facteur de von Willebrand (<i>von Willebrand Factor</i>)
WRN	Werner
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside

*Je dédie cette thèse, à mes parents, Nicole et Alain, pour
leur support, leur amour, et leurs encouragements.*

*À mon frère Mathieu, mon meilleur ami,
pour sa complicité et sa fidélité.*

*Il ne suffit pas de dire : je me suis trompé ;
il faut dire comment on s'est trompé*

[Claude Bernard]

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier les membres du jury, les Drs Marc Servant, Sylvain Meloche, Michel Lebel et Réjean Couture, pour avoir accepté de participer à l'évaluation de ma thèse de doctorat. Leur horaire étant chacun très chargé, je leur en suis très reconnaissant de m'avoir consacré un peu de leur temps.

J'aimerais également remercier sincèrement mon directeur de recherche, le Dr Éric Thorin. Durant les six dernières années, il a su créer un environnement de laboratoire propice aux échanges et au dépassement de soi. Pour plusieurs dont moi, le laboratoire s'avérait une seconde demeure, voire même la principale, et très rares sont les fois où je rentrais à reculons les matins dans le laboratoire. Son expérience, ses connaissances et sa grande culture scientifique m'ont motivé à toujours en savoir davantage et à me poser les bonnes questions. Par son calme et son assurance, il a su mettre ses étudiants en confiance, spécialement lors de présentations à des congrès. Comme il disait si bien : « Tu es celui qui connaît le mieux ton sujet ». Avec le temps, il avait raison ! À ses côtés, j'ai pu développer un esprit scientifique critique et intègre ainsi qu'une confiance en moi, éléments clés dans la carrière de chercheur. Éric m'a donné la chance de pousser mes connaissances scientifiques et mes compétences à leur maximum. Il a toujours été présent et disponible à nous aider et aiguiller nos différentes démarches. Que ce soit au niveau de nos connaissances générales en physiologie ou bien concernant mes lacunes jadis d'organisation et de présentation orale, Éric s'est fait un devoir pour chaque étudiant de souligner chacune de nos forces et d'améliorer chacune de nos faiblesses. J'ai la ferme conviction que chaque

étudiant(e) entrant dans le laboratoire du Dr Éric Thorin, en sort au bout de quelques années, une personne extrêmement bien formée et polyvalente d'un point de vue scientifique. Pour l'encadrement que j'ai reçu, pour ton côté humain et pour ton entregent, Éric, je te remercie sincèrement pour ces six dernières années. Mon passage dans ton laboratoire fut un réel plaisir.

Au fur et à mesure que mes études ont progressé, je réalisais à quel point une très importante place dans mes remerciements devait être réservée à Nathalie. Nous la surnommions affectueusement la « mère du labo » tant elle était attentionnée envers tous les étudiants. Mais ma perception d'elle a toutefois évolué avec le temps passant de superviseuse de stage à collègue de travail, de mentor à amie. Je ne sais pas comment se seraient déroulées ces 6 dernières années sans sa présence, son intégrité, son support, son côté humain, ses conseils, son écoute, sa sagesse, son expérience et expertise...et j'en passe ! Nathalie s'avère une fondation précieuse pour le laboratoire et nul doute que tout le monde en bénéficie, moi le premier. La complexité de mon projet m'a donné la chance de collaborer constamment avec elle durant ces dernières années et j'en suis sorti grandi. Avec le recul, je suis profondément reconnaissant de la contribution inestimable qu'elle m'a apportée sur les plans personnel, académique et professionnel. Merci infiniment Nathalie !

Nada, la doyenne estudiantine du laboratoire, la jeune femme étudiante, assistante de recherche et puis étudiante à nouveau, s'avère une source de conseils précieux. Ses connaissances en biochimie et sa patience à me faire comprendre certains rudiments de la matière ont certes fait de moi un étudiant un tantinet plus complet ! Les nombreux

cafés pris ensemble ont permis de faire en sorte que l'on devienne de proches amis. Elle est beaucoup plus qu'une simple collègue de travail. Je suis très content qu'elle ait décidé de poursuivre ses études au doctorat, selon moi, elle a un potentiel qui mérite d'être exploité. Après tout ce qu'elle a vécu, elle a toute mon admiration et mon support. N'oublie pas Nada, tu seras toujours la bienvenue une fois que j'aurai ouvert mon laboratoire...des associées de recherche comme toi, ça ne courent pas les rues !

Marie-Ève a été ma première complice au laboratoire. Nous avons entamé nos études graduées en même temps chez le Dr Thorin, alors nous avons pu développer une amitié spontanément. En plus de nos discussions scientifiques, les moments de fous rire, en congrès, en laboratoire ou à l'extérieur du contexte académique, ont été extrêmement divertissants et enrichissants, et constituent de très bons souvenirs de notre relation née à l'Institut de Cardiologie de Montréal. Bien qu'elle ait terminé ses études depuis près d'un an, je tenais à la remercier pour ces années passées à mes côtés.

Après avoir côtoyé Stéphanie au baccalauréat pendant quelques années sans trop se connaître, nous avons pu repartir à neuf lorsque nous nous sommes retrouvés dans le même laboratoire pour poursuivre nos études graduées. Forte de caractère, Stéphanie laisse sa marque dans un laboratoire ! Bien que nous n'avions pas de projets similaires, à défaut de partager des conseils techniques, nous partageons nos états d'âme ! Ceci a permis de développer graduellement une amitié qui mènera, sait-on jamais, à d'éventuelles collaborations scientifiques !

La présence d'Annick dans le laboratoire fut pour moi, un moyen de décompresser! Nos discussions du vendredi après-midi permettaient de terminer les semaines parfois fort chargées sur une note souriante ! De la petite fille déguisée en « KISS » que j'avais initiée au baccalauréat, elle a gagné en maturité et en assurance. Son intégrité et sa compréhension font de Annick une collègue de laboratoire et une amie idéale. J'ai adoré pouvoir partager ces quelques années avec toi. Bon succès dans la poursuite de tes projets futurs !

Albert a été longtemps le « jeune » du laboratoire du Dr Thorin. Entré comme stagiaire au cours de son baccalauréat, Albert a entamé récemment sa maîtrise avec le Dr Thorin. Ayant été le seul étudiant du genre masculin depuis quelques années dans le labo, Albert s'est tout de suite avéré un camarade avec qui il était agréable de discuter ! Je le remercie principalement pour sa contribution à mes travaux, mais également pour ses quelques bévues mémorables toujours plus divertissantes les unes que les autres ! Je lui passe le flambeau ! Merci et bonne continuité Albert !

Virginie est la dernière étudiante au Ph.D. entrée dans le laboratoire alors que j'étais présent. Virginie se démarque pas sa grande discrétion et son calme et, une fois apprivoisée, elle est d'une fort agréable compagnie ! En voyant la belle chimie installée entre les différents étudiants composant la relève du laboratoire du Dr Thorin, j'aurais bien entamé une année supplémentaire à leurs côtés ! Je souhaite ainsi à tous, le meilleur des succès dans vos études. Vous avez choisi un excellent laboratoire !

Bien que mes rencontres avec les Dr Louis P. Perrault et Dr Carrier furent très sporadiques, mes études n'auraient pu être effectuées sans la collaboration de ces deux chirurgiens cardiaques. Je les remercie de m'avoir fourni les spécimens essentiels à l'établissement de notre modèle expérimental.

Je voudrais également remercier sincèrement des collègues et amis qui ont contribué par leur expertise et leur conseils, à la progression de mes travaux : Maya Mamarbachi et Louis Villeneuve, spécialistes de biologie moléculaire et de microscopie confocale respectivement. Ces deux personnes s'avèrent des ressources inestimables dans une institution de recherche telle que l'Institut de Cardiologie de Montréal. Qui plus est, nos collaborations ont évolué en franches camaraderies, partageant respectivement, cafés et bières et développant une amitié que j'apprécie réellement.

Finalement mais non les moindres, j'aimerais remercier du plus profond de mon cœur, ma mère Nicole, mon père Alain ainsi que mon frère Mathieu. Leur présence inconditionnelle a fait de moi la personne que je suis devenue. Malgré tous les événements qui ont pu venir marquer mes études graduées, leur appui et encouragements m'ont aidé à progresser, à évoluer, à grandir comme personne et comme étudiant. Depuis que je suis gamin, ils n'ont cessé de me dire que l'important n'était pas de gagner le prix Nobel (comme tout bon étudiant débutant et naïf espère !), mais bien de trouver la motivation, la persévérance et le plaisir de faire ce que l'on fait. Le reste viendra simplement. Ils ont écouté toutes les histoires, anecdotes, problèmes, solutions qui caractérisaient chaque jour passé au laboratoire ou en congrès. Ainsi, ils m'ont suivi au cours de ces dernières années, tenant à participer du mieux possible à

mes accomplissements et ce, même s'ils ne comprenaient pas toujours ce que je faisais ou pourquoi et comment je le faisais. Leurs simples présences et leurs intérêts constants envers mes occupations m'ont permis d'accomplir mes études graduées avec une grande satisfaction et fierté personnelle. Pour ça et pour tout ce qu'ils ont pu m'offrir depuis plus de vingt-huit ans, je leur en serai éternellement reconnaissant. Cette thèse a été effectuée, en grande partie, grâce à votre solidarité. Merci. Je vous adore.

En terminant, je tenais également à remercier les organismes subventionnaires du Fonds de la Recherche en Santé du Québec ainsi que les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) pour leur participation financière aux projets et à leur appui au cours de mes études graduées.

1. Introduction

Cette thèse porte sur l'étude du vieillissement prématuré de l'endothélium vasculaire chez des patients athérosclérotiques. Afin de mettre les lecteurs dans le contexte, je décrirai dans cette partie les principaux sujets traités. Une revue de la littérature touchera notamment l'endothélium vasculaire, les facteurs de risque cardiovasculaire, les mécanismes de vieillissement cellulaire, les télomères et le stress oxydant. Une section fera également le parallèle avec des pathologies génétiques causant un vieillissement prématuré et une autre proposera des biomarqueurs caractérisant le vieillissement cellulaire. Par la suite, un chapitre détaillera la méthodologie utilisée dans les diverses études, suivi de la présentation de quatre manuscrits scientifiques publiés ou soumis. Finalement, une section discutera des conclusions, des forces et des limitations des différentes études ainsi qu'une présentation de perspectives futures intéressantes.

1.1. Les rôles de l'endothélium vasculaire sain

L'endothélium vasculaire ou *intima* est la monocouche de cellules la plus interne des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Jadis considéré comme étant inerte, l'endothélium est dorénavant reconnu comme étant un organe en soi, métaboliquement très actif. Sa position unique en contact direct avec le sang ainsi que ses activités signalétiques lui confèrent la possibilité de réguler à la fois le fonctionnement des parois vasculaires et des tissus environnants, mais également l'activité de cellules et de médiateurs cellulaires circulants. En effet, les fonctions métaboliques d'un

endothélium vasculaire sain sont cruciales pour le développement et le fonctionnement normal du système cardiovasculaire, de même que la circulation placentaire et lymphatique.

Bien que le taux de réplication des cellules endothéliales soit plus important au niveau des régions de l'arbre vasculaire où le flux sanguin est le plus turbulent (Schwartz and Benditt 1973), la durée de vie moyenne des cellules endothéliales varie entre 1 et 3 ans et peut diminuer à moins de 100 jours suite à une dénudation mécanique associée au vieillissement et à l'hypertension (Davies, Remuzzi et al. 1986). De plus, afin de préserver l'intégrité des vaisseaux sanguins, le corps humain a développé des mécanismes compensatoires. En effet, il existe des cellules endothéliales progénitrices circulantes (EPC) dans le sang (Asahara, Murohara et al. 1997) qui sont dérivées de la moelle osseuse. Ces EPC multipotentes contribueraient au processus de guérison afin de maintenir l'intégrité vasculaire (Dernbach, Urbich et al. 2004; Thorin-Trescases, Voghel et al. 2005; Zhang and She 2007). Ces cellules endothéliales nouvellement différenciées possèdent les mêmes caractéristiques que les cellules endothéliales natives soit les propriétés anti-thrombogéniques, anti-inflammatoires et la capacité d'inhiber la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires. Les sections suivantes décrivent ces propriétés.

1.1.1. Le tonus vasomoteur

L'endothélium vasculaire possède la capacité de réagir aux différences de pression sanguine en libérant des agents vasoactifs soit les facteurs contractants dérivés

de l'endothélium (*Endothelium-Derived Contracting Factors*, EDCF) et les facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (*Endothelium-Derived Relaxing Factors*, EDRF). Un puissant agent contractant est l'endothéline (ET), un peptide qui provoque une vasoconstriction lorsque libéré par les cellules endothéliales en activant des récepteurs spécifiques localisés sur les cellules musculaires lisses vasculaires (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988). De plus, l'ET possède des propriétés proinflammatoires qui peuvent favoriser le développement de l'hypertension (Touyz and Schiffrin 2003) ainsi que la défaillance cardiaque (Moe, Rouleau et al. 2003; Touyz and Schiffrin 2003). Deux métabolites de l'acide arachidonique produites par les cyclooxygénases (COX), la thromboxane A₂ (TXA₂) et la prostaglandine H₂, induisent également une constriction au niveau du muscle lisse vasculaire (Flavahan and Vanhoutte 1995). Finalement, l'anion superoxide (O₂^{•-}), un radical libre peut aussi provoquer une vasoconstriction dans certains lits vasculaires (Katusic and Vanhoutte 1989; Heinzl, John et al. 1992; Pou, Pou et al. 1992).

Dans des conditions physiologiques, ce sont plutôt les facteurs relaxants dérivés de l'endothélium qui prennent le dessus sur les EDCF. Le monoxyde d'azote (*nitric oxide*, NO) a été la première molécule caractérisée comme étant le principal EDRF (Fleming and Busse 1999). Le NO est un gaz soluble, synthétisé par les cellules endothéliales, les macrophages et certains neurones, qui diffuse jusqu'au niveau des cellules musculaires lisses pour activer la guanylate cyclase et augmenter ainsi les niveaux de guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Ceci provoque finalement une relaxation du muscle lisse vasculaire. Le NO est formé par les NO synthases (NOS) (Moncada, Palmer et al. 1991; Dinerman, Lowenstein et al. 1993). Trois isoformes de

la NOS ont été répertoriées : l'isoforme neuronale (NOSI, nNOS), celle inducible (NOSII, iNOS) et finalement, l'isoforme endothéliale (NOSIII, eNOS). La nNOS et la eNOS sont deux isoformes constitutivement exprimées en conditions physiologiques, c'est-à-dire que leur expression est normalement invariable dans des conditions physiologiques (Calatayud, Barrachina et al. 2001). La iNOS, quant à elle, est une isoforme induite principalement suite à un stimulus déclencheur notamment lors d'un processus inflammatoire (Schini-Kerth, Bara et al. 1994).

Une seconde molécule vasorelaxante est la prostacycline (PGI_2), un autre métabolite de l'acide arachidonique synthétisé par la prostacycline synthase au niveau des cellules endothéliales. La PGI_2 induit une vasodilatation *via* la voie de l'adénylate cyclase et de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Vane and Botting 1994; Flavahan and Vanhoutte 1995).

Finalement, un troisième agent vasorelaxant a été identifié comme étant un facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (*Endothelial-Derived Hyperpolarizing Factor, EDHF*). Bien que sa nature exacte n'ait pas été encore identifiée, des analyses fonctionnelles ont suggéré que les médiateurs provoqueraient une hyperpolarisation du muscle lisse vasculaire (Flavahan and Vanhoutte 1995). Parmi les médiateurs hyperpolarisants proposés, notons les produits du cytochrome P450 comme les acides époxyéicosatriénoïques (EET) (Li and Campbell 1997; Fisslthaler, Popp et al. 1999), les produits des lipoxygénases tels que les acides hydroxyéicosatétraénoïques (HETE) (Barlow, El-Mowafy et al. 2000; Zink, Oltman et al. 2001) et le NO (Tare, Parkington et al. 1990; Garland and McPherson 1992). Par ailleurs, selon le type de lit vasculaire

et de la concentration, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pourrait également s'avérer un candidat en tant qu'EDHF (Miura, Bosnjak et al. 2003; Hatoum, Binion et al. 2005; Larsen, Gutterman et al. 2008).

1.1.2. Les propriétés anti-thrombogéniques

L'endothélium vasculaire possède également la capacité d'empêcher la formation de thrombus. La formation de caillots sanguins, ou thrombogénèse, est le produit final de la coagulation sanguine induite par l'agrégation plaquettaire et l'activation du système de coagulation humorale. Dans des conditions physiologiques, l'endothélium vasculaire sain peut bloquer la thrombogénèse de différentes façons. Les cellules endothéliales libèrent des facteurs inhibant l'activation, l'adhésion et l'agrégation plaquettaire tel que l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire, le sulfate d'héparane, la thrombomoduline, le récepteur endothélial de la protéine réactive C (*C-reactive protein*, CRP) (Esmon 2004) et l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) (Esmon 2004; Pries and Kuebler 2006). Le monoxyde d'azote qui, en plus d'avoir des propriétés antiocoagulantes, possède la capacité d'inhiber l'expression de facteurs prothrombotiques comme le *Plasminogen Activator Inhibitor-1* (PAI-1) (Loscalzo 2001; Giannotti and Landmesser 2007). Par ailleurs, la prostacycline produite par l'endothélium est aussi reconnue pour agir de façon synergique avec le NO afin de prévenir l'activation plaquettaire (Luscher and Barton 1997). Dans des conditions physiologiques, ces propriétés anti-thrombogéniques des cellules endothéliales surpassent les effets des molécules pro-thrombogéniques, également dérivées de

l'endothélium vasculaire, comme que le facteur tissulaire et le PAI-1 (Pries and Kuebler 2006).

1.1.3. Les propriétés anti-inflammatoires

Les cellules endothéliales vasculaires s'avèrent également des médiateurs importants dans la réponse inflammatoire. En effet, lors d'une dysfonction ou d'une lésion de l'endothélium, les cellules endothéliales sécrètent différents médiateurs tels que des cytokines ou le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF). Ces molécules augmentent la perméabilité vasculaire permettant l'adhésion et l'infiltration de globules blancs (leucocytes). Cependant, dans des conditions physiologiques, les cellules endothéliales saines possèdent des propriétés anti-adhésives des globules blancs. Ces effets des cellules endothéliales semblent principalement liés au NO. En effet, le NO peut prévenir l'activité transcriptionnelle de certains facteurs tels que AP-1 et NF- κ B. Ces facteurs de transcription jouent un rôle prépondérant dans l'inflammation en favorisant l'expression de gènes dits pro-inflammatoires et pro-athérosclérotiques tels que des protéines chemoattractantes comme la *Macrophage Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) et des molécules d'adhésion comme la E-sélectine, la *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1), l'*InterCellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1), ainsi que la molécule d'adhésion cellulaire des plaquettes et des cellules endothéliales (*Platelets and Endothelial Cellular Adhesion Molecule*, PECAM, CD31) (Brandes, Fleming et al. 2005). Par exemple, il a été démontré que, dans des cellules non activées, donc en absence de stimulus inflammatoire, le stress azoté engendré par le NO favorise la liaison des facteurs NF- κ B et AP-1 à l'ADN et, ainsi,

leurs activités transcriptionnelles (Kang, Lee et al. 2000; Pawliczak, Cowan et al. 2001; Kim, Hwang et al. 2002; Mendes, Carvalho et al. 2002). Par contre, tel que mentionné précédemment, lorsque les cellules sont activées suite à des stimuli pro-inflammatoires, l'isoforme inductible de la NOS (iNOS) va produire de plus grande quantité de NO. Tandis que certaines cytokines pro-inflammatoires peuvent phosphoryler et dégrader la protéine I κ B- α , une protéine inhibitrice du NF- κ B (Lander, Sehajpal et al. 1993; Kroncke 2003), le stress azoté mène à une augmentation de sa production et une diminution de sa dégradation (DeMeester, Qiu et al. 1998; Katsuyama, Shichiri et al. 1998; Marshall, Merchant et al. 2000; Mendes, Carvalho et al. 2002). La stabilisation conséquente par le NO permet à I κ B- α de se lier au facteur NF- κ B, d'empêcher sa translocation du cytosol au noyau et, par le fait même, son activité transcriptionnelle. Parallèlement, il a été démontré que le stress azoté pouvait induire une S-nitrosylation de certains résidus des facteurs NF- κ B et AP-1 et, conséquemment, inhiber leurs liaisons à l'ADN et la transcription subséquente de gènes pro-inflammatoires (Tabuchi, Sano et al. 1994; DelaTorre, Schroeder et al. 1997; Umansky, Hehner et al. 1998; Marshall, Merchant et al. 2000; Berendji-Grun, Kolb-Bachofen et al. 2001; Garban and Bonavida 2001; Franek, Chowdary et al. 2002). Ainsi, ces propriétés du monoxyde d'azote seraient sollicitées lorsque de grandes quantités de NO sont produites par la iNOS, afin de limiter le développement de l'inflammation.

1.1.4. Les propriétés anti-prolifératives des cellules musculaires lisses

Dans un tissu vasculaire sain, les cellules endothéliales possèdent la capacité d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses. En effet, trois molécules dérivées de l'endothélium vasculaire ont été reconnues comme pouvant inhiber la mitose des cellules musculaires lisses soient le sulfate d'héparane, le facteur de croissance transformant de type β (*Transforming Growth Factor, TGF- β*) ainsi que le NO (Scott-Burden and Vanhoutte 1994). En plus de posséder des propriétés anticoagulantes, le sulfate d'héparane inhibe directement la différenciation des cellules musculaires lisses en un phénotype prolifératif (Campbell and Campbell 1986). Le sulfate d'héparane aurait des effets antiprolifératifs directement sur le muscle lisse vasculaire et indirectement en activant le TGF- β . Cette molécule, impliquée dans le remodelage vasculaire et synthétisée par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, possèdent toutefois des effets pléiotropes (Dzau and Gibbons 1991). Par exemple, certaines études ont montré que le TGF- β pouvaient favoriser la prolifération des cellules musculaires lisses dans des rats hypertendus spontanément (*Spontaneous Hypertensive Rats, SHR*), mais également inhiber la division de ces mêmes cellules dans des rats normaux, non-hypertendus (Stouffer and Owens 1992; Agrotis, Saltis et al. 1995). Il a été suggéré que les effets bifonctionnelles de cette cytokine sur la prolifération cellulaire pourraient être dus aux différents sous-types de récepteurs au TGF- β activés (Goodman and Majack 1989; Agrotis, Samuel et al. 1996; Khanna 2004) ou bien à la concentration de TGF- β , une inhibition de la prolifération de cellules musculaires lisses ayant été observée à faibles concentrations tandis que de

plus fortes concentrations induisent une hyperprolifération des mêmes cellules (Khanna 2004; Bobik 2006). Cette molécule impliquée dans le remodelage vasculaire est également synthétisée par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Finalement, le NO s'avère également un puissant inhibeur du cycle cellulaire au niveau des cellules musculaires lisses. Son effet est associé à un arrêt de ces cellules en phase G₀/G₁ du cycle cellulaire, conséquence d'une diminution de l'expression de certaines cyclines, molécules impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Zuckerbraun, Stoyanovsky et al. 2007). L'endothélium vasculaire sain, en libérant diverses substances, contribuerait ainsi au maintien de l'équilibre prolifératif des cellules musculaires lisses.

1.1.5. Les cellules endothéliales progénitrices

En 1997, le groupe de Asahara *et al.* a isolé des cellules endothéliales progénitrices circulantes (EPC) dérivées de la moelle osseuse (Figure 1) (Asahara, Murohara et al. 1997). Bien que les EPCs soient des sous-types de cellules souches partageant des propriétés communes aux cellules hématopoïétiques telles que l'expansion clonale, la capacité de se transformer en différents types cellulaires, ainsi qu'une certaine résistance face aux radicaux libres (Dernbach, Urbich et al. 2004), les EPCs se distinguent de ces dernières principalement au cours de leurs différenciations. En effet, les EPCs et les cellules hématopoïétiques présentent des marqueurs antigéniques similaires (AC133, CD34, VEGFR-2) les rendant difficilement dissociables à un stade précoce de maturation (Urbich and Dimmeler 2004; Smadja, Cornet et al. 2007). Toutefois, tandis que les cellules hématopoïétiques se

différencieront en cellules sanguines (érythrocytes, granulocyte, monocytes, lymphocytes) (Luc, Buza-Vidas et al. 2008), les EPC présentes dans la circulation sanguine pourront elles, se différencier en cellules endothéliales matures bien entendu, mais également en fibroblastes, cellules musculaires lisses vasculaires ou cardiomyocytes (Condorelli, Borello et al. 2001; Murasawa, Kawamoto et al. 2005; Zhang and She 2007). Combinées, les études suggèrent diverses sous-populations d'EPC présentes dans la circulation sanguine possédant différentes activités dans l'angiogénèse et la réparation endothéliale. Ces sous-populations reflètent probablement divers stades de développement des EPCs durant leur processus de maturation, partant des cellules hémangioblastes de la moelle osseuse à des cellules endothéliales vasculaires pleinement différenciées (Figure 1), ce qui pourrait expliquer leurs différences fonctionnelles (Zhang and She 2007).

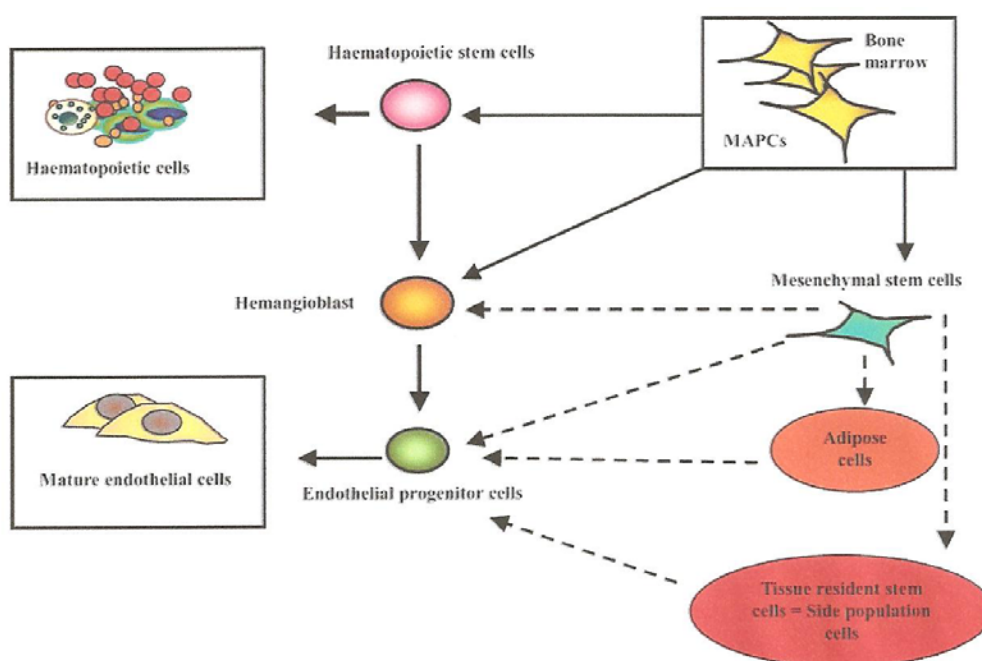


Figure 1: Origine et différenciation des cellules endothéliales progénitrices.
(Selon Smadja *et al.* 2007)

Ces cellules matures sécrètent des facteurs angiogéniques tels que le VEGF, le NO, le facteur de croissance de l'insuline 1 (*Insulin Growth Factor*, IGF-1) ainsi que le facteur stimulant de colonies de granulocytes et de macrophages (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*, GM-CSF) leur conférant un rôle dans les processus de réparation tissulaire (Hur, Yoon et al. 2004; Thorin-Trescases, Voghel et al. 2005). Les mécanismes par lesquels les EPCs participent aux processus de guérison demeurent nébuleux. Toutefois, il semblerait que ce soit *via* la sécrétion de substances telles que l'IGF-1, le NO et le VEGF, molécules qui modifieraient l'environnement cellulaire du tissu lésé et favoriseraient, par exemple, l'angiogénèse et la ré-endothélialisation (Murasawa and Asahara 2005; Murasawa, Kawamoto et al. 2005; Xia, Xie et al. 2006).

En résumé, les cellules endothéliales vasculaires saines sont essentielles en inhibant l'inflammation, la coagulation, l'hyperprolifération des cellules musculaires lisses vasculaires ainsi qu'en régulant le tonus vasomoteur. Ainsi, les propriétés protectrices de l'endothélium font qu'il préserve les fonctions physiologiques de la paroi vasculaire. Son importance est telle qu'une dysfonction ou une dégénérescence de l'endothélium mène systématiquement à des problèmes vasculaires. Toutefois, l'organisme a développé des mécanismes compensatoires, les EPCs, qui s'avèrent une sorte de « roue de secours » face à un endothélium lésé. Une dysfonction de l'endothélium vasculaire pourrait être le lien expliquant les complications physiopathologiques vasculaires normalement associées au vieillissement.

1.2. Le vieillissement

Le vieillissement est défini comme des changements dans un système qui surviennent en association avec le cours normal du temps (Yates 1955). Comme le vin, ces changements peuvent être jugés bons, mauvais ou neutres mais le vieillissement est neutre en soit : ce n'est pas une maladie. Personne ne meurt du vieillissement, mais plutôt des complications physiopathologiques qui peuvent lui être associées. Des études biologiques, épidémiologiques et démographiques ont généré plusieurs théories susceptibles d'expliquer le processus du vieillissement. Cependant, ces dernières années, la recherche d'un simple et unique mécanisme du vieillissement biologique, comme un seul gène, a été remplacée par un complexe processus multifactoriel associé à plusieurs changements physiologiques, cellulaires, génétiques et moléculaires (Kowald and Kirkwood 1996; Franceschi, Valensin et al. 2000).

1.2.1. Théorie des ROS (Harman 1956)

Une théorie du vieillissement semble s'établir comme une référence: celle du vieillissement par les radicaux libres (*The Free Radical Theory of Aging*) (Harman 1956; Harman 1993; Muller, Lustgarten et al. 2007). Harman se basa sur les travaux de Gerschman (Gerschman, Gilbert et al. 1954) portant sur la toxicité des substances radicalaires oxygénées libres. Il postula que ces molécules réactives, notamment les radicaux hydroxyl (OH^{\bullet}) et l'hydroperoxyl (HO_2^{\bullet}), sont formées à l'intérieur des cellules à partir des processus oxydatifs normaux du métabolisme cellulaire et participent au développement du vieillissement (Harman 1956). Depuis, plusieurs études ont appuyé et raffiné son hypothèse, la modifiant légèrement pour inclure plus

globalement toutes les substances réactives oxygénées (*Reactive Oxygen Species*, ROS) telles que les peroxydes et les aldéhydes. Ces molécules peuvent également jouer un rôle dans les dommages cellulaires oxydants (Sohal and Weindruch 1996; Beckman and Ames 1998). Cette nuance apportée provient de l'existence d'un environnement pro-oxydant dans des conditions physiologiques dû à un déséquilibre dans les molécules pro-oxydantes et antioxydantes. Ce déséquilibre, ou stress oxydant, sera discuté ultérieurement. Comme les ROS provoquent des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides cellulaires, ce déséquilibre favorisera ultimement une accumulation, avec l'âge, de dommages oxydants touchant diverses macromolécules menant ainsi à une diminution progressive des fonctions cellulaires. Cette cascade d'événements expliquerait les pathologies associées au vieillissement. Conséquemment, tout facteur externe aggravant ce déséquilibre oxydant au niveau de l'endothélium vasculaire par exemple, pourrait accélérer son dysfonctionnement.

1.2.2. La dysfonction endothéliale en conditions pro-athérogéniques : vieillissement accéléré?

En Amérique du Nord, les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de décès (Vanepps and Vorp 2007). Au niveau vasculaire, le vieillissement est associé à plusieurs altérations de la fonction des cellules endothéliales et musculaires lisses (Marin 1995; Minamino and Komuro 2002). Parmi celles-ci, on retrouve une augmentation de la réponse inflammatoire ainsi qu'une diminution des propriétés anti-thrombogéniques de l'endothélium et de la capacité à réguler le tonus myogénique (Figure 2). La vasodilatation dépendante de l'endothélium est diminuée avec l'âge principalement par une réduction de la production de NO et de PGI₂, ainsi que de la

sensibilité des cellules musculaires lisses à répondre à ces agents. De plus, les artères vieillissantes présentent une augmentation de l'expression de molécules pro-inflammatoires et pro-athérogéniques comme l'interleukine-6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumorale alpha (*Tumor Necrosis Factor*, $TNF\alpha$) (Minamino and Komuro 2002). Tous ces changements fonctionnels surviennent principalement à cause du vieillissement même des cellules. En effet, plusieurs groupes ont rapporté que la dysfonction cellulaire observée dans les vaisseaux sanguins était causée par l'apparition d'un phénotype de sénescence tant au niveau des cellules musculaires lisses qu'endothéliales (Kumazaki, Kobayashi et al. 1993; Bennett, Macdonald et al. 1998). Par ailleurs, des études histologiques des plaques athérosclérotiques révélèrent que ces deux types cellulaires présentaient une morphologie atypique et certains

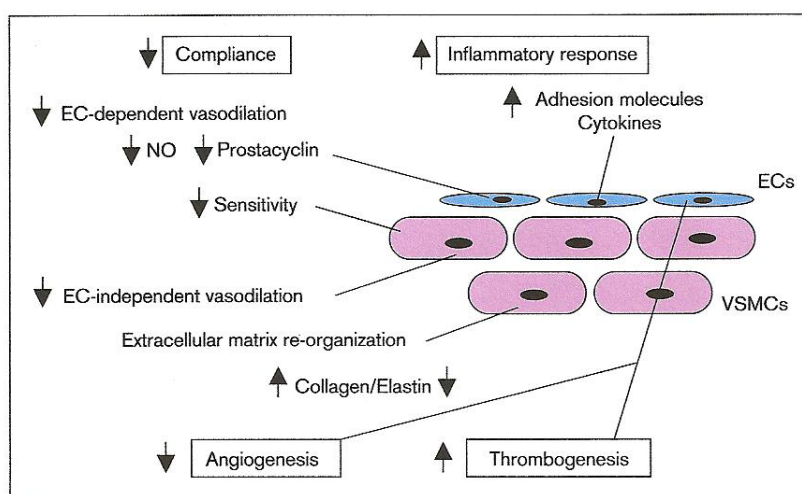


Figure 2: Changements fonctionnels au niveau de la paroi vasculaire associés au vieillissement (Selon Minamino *et al.* 2002)

marqueurs de sénescence, particulièrement dans les régions où le flux sanguin est turbulent, mais qu'aucune cellule sénescence n'était trouvée dans les sections sans

lésions athérosclérotiques (Ross, Wight et al. 1984; Burring 1991; Minamino, Miyauchi et al. 2002). La dysfonction des cellules vasculaires sénescents corrèle donc avec plusieurs complications physiopathologiques telle que l'athérosclérose. Les données émergentes qualifient de plus en plus cette maladie comme étant causée par un vieillissement accéléré de l'endothélium vasculaire.

1.2.3. L'athérosclérose

L'athérosclérose est la cause de près de 50% des décès dans les pays occidentaux. Le développement de l'athérosclérose conduit à une obstruction de la lumière artérielle et une diminution de l'apport sanguin aux tissus, les rendant ainsi enclins à des dommages ischémiques irréversibles et néfastes (Hegele 1996).

En 1993, Russell Ross a proposé la théorie de la « *response-to-injury* » qui suggère que le développement de l'athérosclérose survient en réponse à des dommages au niveau des artères causés par un stimulus déclencheur anormalement prolongé ou par une absence de résistance à ce stimulus (Ross 1993). (Ross 1993) Par exemple, l'exposition à plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire tels que la cigarette, le diabète, et l'hypertension mène à une inflammation chronique qui intervient dans l'initiation, la progression et les complications associées à l'athérosclérose (Glass and Witztum 2001; Libby and Aikawa 2002). Ce processus inflammatoire chronique fait intervenir plusieurs types cellulaires, notamment les monocytes et les leucocytes circulants. Normalement, l'endothélium vasculaire sain empêche l'adhésion des leucocytes. Toutefois, l'endothélium vasculaire exposé à plusieurs facteurs comme la

fumée de cigarette, des toxines et virus et des stress physiques et chimiques, devient dysfonctionnel et perd ses propriétés anti-thrombotiques. Des stimuli pro-inflammatoires tels que une diète riche en gras saturés et autres facteurs de risque cardiovasculaire, provoquent l'expression de molécules d'adhésion comme la P-sélectine, VCAM-1 et MCP-1 par la paroi vasculaire, ce qui favorise la migration et l'adhésion des monocytes et lymphocytes à l'endothélium (Cybulsky and Gimbrone 1991; Li, Cybulsky et al. 1993; Gu, Okada et al. 1998) (Figure 3).

Les lésions athérosclérotiques se forment habituellement au niveau de bifurcations artérielles, où le flux sanguin est plus turbulent, ce qui réduit les propriétés anti-thrombogéniques et vasorelaxantes de certaines molécules dérivées de l'endothélium telles que le monoxyde d'azote (Jongstra-Bilen, Haidari et al. 2006). Ensuite, les monocytes interagissant avec les cellules endothéliales produisent des

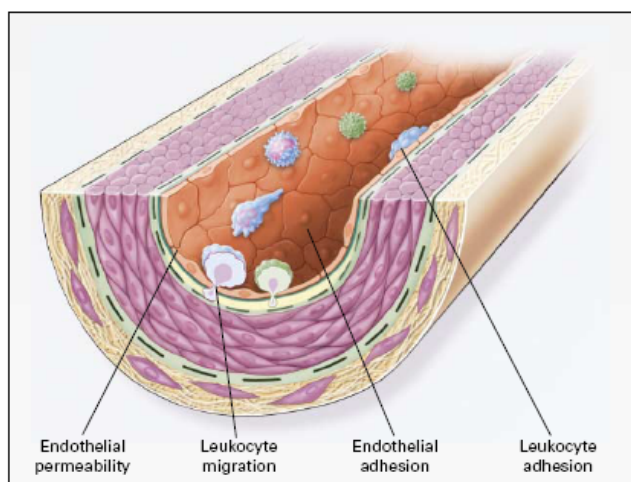


Figure 3 : Dysfonction endothéliale dans l'athérogénèse (Selon Ross *et al.* 2003)

métalloprotéinases de la matrice (MMP-9) qui permettent la dégradation matricielle et, conséquemment, l'infiltration des leucocytes dans l'espace sous-endothélial (Amorino

and Hoover 1998). À l'intérieur de l'intima, les monocytes se transforment en macrophages sous l'influence de la molécule M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*), un facteur surexprimé au niveau de l'intima affectée par l'inflammation (Rajavashisth, Andalibi et al. 1990).

Les premiers changements observables par microscopie au niveau des zones susceptibles de développer l'athérosclérose sont une épaissement de l'intima et une accumulation dans l'espace intimal d'apolipoprotéines B (apoB), une lipoprotéine à faible densité (*Low Density Lipoproteins*, LDL) (Feldman, Hoff et al. 1984). Au niveau des plaques d'athérome, les oxLDL sont internalisés par différents types cellulaires possédant des récepteurs appropriés. Parmi ceux-ci, on retrouve le récepteur LOX-1 (*Lectin-like oxidized LDL receptor-1*) au niveau des cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires ainsi que sur les macrophages. Ces dernières cellules expriment également les récepteurs chélateurs (*Scavenger Receptors*, SR-A) en réponse au M-CSF (Chen, Masaki et al. 2002). Ainsi, la présence de tels récepteurs sur les macrophages présents au niveau des zones susceptibles de développer l'athérosclérose permettra l'internalisation des oxLDL et formeront ainsi des cellules spumeuses (*foam-cell*), caractéristiques des plaques athérosclérotiques (Gerrity 1981; Steinberg, Parthasarathy et al. 1989). Parallèlement, en réponse à la présence d'oxLDL, le système immunitaire acquis s'active, menant à la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-18 (IL-18), l'interféron- γ (IFN- γ) et le ligand CD40 (CD40L), molécules qui exacerbent le processus inflammatoire et contribuent à la progression des plaques athérosclérotiques (Stemme, Faber et al. 1995; Packard and

Libby 2008). En effet, ceci pousse les leucocytes et les plaquettes à s'agréger avec les cellules spumeuses pour produire des dépôts lipidiques, première étape du développement athérosclérotique observable à l'œil nu (Figure 4). Plus les cellules spumeuses s'accumulent, plus l'épaisseur de l'intima augmente.

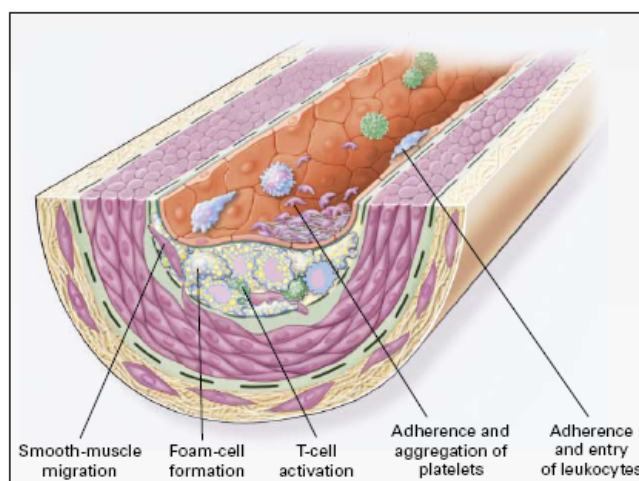


Figure 4: Formation des dépôts lipidiques dans l'athérosclérose (Selon Ross *et al.* 2003)

En réponse au PDGF sécrété par les cellules endothéliales et macrophages activés, les cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire migrent vers l'intima, au niveau des dépôts lipidiques. À ce stade, les cellules musculaires lisses prolifèrent sous l'influence de plusieurs facteurs de croissance comme le TGF- β et PDGF, et sécrètent du collagène et des métalloprotéinases de la matrice, favorisant ainsi l'évolution d'une lésion riche en lipides à une capsule fibreuse (Figure 5) (Mason, Kenagy *et al.* 1999; Packard and Libby 2008); (Ross 1993) La réponse inflammatoire augmente la taille de cette lésion intermédiaire. Au fur et à mesure que la capsule fibreuse croît, les cellules composant le cœur de la lésion meurent par nécrose, une mort pathologique (Bocan, Schifani *et al.* 1986). Ainsi, la réponse inflammatoire s'accroît, accumule des dépôts de cristaux de cholestérol et de calcium, et la capsule devient alors une plaque fibreuse

ou plaque d'athérome (Ross 1993). Elle se solidifie graduellement et peut alors provoquer des effets hémodynamiques, pouvant bloquer la lumière vasculaire et empêcher le sang de circuler librement (Figure 5).

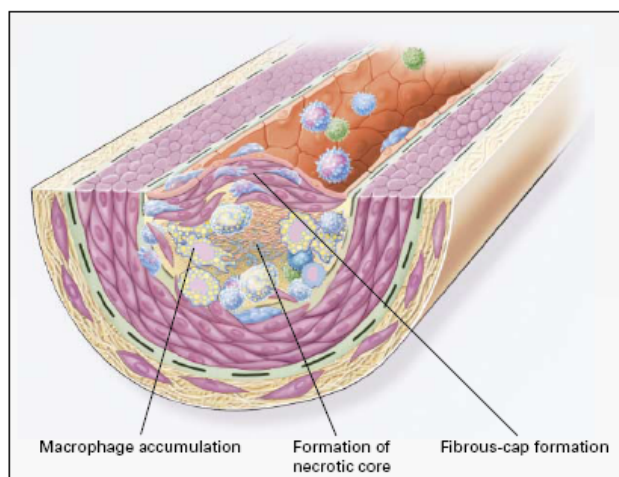


Figure 5: Formation d'une plaque athérosclérotique avancée (Selon Ross *et al.* 2003)

Dans les plaques fibreuses avancées, l'endothélium peut fissurer et engendrer une hémorragie à l'intérieur même de la plaque. Ces hémorragies locales provoquent la libération de thrombine, une molécule impliquée dans la cascade de coagulation, convertissant le fibrinogène en sa forme active, la fibrine. Par ailleurs, la thrombine peut également activer les cellules endothéliales, les monocytes/macrophages, les cellules musculaires lisses et les plaquettes sanguines (Croce and Libby 2007). Ces cellules répondent à la thrombine en produisant une panoplie de médiateurs inflammatoires incluant CD40L et RANTES (*Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*) (Libby and Simon 2001). Ces molécules accentuent la réponse inflammatoire en activant les lymphocytes T, ce qui favorise la progression de la plaque d'athérome et des complications thrombotiques subséquentes, démontrant

ainsi la synergie reliant l'inflammation et la thrombose dans l'athérogénèse (Libby and Simon 2001). En effet, l'inflammation accentuée interfère avec l'intégrité et la stabilité de la plaque fibreuse en stimulant la destruction des fibres de collagène existantes et en empêchant la synthèse de nouvelles fibres. Par exemple, l'IFN- γ sécrété par les lymphocytes T activés inhibe la production de collagène par les cellules musculaires lisses (Sukhova, Schonbeck et al. 1999). Parallèlement, le CD40L et l'interleukine-1 (IL-1) produits par ces mêmes lymphocytes T activés, poussent les macrophages à relâcher des collagénases interstitielles (MMP-1, MMP-8, MMP-13) (Sukhova, Schonbeck et al. 1999). Ainsi, ces facteurs peuvent mener à une rupture de la plaque et des complications subséquentes. Cette rupture de plaque est considérée comme étant l'évènement clé qui provoque l'ischémie tissulaire, premier point de non-retour qui peut évoluer sur plusieurs années et engendrer diverses complications cliniques, voire même le décès de l'individu atteint.

1.2.4. Les facteurs de risque cardiovasculaire

1.2.4.1. La dyslipidémie

La dyslipidémie constitue un déséquilibre dans les concentrations de cholestérol et de triglycérides sanguins, engendrant une hypercholestérolémie et/ou hypertriglycéridémie. En effet, la dyslipidémie est caractérisée par une augmentation des taux sanguins de triglycérides et de LDL ainsi qu'une diminution du « bon cholestérol », soient les lipoprotéines de haute densité (*High Density Lipoprotein*, HDL) (Goldberg 2001). Les niveaux élevés de triglycérides peuvent mener à l'activation du facteur de transcription pro-inflammatoire NF- κ B relié à l'athérogénèse.

Par ailleurs, les taux élevés de LDL les rendent plus susceptibles à l'oxydation et à la glycation, deux processus qui les transforment en molécules hautement réactives et athérogéniques (Griendling and Alexander 1997; Govindarajan, Whaley-Connell et al. 2005).

La dyslipidémie constitue donc un facteur de risque cardiovasculaire car elle favorise la dysfonction vasculaire, une augmentation de la prolifération des cellules musculaires lisses, de la rigidité artérielle et du tonus vasculaire, en plus de diminuer la vasodilatation dépendante de l'endothélium (Govindarajan, Whaley-Connell et al. 2005). Cet environnement vasculaire favorise donc le développement de plaques athérosclérotiques. De plus, plusieurs groupes ont révélé que les niveaux sanguins de cholestérol étaient directement associés à l'incidence des maladies coronariennes. Ils révélaient qu'une réduction du cholestérol sanguin chez des patients coronariens diminuait les risques d'infarctus du myocarde et que cet effet bénéfique était associé à une amélioration de la fonction endothéliale, notamment par la libération de NO par l'endothélium (Gilligan, Guetta et al. 1994; Casino, Kilcoyne et al. 1995; Hadi, Carr et al. 2005).

1.2.4.2. Le tabagisme

En plus de son effet marqué au niveau pulmonaire, plusieurs études épidémiologiques ont démontré que le tabagisme augmente également l'incidence d'infarctus du myocarde et de maladies coronariennes (Price, Mowbray et al. 1999; Ambrose and Barua 2004). En effet, la fumée de cigarette contient des substances cancérigènes, mutagènes et pro-oxydantes qui consolident le lien existant entre le

tabagisme et le cancer ainsi que certaines maladies cardiovasculaires. Plusieurs études ont démontré, tant dans des modèles animaux que des sujets humains, que l'exposition à la fumée primaire (fumée inhalée directement) ou secondaire (fumée libérée dans l'environnement) diminuait la fonction vasorelaxante de l'endothélium vasculaire (Barua, Ambrose et al. 2001; Barua, Ambrose et al. 2003; RG, de Jongh et al. 2003). Cet effet serait principalement causé par une augmentation des niveaux de ROS associée à une diminution de la biodisponibilité du NO (Barua, Ambrose et al. 2001; Barua, Ambrose et al. 2003). Par ailleurs, d'autres groupes ont même caractérisé la sévérité du tabagisme en observant que la fumée secondaire ($\pm 1/100$ de l'exposition à la fumée primaire) est associée à une augmentation de 30% de risque de maladies coronariennes comparativement à 80% chez les fumeurs actifs (Glantz and Parmley 1991; Law, Morris et al. 1997).

Le rôle déterminant du tabagisme dans les maladies cardiovasculaires est lié à sa cytotoxicité au niveau de l'endothélium vasculaire menant à sa dysfonction et au développement de l'athérosclérose (Celermajer, Adams et al. 1996; Ambrose and Barua 2004). Cette cytotoxicité peut être expliquée par le fait que de tous les facteurs de risque cardiovasculaire, le tabagisme s'avère celui qui produit le plus de radicaux libres (Nicita-Mauro, Lo Balbo et al. 2008). Des marqueurs de dommages dus aux radicaux libres ont été observés dans le sérum, l'urine (Chen, Wu et al. 2004), le plasma (Sharma, Dwivedi et al. 2005; Nicita-Mauro, Lo Balbo et al. 2008) et les tissus pulmonaires de fumeurs (Asami, Manabe et al. 1997; Chen, Wu et al. 2004; Sharma, Dwivedi et al. 2005; Nicita-Mauro, Lo Balbo et al. 2008). Par ailleurs, il a également été démontré que la cessation du tabagisme (Moreno, Chalon et al. 1998; Kondo,

Hayashi et al. 2004) et un traitement avec un antioxydant rétablissent la fonction endothéliale chez les fumeurs, confirmant un rôle néfaste des espèces réactives oxygénées (Heitzer, Just et al. 1996; Moreno, Chalon et al. 1998; Kondo, Hayashi et al. 2004). De plus, la fumée de cigarette provoque une augmentation de 20% à 25% du nombre de leucocytes circulants corrélant avec de plus hauts niveaux sanguins de marqueurs inflammatoires tels que le CRP, l'IL-6 et le TNF α (Mendall, Patel et al. 1997; Smith and Fischer 2001; Bermudez, Rifai et al. 2002).

Finalement, un autre groupe a observé que, par rapport aux non-fumeurs, les fumeurs avaient de plus faibles niveaux sanguins de HDL associés à des niveaux sanguins plus élevés de triglycérides et de LDL (Craig, Palomaki et al. 1989). Étant donné l'augmentation des niveaux de ROS associée au tabagisme, les fumeurs voient leur taux de LDL oxydées augmenter significativement par rapport aux non-fumeurs (Heitzer, Yla-Herttuala et al. 1996; Ambrose and Barua 2004). Ainsi, considérant les différentes conséquences cardiovasculaires de la fumée de cigarette, tant primaire que secondaire, il est peu surprenant de constater que le tabagisme prédispose les fumeurs à plusieurs syndromes cliniques associés à l'athérosclérose tels que l'angine de poitrine, l'anévrisme, le syndrome coronarien aigu, la mort subite et l'infarctus du myocarde.

1.2.4.3. Le diabète

Le diabète, qu'il soit insulino-dépendant (type 1) ou non insulino-dépendant (type 2), constitue aussi un facteur de risque cardiovasculaire. En effet, l'incapacité de contrôler les niveaux de glycémie chez ces individus s'avère une problématique au

niveau, entre autres, du tissu vasculaire. Une hyperglycémie est associée à une formation de produits de glycation avancés (*Advanced Glycation End products*, AGE) qui provoquent des changements de l'environnement rédox favorisant une augmentation des niveaux de ROS (Calles-Escandon and Cipolla 2001). Ceci a pour conséquences néfastes plusieurs réactions. Premièrement, cet environnement oxydant aura comme effet de diminuer la biodisponibilité du NO et donc, de la vasodilatation dépendante de l'endothélium. Ensuite, les substances réactives oxygénées provoqueront l'oxydation et la glycation de protéines, phospholipides cellulaires et autres macromolécules.

Tel que mentionné ci-dessus, ces réactions favorisent fortement le développement de plaques athérosclérotiques. De plus, les AGEs augmentent la perméabilité vasculaire (Svensjo, Cyrino et al. 1999), favorisent la production d'endothéline (Quehenberger, Bierhaus et al. 2000) ainsi que divers facteurs de croissance promouvant la prolifération à la fois des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses vasculaires (Svensjo, Cyrino et al. 1999; Quehenberger, Bierhaus et al. 2000; Hadi, Carr et al. 2005). Cette prolifération cellulaire mènerait à une néovascularisation caractéristique de l'hyperglycémie. Finalement, comme les triglycérides, les AGEs ont la capacité d'induire une réponse inflammatoire en activant le facteur de transcription NF- κ B (Kunt, Forst et al. 1998; Bierhaus, Schiekofer et al. 2001; Rojas and Morales 2004).

1.2.4.4. L'hypertension

L'hypertension artérielle, qu'elle soit essentielle, causée par une hypersensibilité au sel (NaCl) ou bien par un hyperaldostéronisme, est caractérisée par une augmentation significative et soutenue de la pression artérielle. Dans des conditions pathologiques, plusieurs molécules telles que l'angiotensine II (AngII), l'ET-1, la vasopressine et les ROS peuvent favoriser une augmentation incontrôlée de la pression artérielle (de Champlain, Wu et al. 2004). L'hypertension constitue un facteur de risque cardiovasculaire principalement par la dysfonction endothéliale qui la caractérise et qui est causée majoritairement par des niveaux anormalement élevés de radicaux libres. En effet, plusieurs études ont démontré une diminution de la vasodilatation dépendante ou non de l'endothélium ainsi qu'une augmentation du tonus vasomoteur (Taddei, Virdis et al. 2000). L'élasticité ainsi que le tonus myogénique des vaisseaux sanguins des personnes hypertendus sont donc réduite, ce qui favorisent le développement d'accidents vasculo-cérébral et cardiaque. Dans l'hypertension, les ROS sont principalement produits par une augmentation de l'activité de la voie mitogénique des MAP kinase et de celle de la NADPH oxydase, la principale source de radicaux libres dans l'endothélium vasculaire (Rajagopalan, Kurz et al. 1996; de Champlain, Wu et al. 2004). Tel que décrit précédemment, les radicaux libres, par oxydation, peuvent altérer la structure et la fonction de plusieurs autres molécules telles que les phospholipides membranaires et les LDL, en plus de diminuer la biodisponibilité du NO, favorisant ainsi un environnement pro-inflammatoire et pro-athérogénique. Parallèlement, l'AngII peut favoriser le développement d'une réponse inflammatoire indépendamment de son effet vasocontractant, en se liant à son récepteur AT₁ au niveau, entre autres, des cellules endothéliales, musculaires lisses et

les leucocytes (Pueyo, Gonzalez et al. 2000; Ruiz-Ortega, Lorenzo et al. 2000; Dzau 2001). Ainsi, l'AngII provoque d'une part, l'aggrégation plaquettaire, qui mène alors à la production d'histamine, de thromboxane A₂ et de sérotonine (Dandona, Ghanim et al. 2007). D'autre part, cette liaison à AT₁ active la NADPH oxydase, ce qui augmente la production d'espèces réactives oxygénées (ROS) (Griendling, Minieri et al. 1994; Zhang, Schmeisser et al. 1999). Cette augmentation des niveaux de ROS mène à la fois à une activation du facteur de transcription pro-inflammatoire AP-1, mais également à une phosphorylation et une dégradation subséquente de la protéine IκB, une molécule inhibitrice du facteur de transcription NF-κB (Baldwin 1996; Barnes and Karin 1997; Zahradka, Werner et al. 2002). Tel que décrit précédemment, ces facteurs mènent à la transcription de molécules pro-inflammatoires comme TNFα, VCAM-1, ICAM-1, IL-6, MCP-1, MMP et PAI-1 pour n'en nommer que quelques-uns (Dandona, Ghanim et al. 2007).

1.2.4.5. L'obésité

Les causes de l'effet néfaste de l'obésité au niveau vasculaire demeurent nébuleuses car ce facteur de risque cardiovasculaire est l'une des composantes du syndrome métabolique caractérisé par le diabète, la dyslipidémie et l'hypertension. Or, ces pathologies partagent toutes plusieurs propriétés pro-athérogéniques dont une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium due à une réduction de la biodisponibilité du NO. Il a été proposé que les adipokines, des hormones sécrétées en grande partie par les adipocytes d'individus obèses, pourraient être responsables de ces effets (Mark and Sivitz 2002; Kougias, Chai et al. 2005). L'obésité est caractérisée par

une expansion du stockage de triglycérides dans des tissus non-adipeux et associée à une augmentation des niveaux de ROS (Meyers and Gokce 2007). Les effets de l'obésité sur la pathogenèse des maladies cardiovasculaires sont peu compris. Par contre, les effets pléiotropes de l'obésité peuvent être également associés aux autres facteurs de risque cardiovasculaire tels que le diabète, la dyslipidémie et l'hypertension, normalement associés au syndrome métabolique.

1.2.4.6. L'âge

En Occident, 80% des décès associés aux maladies cardiovasculaires surviennent chez les personnes âgées de 65 ans et plus (Lakatta 2002). Ainsi, l'âge *per se*, est le principal facteur de risque cardiovasculaire. Cependant, l'impact du vieillissement vient de l'interaction des changements physiologiques et les complications pathologiques qui lui sont associées. Au niveau cardiaque, le vieillissement est caractérisé par un épaissement de la paroi du ventricule gauche dû à une hypertrophie des cardiomyocytes (Gerstenblith, Frederiksen et al. 1977; Olivetti, Melissari et al. 1991). Parallèlement, une diminution de la sensibilité β -adrénergique ainsi qu'une réduction du nombre de cardiomyocytes fonctionnels sont observées avec l'âge avancé, ce qui causerait l'altération de la fonction contractile du coeur (Anversa, Palackal et al. 1990; Lakatta 1993). De plus, en réponse à l'augmentation des contraintes mécaniques engendrée par la rigidité artérielle associée au vieillissement, les cardiomyocytes restants synthétisent des molécules telles que le facteur natriurétique auriculaire (Younes, Boluyt et al. 1995), des opioïdes (Boluyt, Younes et al. 1993) et ainsi que l'Ang II (Cigola, Kajstura et al. 1997), toutes des molécules normalement

produites en situations de stress. Au niveau vasculaire, le vieillissement en soi est associé à une hyperprolifération des cellules musculaires lisses, à une dysfonction des cellules endothéliales et à un épaississement de la paroi artérielle (Lakatta 2002). La principale conséquence engendrée est une rigidité vasculaire qui, de concert avec les changements cardiaques, seraient responsables des complications cardiovasculaires telles que l'hypertension, l'insuffisance cardiaque et l'athérosclérose. L'incidence de ces pathologies avec l'âge serait donc accentuée en présence d'autres facteurs de risque.

1.2.4.7. La sédentarité ou l'absence d'effets bénéfiques

La sédentarité est définie physiologiquement comme étant l'absence d'activité physique. Elle constitue un facteur de risque cardiovasculaire spécialement lorsqu'elle est jumelée avec le vieillissement. En effet, elle permet l'accumulation des effets néfastes notamment associés avec l'hypertension, l'hypercholestérolémie, le tabagisme, l'obésité et le diabète. L'activité physique, l'antithèse de la sédentarité, s'avère un moyen de contrecarrer ces effets délétères et d'améliorer la fonction cardiovasculaire. Globalement, l'exercice aérobique permet d'augmenter le volume ventriculaire (hypertrophie physiologique), la fraction d'éjection, la concentration sanguine d'érythrocytes et d'hémoglobine en plus de diminuer la fréquence cardiaque au repos et la pression sanguine (Sasaki and dos Santos 2006).

Plusieurs études ont démontré qu'une activité physique modérée (50% VO_{2Max}) et régulière améliorerait significativement la fonction endothéliale affectée par les autres facteurs de risque cardiovasculaire et que l'activité physique diminuait de moitié la

mortalité en rallongeant de dix le nombre d'années en santé (Mozaffarian, Furberg et al. 2008). Par exemple, la vasodilatation dépendante de l'endothélium est préservée chez les personnes entraînées par rapport à celles sédentaires mais en santé (DeSouza, Shapiro et al. 2000; Galetta, Franzoni et al. 2006). De plus, un autre groupe a montré que cette vasodilatation est améliorée chez les patients ayant subi un infarctus du myocarde mais faisant de l'activité physique (Vona, Rossi et al. 2004). Les profils lipidiques sont également améliorés lors d'une réponse hyperhémique chez les personnes faisant de l'exercice physique en comparaison avec les personnes sédentaires (Rinder, Spina et al. 2000; Roberts, Vaziri et al. 2002; Kelley and Kelley 2006). Ces effets bénéfiques de l'activité physique sont accentués lorsque l'exercice aérobique est combiné avec une diète stricte, faible en gras saturés et en gras *trans*, riche en fruits, légumes, poissons et grains entiers (Lalonde, Gray-Donald et al. 2002). Finalement, l'activité physique aurait également des effets bénéfiques sur l'inflammation associée avec d'autres facteurs de risque cardiovasculaire. En effet, comparativement aux individus sédentaires, les sujets qui s'entraînent présentent une réduction des niveaux sanguins de la molécule prothrombotique PAI-1 et une augmentation de ceux de tPA, favorisant l'efficacité de la fibrinolyse (Killewich, Macko et al. 2004).

Ainsi, la sédentarité, par l'absence des effets bénéfiques associés à l'activité physique, constitue un facteur de risque cardiovasculaire en soi, par l'accumulation des effets délétères associés aux autres facteurs de risque conventionnels.

1.2.5. Les cellules endothéliales progénitrices et les maladies cardiovasculaires

Nous avons mentionné précédemment que les cellules endothéliales progénitrices (EPCs) pouvaient s'avérer bénéfiques dans la néovascularisation et la réparation du tissu vasculaire. Cependant, certaines études ont montré également un lien existant entre les EPCs et des complications cardiovasculaires (Vasa, Fichtlscherer et al. 2001; Werner and Nickenig 2006). En effet, les niveaux d'EPCs circulantes s'avèrent être un marqueur prédictif du pronostic de syndromes coronariens aigus. Le groupe de Werner *et al.* a montré que les patients ayant un faible taux sanguin d'EPCs ainsi qu'une dysfonction des cellules endothéliales vasculaires matures présentent une incidence plus élevée pour des maladies cardiovasculaires lorsqu'on les compare à des patients possédant des taux plus élevés d'EPCs (Werner, Wassmann et al. 2007). L'hypothèse retenue dans cette étude résiderait dans la réendothélisation insuffisante de l'endothélium vasculaire par les EPCs déficientes. Considérant que les facteurs de risque cardiovasculaire énumérés auparavant favorisent la dysfonction endothéliale vasculaire, plusieurs groupes se sont penchés sur le lien existant entre ces facteurs de risque cardiovasculaire et les EPCs. Si l'exercice (Laufs, Werner et al. 2004), le stress de cisaillement (Yamamoto, Takahashi et al. 2003) ainsi que certains médicaments comme les statines (Yamamoto, Takahashi et al. 2003; Laufs, Werner et al. 2004; Zhu, Tao et al. 2004) favorisent tous le recrutement et la mobilisation des EPCs, l'hypertension (Imanishi, Moriwaki et al. 2005), le diabète (Fadini, Sartore et al. 2006), l'hyperlipidémie, la sédentarité, le vieillissement, ainsi que le tabagisme (Imanishi, Moriwaki et al. 2005; Thorin-Trescases, Voghel et al. 2005; Fadini, Sartore et al. 2006;

Michaud, Dussault et al. 2006; Werner and Nickenig 2006). sont tous des facteurs associés à une diminution du nombre et du potentiel thérapeutique des EPCs, principalement en induisant leur mort par apoptose (Figure 6)

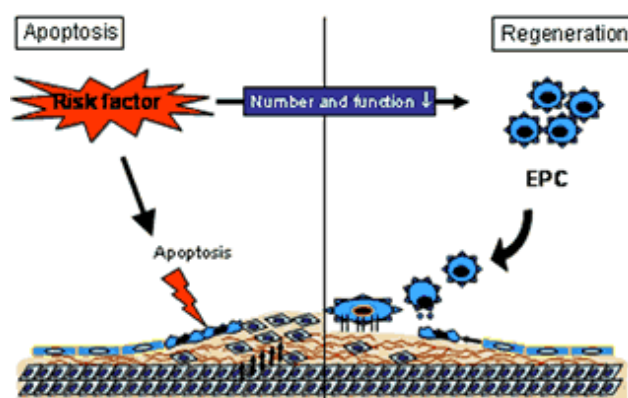


Figure 6: Les facteurs de risque cardiovasculaire et les cellules endothéliales progénitrices (Selon Werner *et al.* 2004)

En résumé, le vieillissement vasculaire est associé à une augmentation de la réponse inflammatoire et une diminution à la fois des propriétés anti-thrombogéniques et régulatrices du tonus myogénique de l'endothélium vasculaire. De plus, avec l'âge, l'accumulation de facteurs de risque cardiovasculaire augmente la production de ROS, ce qui endommage pratiquement toutes les composantes cellulaires et exacerbe ainsi la dysfonction cellulaire observée avec le vieillissement. L'altération consécutive de la fonction cellulaire affecte le fonctionnement normal des tissus, organes et systèmes rendant ainsi l'organisme plus vulnérable aux pathologies. Une meilleure compréhension des mécanismes de vieillissement au niveau cellulaire permettrait donc d'établir des traitements afin de rétablir ou mieux, de prévenir les maladies qui surviennent avec l'âge.

1.3. Le vieillissement cellulaire

1.3.1. Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un processus complexe impliqué dans la croissance et la prolifération cellulaires, le développement de l'organisme, la réparation des dommages à l'ADN, la régénération des lésions tissulaires ainsi que le vieillissement et le cancer. Plusieurs protéines régulatrices interviennent dans cette séquence d'événements menant à la mitose et la production de deux cellules-filles identiques. Elles permettent ainsi la progression à travers les diverses phases du cycle cellulaire soit l'interphase (G_1 , S et G_2) et les phases de la mitose (prophase, métaphase, anaphase, télophase) (Figure 7) (Schafer 1998). Les phases G_1 et G_2 correspondent aux points (*gaps*) du cycle cellulaire situés entre la synthèse de l'ADN (phase S) et la division cellulaire (phase M). Lors de la phase G_1 , la cellule croît et l'intégrité de son ADN est vérifiée avant de le dupliquer. Si les dommages à l'ADN génomiques sont importants et irréversibles, la cellule n'entrera pas en phase S et arrêtera sa croissance. Cependant, si les dommages sont réversibles, ceux-ci seront réparés et la cellule entrera en phase S. Ceci prévient l'accumulation de défauts génétiques à l'intérieur du génome. Finalement, la phase G_2 consiste principalement en une croissance cellulaire nécessaire à l'étape finale, soit la mitose. Toutefois, les cellules peuvent également se trouver dans une phase appelé G_0 . Cette phase située juste avant G_1 , définit à la fois les cellules non prolifératives mais ayant le potentiel de se diviser, ainsi que les cellules différenciées comme les neurones.

Au cœur du processus de division cellulaire se trouvent les protéines appelées cyclines ainsi que les kinases dépendantes des cyclines (*cyclin-dependent kinases*,

CDK). Les CDKs sont des kinases sérine/thréonine activées à des points spécifiques du cycle cellulaire (Figure 7). Leur importance est critique compte tenu du fait que leur

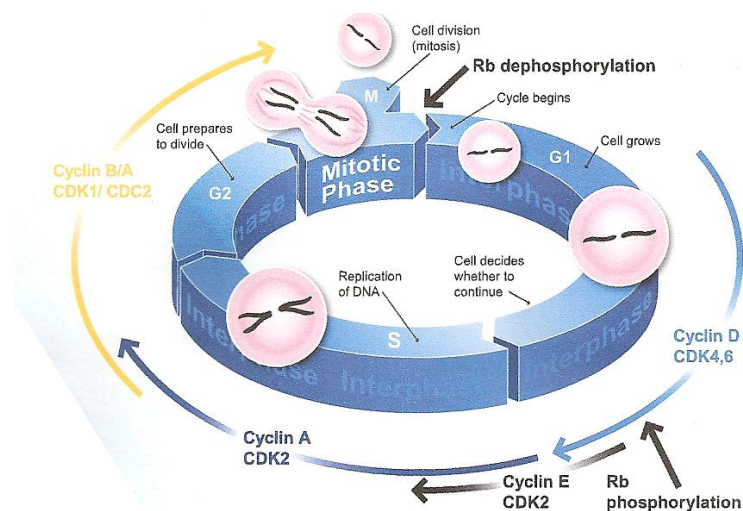


Figure 7: La régulation du cycle cellulaire par les complexes CDK-cyclines.
(Tiré du site internet www.Abcam.com)

inactivation prévient la mitose (Devault, Cavadore et al. 1991; Parker and Piwnicka-Worms 1992). Cette interaction entre les CDKs et les cyclines permet donc à la cellule d'entrer et de sortir du cycle cellulaire selon l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des cyclines. En effet, les CDKs peuvent phosphoryler une grande variété de substrats catalysant ainsi le processus de division cellulaire. Par exemple, lors des phases G₂ et M, les substrats de certaines CDKs incluent les lamines nucléaires et les microtubules qui forment le cytosquelette (Kill and Hutchison 1995; McNally 1996). Dans la phase G₁, une cible importante des CDKs est la protéine du rétinoblastome (Rb). Sa forme hypophosphorylée lie le facteur de transcription E2F l'empêchant ainsi de transcrire l'ADN (Figure 8) (Arroyo and Raychaudhuri 1992; Mudrak, Ogris et al. 1994). Par contre, lorsque certaines CDKs, comme la CDK4/6 associée à la cycline D₁,

initient la phosphorylation du Rb, le facteur E2F est libéré et se lie aux promoteurs de plusieurs gènes. Ceci initie leur transcription et la synthèse subséquente de protéines nécessaires à la progression du cycle cellulaire telles que les cyclines A et B (entrée en

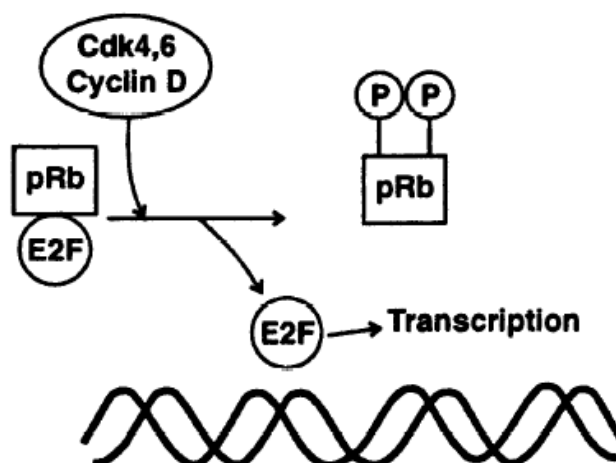


Figure 8: Représentation schématique de l'activation de E2F par le complexe CDK-cycline. (Selon Schafer *et al.* 1998)

phase S) ainsi que certaines sous-unités d'ADN polymérase (Sun, Bagella et al. 2007). Les CDK2 et CDK1 associées aux cyclines A et B, respectivement, auraient comme rôle de conserver le Rb sous sa forme phosphorylée tout au long du cycle cellulaire (Weinberg 1995). Lorsque la prolifération des cellules quiescentes est stimulée, les premières CDKs activées sont celles associées à la cycline D (CDK4/6) (Figure 7). L'activité du complexe engendre une activation subséquente des cyclines E (CDK2) et A (CDK2) qui provoque la réplication de l'ADN. Lorsque la synthèse d'ADN est terminée, le complexe cycline B/CDK1 s'active afin d'initier finalement la mitose. Les facteurs de croissance agissent principalement au niveau des cellules en phases G_0 et G_1 . Ces facteurs initient l'entrée des cellules G_0 en phase G_1 , et permettent aux cellules en début de G_1 de progresser afin de dépasser un certain point de « restriction » (Barth

and Kinzel 1995). Avant ce point, si nous enlevons les facteurs de croissance, la cellule en G_1 retournera en G_0 . Par contre, si ce point de restriction est dépassé, la cellule terminera son cycle cellulaire. En culture, les cellules peuvent devenir quiescentes sous certaines conditions de jeûne. En effet, lorsque ces cellules sont dépourvues de facteurs de croissance, elles sortent du cycle cellulaire et retournent en phase G_0 (Hirst, Fisher et al. 1994; Shambaugh, Lee et al. 1996). Cependant, cet état de non-division temporaire est réversible lorsque la nutrition adéquate des cellules est rétablie.

Tel que mentionné, au cours de cycle cellulaire, des mécanismes de surveillance permettent de vérifier l'intégrité cellulaire et moléculaire avant l'initiation de la division cellulaire et au cours de sa progression. Ces mécanismes sont appelés « points de contrôle » (*Checkpoints*). Ils servent à vérifier si chaque étape a été effectuée avec succès avant de procéder à la prochaine (Shackelford, Kaufmann et al. 1999). Si, à ces points, la cellule détecte certains dommages à l'ADN par exemple, la prolifération sera momentanément arrêtée afin de les réparer avant de retourner dans le processus de division. Si toutefois la cellule est incapable de réparer ces dommages moléculaires, elle entrera dans un état de non-division appelé sénescence répllicative ou bien en apoptose. La majorité de ces points de contrôle implique un délai dans l'activation ou même une inactivation de cyclines et de kinases qui leur sont associées (Cdk) (Hartwell and Kastan 1994; Elledge 1996). Par exemple, le point de contrôle en G_1 permet de détecter en début de phase, les dommages moléculaires avant de progresser en phase S. Si la cellule passe la vérification, l'ADN se réplique tandis que si les dommages sont irréversibles, la cellule retournera en G_0/G_1 . Ce point de contrôle fait intervenir entre autres, la protéine suppresseuse de tumeur p53 (Kastan, Onyekwere

et al. 1991). La protéine p53 peut ensuite activer d'autres molécules telles que p21 et Mdm2 qui seront ensuite responsables de l'arrêt de la division cellulaire (Funk, Pak et al. 1992; el-Deiry, Harper et al. 1994). Par exemple, la protéine p21 peut inhiber l'activité kinase des cyclines E/Cdk2, cycline D₁/Cdk4 et cycline A/Cdk2 (el-Deiry, Harper et al. 1994; Harper, Elledge et al. 1995). Notons également l'implication de la protéine p16 dans ce point de contrôle pouvant inhiber la formation du complexe cycline D/Cdk4,-6 ainsi que la phosphorylation et l'activité de la protéine du rétinoblastome (Serrano, Hannon et al. 1993; Shackelford, Kaufmann et al. 1999). De plus, bien que son mécanisme n'ait pas été élucidé entièrement, un point de contrôle au niveau de la phase S a également été répertorié. En effet, l'activité de la cycline A/Cdk2, nécessaire à la progression de cette phase, est supprimée lorsque les cellules sont soumises à des irradiations ionisantes causant des dommages moléculaires (Cleaver, Rose et al. 1990). Un autre point de contrôle en phase G₂ permet à la cellule de vérifier l'intégrité de son contenu cellulaire et moléculaire avant d'entreprendre la mitose. Normalement, la cycline B/Cdc2, responsable de la progression en mitose, est cytoplasmique en phase S/G₂ mais est transloquée au noyau en phase G₂/M (Pines and Hunter 1989; Pines and Hunter 1991). Toutefois, le stress génotoxique à ce point de contrôle, en plus d'empêcher cette translocation nucléaire, mène à une diminution de l'activité kinase de la cycline B/Cdc2, arrêtant ainsi la prolifération cellulaire juste avant l'entrée en phase M (Lock and Ross 1990; Jin, Hardy et al. 1998; Toyoshima, Moriguchi et al. 1998).

Finalement, un autre point de contrôle en métaphase sert à détecter l'intégrité des chromosomes afin qu'ils s'attachent adéquatement au fuseau mitotique (Murray 1995). La transition entre la métaphase et l'anaphase ainsi que la séparation des

chromatides-soeurs sont régulées par certains gènes tels que p53, p21 et les protéines de la famille Mad (*mitotic arrest defective*) (Cross, Sanchez et al. 1995; Hardwick and Murray 1995; Di Leonardo, Khan et al. 1997). Tel que mentionné, ces mécanismes permettent d'éviter la réplication d'ADN défectueux en arrêtant la division de cellules endommagées de manière irréversible. Conséquemment, la dysfonction de ces différents points de contrôle a été associée au développement et la progression de plusieurs types de tumeur tels que les cancers colorectal, du sein et de l'estomac pour n'en nommer que quelques-uns (Levine, Momand et al. 1991; Li and Benezra 1996; Keyomarsi and Herliczek 1997).

1.3.2. La sénescence : vieillissement cellulaire ou réponse au stress?

Les cellules peuvent entrer dans un état de non-division irréversible appelé sénescence. Ce comportement inhérent à la majorité des cellules, est insensible aux facteurs de croissance et aux stimulus mitogéniques. Cependant, les cellules peuvent demeurer viables et métaboliquement actives en culture pendant des mois voire des années. Pratiquement toutes les cellules somatiques entreront ultimement en sénescence, sauf les cellules germinales et tumorales. La sénescence cellulaire a été définie pour la première fois en 1961 par Leonard Hayflick qui observa que des fibroblastes en culture cessent de proliférer après un certain nombre de divisions cellulaires (Hayflick and Moorhead 1961). La sénescence peut survenir après une longue période de prolifération ou bien suite à un stress physiologique.

Les cellules sénescents se distinguent de leurs homologues prolifératives par des changements dramatiques au niveau de leur morphologie et de leurs fonctions. En effet, leur cytoplasme augmente de volume, les cellules élargissent et s'aplatissent perdant ainsi leur forme d'origine. De plus, elles accumulent des inclusions vacuoliques ainsi que des altérations au niveau de la structure de leur chromatine (Shelton, Chang et al. 1999; Serrano and Blasco 2001). Par ailleurs, les cellules sénescents acquièrent une adhésion accrue à la matrice extracellulaire ainsi qu'une diminution des contacts cellule-cellule. Différents stimuli peuvent déclencher la sénescence. Lorsque l'on se réfère à la « limite de Hayflick », ou l'entrée en sénescence après un certain nombre de divisions cellulaires, on parle alors de sénescence dite « répllicative ». Ce type de sénescence serait déclenché par le raccourcissement des télomères, une séquence d'ADN située à l'extrémité des chromosomes et jouant le rôle d'horloge mitotique dans nos cellules somatiques. Comme quelques études ont démontré que la longueur des télomères de certains types de cellules humaines étaient inversement proportionnelle au nombre de divisions cellulaires effectuées ainsi qu'à l'âge chronologique des individus, il a été suggéré que la sénescence répllicative cellulaire pouvait être à l'origine du vieillissement physiologique de l'organisme (Harley, Futcher et al. 1990; Vaziri, Dragowska et al. 1994; Ishii, Nakamura et al. 2006; Kappei and Londono-Vallejo 2008). Cependant, d'autres études ont révélé que ces mêmes types cellulaires (cellules endothéliales, épithéliales, leucocytes, fibroblastes) pouvaient entrer en sénescence plus rapidement en présence de diverses sources de stress, et ce, indépendamment de la longueur des télomères. En effet, l'expression de certains oncogènes comme *c-myc* et *Ras*, l'exposition à des radiations et rayons ultra-violetts ainsi que d'autres agents pouvant

endommager l'ADN tel que les ROS pouvaient également déclencher une sénescence prématurée dite « induite par le stress » (*Stress-Induced Premature Senescence*, SIPS) (Lloyd 2002; Ben-Porath and Weinberg 2005; Collado and Serrano 2006). Les cellules exposées à ces agents pourraient également réagir par un arrêt temporaire de la croissance ou bien par apoptose, une mort cellulaire programmée, selon le type de cellules, la nature et le niveau de stress ainsi que la sévérité des dommages engendrés (Lloyd 2002; Collado and Serrano 2006). Donc, la sénescence pourrait être un programme cellulaire de défense pouvant être activé lorsque la cellule subit des stress physiologiques importants. Par exemple, la sénescence pourrait prévenir la prolifération de cellules exposées à des oncogènes et donc, susceptibles de devenir tumorales. De même, ce type de comportement cellulaire pourrait empêcher une cellule très endommagée par des agents toxiques ou oxydants de proliférer afin de donner des cellules-filles également affectées et potentiellement dysfonctionnelles.

Bien que la distinction physiologique de ces deux types de sénescence (répllicative ou induite par le stress) soit quelque peu ambiguë, toutes les cellules sénescents présenteront des altérations de leur métabolisme et de leur niveau d'expressions géniques et protéiques (Campisi 2000; Sitte, Merker et al. 2000; Narita, Nunez et al. 2003). Ainsi, la sénescence, qu'elle soit de cause physiologique ou pathologique, altère les fonctions normales des cellules affectées. Par exemple, les lymphocytes T et B sénescents perdent leur capacité à distinguer les antigènes étrangers de ceux de notre propre organisme, menant ainsi au développement de maladies autoimmunes (Prelog 2006). Les fibroblastes sénescents, eux, sécrèteront moins de fibres de collagène et plus de métalloprotéinases de la matrice favorisant une ré-

organisation de la matrice extracellulaire (Campisi 1998; Ben-Porath and Weinberg 2005). D'autres études suggèrent que la sénescence des cellules endothéliales est associée à une baisse des facteurs vasorelaxants dérivés de l'endothélium vasculaire et une augmentation des facteurs vasoconstrictants (Cohen 1995; Benetos, Okuda et al. 2001; Serrano and Andres 2004). De plus, les cellules endothéliales sénescents expriment plus de molécules pro-inflammatoires telles que la cyclooxygénase de type 2 (COX-2). Certains groupes ont même observé la présence des cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires sénescents au niveau de plaques athérosclérotiques d'artères coronaires (hCoEC) *ex vivo*, (Ross, Wight et al. 1984; Burring 1991; Minamino, Miyauchi et al. 2004). Ainsi, si l'on observe conjointement les altérations fonctionnelles des cellules sénescents, il est logique de spéculer que la sénescence peut être à l'origine non pas du vieillissement physiologique proprement dit, mais plutôt de toutes les complications physiopathologiques qui lui sont normalement associées.

1.3.2.1. Molécules impliquées dans la sénescence

La sénescence est un processus complexe pouvant être déclenchée par différents stimuli et plusieurs cascades de signalisation peuvent mener à cet état de non division cellulaire. Bien que ces différentes voies peuvent se croiser et varier entre les espèces animales et types cellulaires, deux protéines dites « suppresseur de tumeurs » semblent orchestrer cet arrêt de la prolifération, la protéine p53 et la protéine du rétinoblastome (Rb). En fait, ces deux molécules semblent nécessaires à l'initiation et au maintien de la sénescence, l'inactivation de ces gènes permettant aux cellules de

retourner à un état prolifératif (Dannenbergh, van Rossum et al. 2000; Dirac and Bernards 2003; Sage, Miller et al. 2003).

Il n'est cependant pas clair aujourd'hui encore si ces deux molécules déclenchent la sénescence en parallèle ou bien de manière linéaire. En effet, il a été démontré que l'activation de p53 peut induire la sénescence indirectement *via* l'hypophosphorylation du Rb par l'intermédiaire de protéines inhibitrices des CDKs (CKIs), ou bien indépendamment du Rb (Pantoja and Serrano 1999; Ben-Porath and Weinberg 2005). Les CKIs se divisent en deux principales classes, les INK4 et les Cip/Kip. En inhibant l'activité des CDKs responsables de la phosphorylation du Rb, l'activation du facteur de transcription E2F est bloquée et les cellules sont arrêtées en phase G₁. La famille Cip/Kip comprend les protéines p21^{Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2} (Bringold and Serrano 2000). Ces molécules ont la capacité de lier à la fois les cyclines D/CDK4-6 et cyclines E-A/CDK2. L'activation transcriptionnelle du gène de p21 par p53 serait à l'origine du déclenchement de la sénescence, l'arrêt de la division cellulaire engendré par différents stimuli coïncidant avec une brusque mais transitoire augmentation des niveaux de p21 (Ben-Porath and Weinberg 2005). Une fois la sénescence activée, l'expression de p21 diminue pour se stabiliser à des niveaux légèrement supérieurs à ceux retrouvés dans les cellules non-sénescents, ce qui suggère qu'elle n'est pas impliquée dans le maintien à long terme de la sénescence (Roninson 2002). En fait, une fois la sénescence activée, l'inhibition de p21 dans des fibroblastes d'embryons de souris n'a aucun impact sur la sénescence cellulaire (Pantoja and Serrano 1999). Ceci suggère l'implication de mécanismes collatéraux qui permettent de conserver les cellules en état de sénescence, indépendamment de p21.

Des études ont confirmé que ces mécanismes collatéraux étaient principalement médiés par deux gènes (INK4, *Inhibitor of cdk4*; ARF, *Alternate Reading Frame*) situés sur le locus INK4a/ARF humain et codant pour les protéines p16^{INK4a} et p14^{ARF} (p19^{ARF} chez les souris) respectivement (Sharpless and DePinho 1999). Tandis que p14 s'associe à Mdm2 et régule le cycle cellulaire par stabilisation indirecte de p53, p16 se lie et inhibe directement le complexe cycline D/CDK4-6 maintenant ainsi le Rb sous sa forme non-phosphorylée et les cellules dans un état non prolifératif (Bringold and Serrano 2000; Ben-Porath and Weinberg 2005). La protéine p16 n'est normalement pas exprimée dans des tissus adultes sains (Zindy, Soares et al. 1997; Lowe and Sherr 2003), inactivée dans une grande proportion de tumeurs (>30%) (Rocco, Li et al. 1998; Ruas and Peters 1998) mais abondamment exprimée dans les cellules sénescents (Alcorta, Xiong et al. 1996; Palmero, McConnell et al. 1997). Tout comme p53, p16 peut être activée par des stimuli tels que les dommages à l'ADN, les oncogènes et autres sources de stress cellulaire. Ainsi, l'arrêt de la division engendré par l'hypophosphorylation du Rb peut être à la fois déclenché par p53 et/ou par p16, parallèlement ou linéairement. Il est intéressant de noter que, lorsque p16 contribue à la sénescence, une inhibition simultanée de p53 ou de p21 ou bien des stimuli déclencheurs ne pourront renverser la sénescence cellulaire. Dans ce cas, seulement une inactivation de p16 ramènera les cellules en prolifération (Foster, Wong et al. 1998; Brookes, Rowe et al. 2004). Il a donc été suggéré que l'activation de p16 jouerait un rôle de « sécurité » au niveau de la prolifération cellulaire, indépendamment de p53 et p21. En effet, la majorité de ces agents stressants énumérés antérieurement provoquent des dommages cellulaires et moléculaires, dommages qui activeraient les CKIs par l'intermédiaire des protéines ATM/ATR (Figure 9) (Ben-Porath and

Weinberg 2005). Afin de contrôler la propagation hasardeuse de ces dommages, la cellule reconnaît ses défauts et initie un premier niveau de sénescence, appelé « M₁ », principalement contrôlé *via* p53-p21-Rb (Sun, Bagella et al. 2007). Ensuite, si la combinaison et la sévérité des différents types de stress impliqués ont créé des altérations réversibles et si la cellule a la capacité de réparer les dégâts, elle aura la possibilité de proliférer à nouveau. Sinon, la voie de p16 sera activée afin de garder les cellules en sénescence de manière irréversible, un état appelé « M₀ ». Finalement, si la cellule en M₀ continue de subir les dommages délétères par les différents types de stress, la protéine p53 aura la possibilité de déclencher une mort cellulaire programmée par apoptose indépendante des CKIs (Chen, Liu et al. 2000).

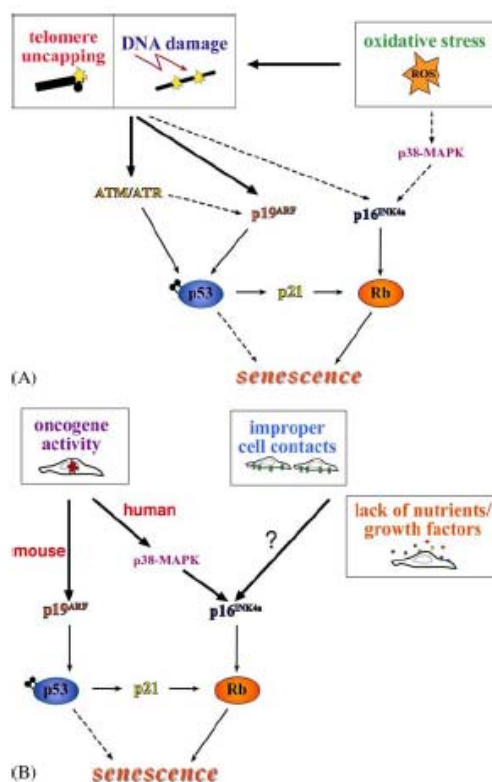


Figure 9 : Activation des cascades de signalisation de la sénescence par différents stimuli. (Selon Ben-Porath & Weinberg, 2005)

Toutefois, la sénescence induite par des oncogènes se fait indépendamment des protéines associées aux dommages à l'ADN (ATM/ATR). En effet, ce type de sénescence est déclenché suite à l'exposition à des stimuli mitogéniques et est principalement régulé par une des voies des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), celle des protéines ERK1 (*Extracellular signal-regulated protein kinase-1*, ou p44 MAPK) et ERK2 (*Extracellular signal-regulated protein kinase-2*, ou p42 MAPK) (Meloche and Pouyssegur 2007). Cette voie mitogénique est activée principalement par plusieurs facteurs de croissance comme le PDGF (*Platelets Derived Growth Factor*) (Weber, Raben et al. 1997) et le FGF (*Fibroblasts Growth Factor*) (Kunath, Saba-El-Leil et al. 2007) qui, en se liant à leurs récepteurs, provoquent une activation de la molécule *Ras*. La cascade subséquente implique l'activation séquentielle des protéines Raf, MEK (*MAPK/ERK kinase*) et ERK1/2 (Meloche, Seuwen et al. 1992; Meloche and Pouyssegur 2007). Par la suite, ERK1/2 favorise l'activation du facteur de transcription AP-1 (Meloche and Pouyssegur 2007) et l'inactivation de Tob (Maekawa, Nishida et al. 2002; Suzuki, J et al. 2002), un co-represseur de la transcription de la cycline D₁ (Yoshida, Nakamura et al. 2003). Ceci se traduit par une augmentation de l'expression génique et des niveaux protéiques de cycline D₁, favorisant ainsi la progression de la phase G₁ du cycle cellulaire (Weber, Raben et al. 1997; Roovers and Assoian 2000). Ainsi, certains groupes ont proposé un rôle de cette voie mitogénique dans la transformation cellulaire suite à une exposition à certains oncogène, ERK1/2 étant constitutivement phosphorylés et activés dans les fibroblastes transformés par *Ras*, *Raf* et *Src* (Kyriakis, App et al. 1992; Leervers and Marshall 1992; Khosravi-Far and Der 1994). Cependant, les cellules semblent avoir développé des mécanismes afin de contrebalancer une hyperprolifération incontrôlée. En effet, cette activation de la

voie Ras-Raf-ERK1/2 a également été associée à une augmentation des niveaux protéiques des CKIs. Une brusque activation suivie d'une activation modérée mais soutenue de ERK1/2 par Ras/Raf engendre une induction transitoire de p21, une accumulation de cycline D₁ et donc, la progression du cycle cellulaire (Bottazzi, Zhu et al. 1999; Meloche and Pouyssegur 2007). Ainsi, cette accumulation transitoire de p21 viendrait stabiliser le complexe cycline D-Cdk4 durant la phase G₁ et réguler ainsi la division cellulaire (Roovers and Assoian 2000; Bagui, Mohapatra et al. 2003). Toutefois, une activation prolongée de forte intensité de ERK1/2 par *Ras* ou *Raf*, favoriserait plutôt une importante induction de p21 qui provoquerait l'arrêt de la division cellulaire en phase G₁ (Woods, Parry et al. 1997; Kerkhoff and Rapp 1998; Tombes, Auer et al. 1998). De plus, il a aussi été démontré que cette importante activation de ERK1/2 peut induire parallèlement l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire p53 et p16 qui pourraient également contribuer à l'arrêt de la croissance cellulaire (Malumbres, Perez De Castro et al. 2000; Han, Tsukada et al. 2005; Meloche and Pouyssegur 2007). De plus, une autre voie des MAPK, médiée cette fois par la protéine p38-MAPK, peut également induire la sénescence indépendamment des dommages moléculaires. En effet, il a été rapporté que, suite à l'exposition à des oncogènes ou à des radicaux libres (Figure 9), la protéine p38-MAPK peut elle aussi activer les molécules p53, p16, p27, p21, directement ou indirectement *via* d'autres médiateurs, et donc induire l'arrêt de la division cellulaire (Lin, Barradas et al. 1998; Wang, Chen et al. 2002; Iwasa, Han et al. 2003; Colavitti and Finkel 2005; Han and Sun 2007). Ainsi, ces voies des MAPK pourraient servir de médiateurs afin de prévenir une hyperprolifération cellulaire incontrôlée et, conséquemment, le développement et la progression de tumeurs (Pritchard, Carragher et al. 2007).

Notons également que certaines cellules exposées à diverses molécules réussissent à échapper à la sénescence. En effet, quelques études ont démontré que l'inhibition des CKIs par certaines molécules telles que Mdm2 (inhibiteur de p53) et Bmi (inhibiteur de p16) pouvait mener à l'immortalité cellulaire, propice au développement et à l'évolution de certains cancers (Itahana, Zou et al. 2003; Ben-Porath and Weinberg 2005).

En résumé, la sénescence constitue un arrêt irréversible de la division cellulaire où les cellules demeurent métaboliquement actives. Par contre, les cellules sénescents présentent des changements morphologiques et de leur expression génique, pouvant expliquer la dysfonction cellulaire associée. Différents stimuli comme l'instabilité télomérique, des dommages à l'ADN, des oncogènes et autres radiations, peuvent déclencher cet état de non division. Le point commun aux différents agents stressants est qu'ils menacent tous l'intégrité moléculaire des cellules, ce qui les mène à arrêter leur prolifération afin de ne pas propager ces défauts. Dans des conditions physiologiques, le raccourcissement des télomères semblent mener au vieillissement cellulaire dû à l'épuisement de leur potentiel réplicatif, tandis que dans des conditions pathologiques, la sénescence s'avère plutôt être une réponse au stress face à divers agents stressants.

1.4. Les télomères et le vieillissement

Aucune autre structure chromosomique que les télomères n'a aussi bien été liée à diverses complications physiopathologiques chez les humains. Reconnue comme jouant le rôle d'horloge mitotique de la majorité de nos cellules, la longueur des télomères localisés à l'extrémité des chromosomes, est devenue un biomarqueur de choix dans l'analyse de l'impact sur la santé de plusieurs facteurs génétiques et environnementaux, *a fortiori* dans les populations âgées. Différents groupes de recherche ont associé les télomères courts à diverses pathologies telles que la déminéralisation osseuse (Bekaert, Van Pottelbergh et al. 2005), l'obésité et autres manifestations liées au vieillissement (Bekaert, Van Pottelbergh et al. 2005; Kappei and Londono-Vallejo 2008). En effet, à cause de l'incapacité de la machinerie moléculaire à répliquer une extrémité des télomères, les télomères raccourcissent à chaque division cellulaire jusqu'à une longueur minimale où les cellules entrent en sénescence répllicative (Shay and Wright 2000).

Considérant les conséquences subséquentes affectant les fonctions tissulaires et des organes, ceci confère un rôle inhérent des télomères à toutes les complications associées au vieillissement, d'autant plus que le nombre de divisions cellulaires effectuées corrèle souvent à l'âge chronologique. Par opposition, les cellules cancéreuses possèdent des mécanismes cellulaires qui maintiennent la longueur de leurs télomères relativement stable, et ce, en dépit de leur taux de réplication relativement élevé (Blasco 2005). Or, plusieurs maladies inflammatoires comme l'athérosclérose, seraient associées à une augmentation de la prolifération de cellules

(e.g. cellules musculaires lisses, endothéliales et sanguines) ne possédant pas ces mécanismes de maintenance, expliquant ainsi les complications qui leur sont associées (Nowak, Siwicki et al. 2002; Ilmonen, Kotrschal et al. 2008).

La longueur des télomères ne serait pas affectée uniquement par le nombre de divisions cellulaires. En effet, il existe des variations marquées dans la longueur des télomères d'individus de la même tranche d'âge et plusieurs évidences suggèrent fortement une prédisposition génétique. Par exemple, des jumeaux homozygotes présentent des télomères de longueurs similaires tandis que ceux provenant de jumeaux hétérozygotes diffèrent significativement (Slagboom, Droog et al. 1994). Par ailleurs, une corrélation positive a été observée entre l'âge des pères et la longueur des télomères de leurs enfants (Unryn, Cook et al. 2005), suggérant ainsi que la transmission verticale de la longueur des télomères contribuerait de manière significative à ces variations à travers la population. Parallèlement, la longueur moyenne des télomères serait également sujette aux facteurs environnementaux. Par exemple, le faible statut socio-économique (Cherkas, Aviv et al. 2006) ainsi que le stress psychologique (Epel, Blackburn et al. 2004) ont été associés à des télomères courts.

1.4.1. Structure et fonctions

Les télomères consistent en une séquence double-brins d'acides nucléiques (TTAGGG) répétée en tandem et situés à l'extrémité des chromosomes linéaires. Entre autres, ils jouent le rôle de coiffes des chromosomes et empêchent ainsi la fusion de

leurs extrémités entre elles. De plus, dû au *end-replication problem* (Figure 11) et à l'activité de certaines nucléases, les télomères raccourcissent à chaque division cellulaire, laissant l'extrémité 3' des télomères en simple brin riche en guanines, plus longue que l'extrémité 5' (*3' single strand overhang*). Afin de se protéger et de ne pas être assimilés à des dommages à l'ADN, les télomères et leurs protéines associées forment une boucle télomérique appelée *t-loop* qui permet au simple brin de se plier à l'intérieur de la séquence double-brin en amont (Figure 10) (Griffith, Comeau et al. 1999; Stansel, de Lange et al. 2001; Dreesen, Li et al. 2007). Ceci empêche la cellule de reconnaître ses télomères comme étant des cassures double-brins. Autrement, afin de réparer ces altérations moléculaires, la cellule aurait déclenché des « alarmes » cellulaires menant normalement à l'arrêt de la croissance des cellules (Bennett, Lewis et al. 1993; Sandell and Zakian 1993). De plus, le raccourcissement progressif des télomères correspondrait aussi à une sorte de sacrifice moléculaire. En effet, certains gènes de grande importance tels que p53 et le Rb, sont situés aux régions subtélomériques (Wright and Shay 1995). Avec le *end-replication problem*, les télomères s'érodent à chaque division cellulaire, permettant ainsi d'épargner ces régions sub-télomériques cruciales au bon fonctionnement cellulaire.

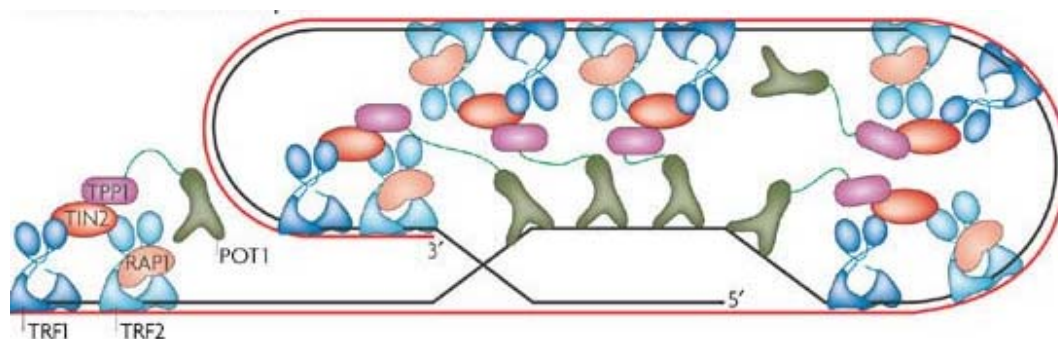


Figure 10: Stabilisation de la boucle télomérique (*t-loop*) par le complexe *shelterin*. (Selon Dreesen *et al.* 2007)

Bien que plusieurs protéines interagissent avec les télomères, seulement six d'entre elles regroupées forment et protègent directement les télomères. Ce complexe télomérique, appelé *shelterin*, est composé des protéines TRF1, TRF2 (*Telomere Repeat binding Factor*) et POT 1 (*Protection Of Telomeres*) qui s'attachent directement aux séquences répétées TTAGGG, ainsi que des protéines TIN2 (*TRF1-interacting protein 2*), Tpp1 et Rap1 (de Lange 2005) (Figure 10). En plus de la structure et protection télomérique, le complexe *shelterin* participe à la formation de la *t-loop*, orchestrée principalement par TRF2 (Smogorzewska, van Steensel et al. 2000; Stansel, de Lange et al. 2001), ainsi qu'au contrôle de la synthèse d'ADN par la télomérase, principalement *via* TRF1 (van Steensel and de Lange 1997) et POT1 (van Steensel and de Lange 1997; Kelleher, Kurth et al. 2005). Par exemple, TRF1 serait très exprimé au niveau des longs télomères, bloquant ainsi la liaison de la télomérase et donc, l'élongation futile des télomères. Plus les télomères raccourcissent, moins de protéines TRF1 se lierait, laissant libre accès à la télomérase afin qu'elle puisse les rallonger. Finalement, le complexe *shelterin* semble jouer le rôle de « trousse de premiers soins » des télomères, étant associé à d'autres protéines impliquées dans la réparation de dommages à l'ADN telles que la tankyrase, WRN, ERCC1/XPF, le complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) ainsi que la DNA-PK (Muntoni and Reddel 2005). Un équilibre « symbiotique » permettrait à ces dernières protéines d'assister le complexe *shelterin* dans l'exécution de diverses opérations : elles assureraient une meilleure intégrité des télomères tout en étant tempérées par le complexe *shelterin*, étant donné que certaines de ces protéines (WRN, ERCC1, MRN) ont également la capacité de dégrader l'extrémité des chromosomes (de Lange 2005).

1.4.2. *End-replication problem* et l'instabilité télomérique : dommages à l'ADN?

Dans la majorité des cellules somatiques dépourvues de télomérase active, le raccourcissement passif de l'extrémité des télomères survient inévitablement à chaque réplication incomplète de l'ADN lors de la division cellulaire, processus appelé le *end-replication problem* (Figure 11) (McEachern and Blackburn 1996; Shay and Wright 2000). Lors de la phase S du cycle cellulaire, le complexe *shelterin* se détache momentanément des télomères pendant que des hélicases séparent l'ADN double-brin en un brin précoce (*leading strand*) et un brin tardif (*lagging strand*). Ensuite, une ADN polymérase synthétise une séquence d'ADN complémentaire au brin précoce (pointillés dans la Figure 11). Or, comme cette polymérase ne peut rajouter des acides

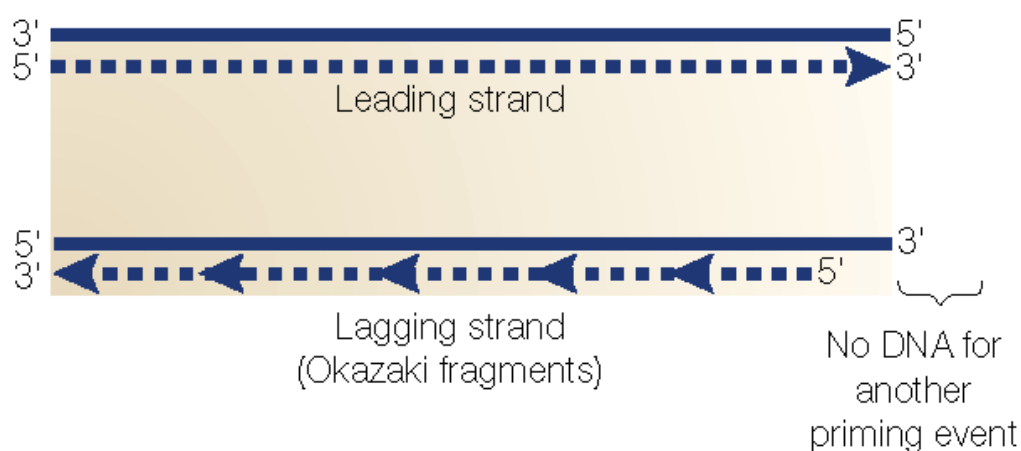


Figure 11 : *End-replication problem*. (Selon Shay and Wright, 2000)

nucléiques que dans une direction ($5' \rightarrow 3'$), le brin tardif utilise des courtes séquences d'ARN, appelés fragments d'Okazaki, dispersées à intervalles réguliers et qui servent d'ancrage à la polymérase. Ainsi, cette dernière peut ensuite rajouter les acides nucléiques complémentaires entre ces fragments d'Okazaki dans le sens $5' \rightarrow 3'$. Une

endonucléase, la Fen-1/Rad27p, est chargée ensuite de retirer ces fragments afin de permettre à la polymérase en amont de compléter la séquence qu'ils occupaient. Or, ceci laisse un trou non-comblé au niveau du fragment d'Okazaki fixé à l'extrémité 3' des télomères (Figure 11) (Wellinger, Ethier et al. 1996; Parenteau and Wellinger 1999). La longueur de cette séquence peut varier selon la position initiale du dernier fragment d'Okazaki : plus il est situé à l'intérieur de la séquence télomérique, plus la partie non-synthétisée sera importante (Makarov, Hirose et al. 1997; Huffman, Levene et al. 2000). Conséquemment, les nouveaux télomères synthétisés posséderont donc un brin 5' plus court que le brin 3' (*single-strand overhang*), raccourcissant proportionnellement avec le nombre de divisions cellulaires.

Le complexe *shelterin* jouant le rôle de coiffe protectrice des télomères, le raccourcissement progressif des télomères diminuerait graduellement le nombre de sites de liaison des protéines télomériques et mènerait ainsi à la perte de leurs fonctions protectrices. En effet, cette dysfonction télomérique permet à la boucle télomérique de se dérouler, laissant ainsi dépasser le simple brin 3'. Afin d'empêcher la fusion susceptible des extrémités télomériques entre elles, les cellules reconnaissent cette partie d'ADN comme étant une cassure double brins. Conceptuellement, elles déclenchent l'arrêt de la division cellulaire, par apoptose ou sénescence selon le type de cellules et la nature du dommage, afin d'activer des mécanismes de réparation moléculaire. Par exemple, un seul télomère très court et/ou très endommagé est suffisant pour déclencher la sénescence (Zou, Sfeir et al. 2004). Les événements engendrés impliquent le recrutement au niveau des télomères de plusieurs facteurs tels que *ATM* (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), *ATR* (*Ataxia Telangiectasia and Rad3*

related), la forme phosphorylée de l'histone H2AX (γ -H2AX), 53BP1, Chk2 et Mre11 (d'Adda di Fagagna, Reaper et al. 2003; Takai, Smogorzewska et al. 2003). Cependant, ces mécanismes de réparation des dommages moléculaires à l'ADN sont significativement moins efficaces au niveau des télomères qu'ailleurs sur l'ADN génomique (Harrington and Robinson 2002; Richter, Saretzki et al. 2007), laissant les cellules au mieux, en sénescence, au pire, en apoptose. Par ailleurs, il n'y a pas que le raccourcissement à proprement dit des télomères qui puisse les rendre dysfonctionnels et déclencher la sénescence. En effet, des irradiations, des agents pharmacologiques tels l'étoposide et la doxorubicine, ou les radicaux libres peuvent causer des dommages aux télomères (Ben-Porath and Weinberg 2005). Plusieurs groupes ont donc tenté d'établir des marqueurs d'instabilité télomérique autres que la longueur des télomères. En plus des molécules comme ATM et γ -H2AX certaines études contradictoires révèlent la protéine TRF2 comme étant un médiateur à deux effets en ce qui concerne la réponse aux dommages à l'ADN. En effet, une étude suggère qu'une perte de TRF2, et probablement du complexe *shelterin*, activerait la voie de l'ATM, menant à une augmentation de l'activité de p53 et de p21 et l'entrée en sénescence (Karlseder, Broccoli et al. 1999). Par contre, des travaux récents du groupe de von Zglinicki ont démontré la même réponse suite à une surexpression de TRF2 suggérant qu'une boucle télomérique trop dense empêcherait la réparation des télomères, menant à l'arrêt de la prolifération cellulaire (Richter, Saretzki et al. 2007). Ainsi, une étude adéquate de la contribution des télomères à la sénescence cellulaire nécessiterait l'utilisation d'une combinaison de plusieurs de ces marqueurs.

1.4.3. Les mécanismes de maintenance des télomères

Certains types de cellules virtuellement immortelles ne présentent pas de raccourcissement des télomères. Ces cellules possèdent des mécanismes qui permettent de maintenir la longueur de leurs télomères relativement stable, en dépit du *end-replication problem*. En effet, les cellules germinales et près de 90% des cellules tumorales présentent une activité importante de la télomérase, une transcriptase inverse très faiblement exprimée dans les cellules somatiques normales. Les souches de cellules tumorales restantes (10%) ne présentent pas cette même activité de la télomérase mais ont développé un mécanisme alternatif d'allongement des télomères (*Alternative Lengthening of Telomeres*, ALT).

1.4.3.1. La télomérase

1.4.3.1.2 L'activité télomérique

Afin de maintenir son intégrité, le complexe telomere-*shelterin* peut interagir avec une transcriptase inverse appelée télomérase. Cette ribonucléoprotéine est principalement responsable de l'élongation de l'extrémité 3' des télomères, prévenant ainsi leur raccourcissement progressif. Elle est composée d'une sous-unité catalytique, la TERT (*TElomerase Reverse Transcriptase*) ainsi que d'une matrice interne d'ARN télomérique, la TR (*Telomerase RNA*) ou TERC (*Telomerase RNA Component*). Lors de la réplication de l'ADN, l'hélicase sépare les doubles brins d'ADN et la télomérase se lie au simple brin saillant des télomères (3') (Figure 12) (McEachern, Krauskopf et al. 2000; Autexier and Lue 2006). La transcriptase inverse (TERT) utilise ensuite la matrice d'ARN (TR) afin de synthétiser des nouvelles séquences télomériques. Une

fois le premier hexamère produit, la télomérase se déplace sur les télomères vers l'extrémité 3' afin de produire un second hexamère télomérique et ainsi de suite.

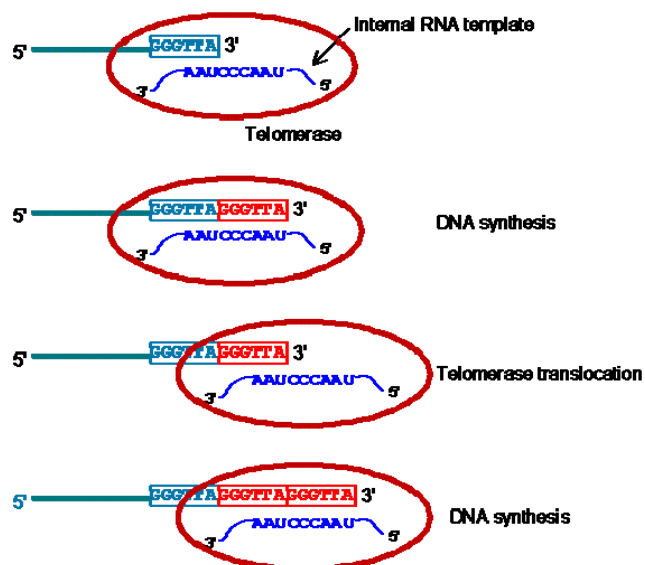


Figure 12: Mode d'action de la télomérase (Adapté de Autexier et Lue, 2006)

Tandis que la sous-unité TR de la télomérase est exprimée de façon ubiquitaire, la TERT, elle, semble être exprimée en grande quantité dans les cellules tumorales, embryonnaires et germinales, légèrement dans les cellules très prolifératives de tissus en régénération et très faiblement dans les cellules somatiques matures (Wright, Piatyszek et al. 1996; Shay and Wright 2007). Cependant, certaines études ont démontré que l'expression et l'activité de la TERT pouvaient être augmentées par des antioxydants (Assmus, Urbich et al. 2003; Haendeler, Hoffmann et al. 2004; Pizzimenti, Briatore et al. 2006) et certains oncogènes tels que *c-myc* (Assmus, Urbich et al. 2003; Haendeler, Hoffmann et al. 2004; Endoh, Tsuji et al. 2005; Pizzimenti, Briatore et al. 2006; Lin, Liu et al. 2007), et que ceci était associé à une augmentation du nombre de divisions cellulaires effectuées. Bien que l'activité de la télomérase

puisse refléter le potentiel répliatif des cellules, son interaction avec les télomères semble être très bien régulée par une boucle de rétroaction négative. En effet, lorsque les télomères sont longs et que leur intégrité est adéquate, le complexe *shelterin* condenserait la boucle télomérique adoptant une conformation dite « fermée » et restreignant par le fait même l'accès et l'action de la télomérase. À l'inverse, lorsque les télomères sont courts et/ou altérés, la cellule déclencherait des mécanismes de réparation moléculaire nécessitant une relaxation du complexe *shelterin* (conformation « ouverte »), laissant libres les sites de liaison de la télomérase (de Lange 2005). Une balance existerait donc entre les télomères courts et longs dans laquelle une longueur optimale serait déterminée par des facteurs génétiques entre autres, permettant un potentiel répliatif maximal.

1.4.3.1.2. Les activités extra-télomériques

En dépit de sa principale action de maintenir l'intégrité des télomères, certaines études confèrent à la télomérase des fonctions extra-télomériques. Pour ce faire, différentes techniques ont été utilisées comme enlever la matrice d'ARN (TERC), muter une région de la TERT responsable de l'élongation des télomères, ou bien utiliser des neurones, cellules où la longueur des télomères ne semble pas, *a priori*, jouer un rôle déterminant. Ainsi, certains groupes ont montré que la télomérase augmentait la stabilité génomique ainsi que la réparation de l'ADN extra-télomérique, indépendamment de la longueur des télomères (Smith, Coller et al. 2003; Gupta, Wang et al. 2004). La TERT pourrait augmenter la résistance à l'apoptose induite par certains stress comme des agents endommageant l'ADN (etoposide, ROS) (Lu, Fu et al. 2001; Gorbunova, Seluanov et al. 2002), le TNF α et de son ligand inducteur d'apoptose

(TRAIL) (Lu, Fu et al. 2001; Gorbunova, Seluanov et al. 2002; Dudognon, Pendino et al. 2004). Ces effets seraient associés à la capacité de la TERT à moduler l'expression de diverses cyclines ainsi que certains gènes anti-apoptotiques tels que p53, Bcl-2, Bcl-XS (Xiang, Wang et al. 2000; Xiang, Wang et al. 2002) et la survivine (Xiang, Wang et al. 2000; Xiang, Wang et al. 2002; Smith, Collier et al. 2003). Bien que ces découvertes semblent prometteuses, d'autres études sont nécessaires afin de caractériser plus précisément les voies par lesquelles la télomérase peut s'avérer bénéfique indépendamment de la longueur des télomères.

1.4.3.2. L'Alternative Lengthening of Telomeres (ALT)

Près de 10% des cellules tumorales présentent un mécanisme d'allongement des télomères indépendant de la télomérase, appelé ALT. Ce mécanisme est présent principalement dans les tumeurs avec karyotypes complexes et grande instabilité génomique. Cependant, certaines cellules ALT présentent des comportements variant légèrement, suggérant qu'il existerait peut-être différents types de ALT. Le groupe de Reddel propose que ce mécanisme de maintenance des télomères requiert l'intégrité du complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1) (Muntoni and Reddel 2005). Ce complexe de recombinaison moléculaire colocalise avec les corps PML (*ProMyelocytic Leukemia*) et les télomères et s'avèrerait un élément clé dans le fonctionnement de l'ALT (Yeager, Neumann et al. 1999). Reddel suggère comme théorie de ALT, une recombinaison télomérique. En effet, ses travaux ont montré que les télomères de chromosomes-sœurs se copieraient l'un avec l'autre (Figure 13) (Dunham, Neumann et al. 2000; Londono-Vallejo, Der-Sarkissian et al. 2004). Cette interaction survient habituellement dans la réparation de dommages double-brins (Johnson and Jasin 2000).

Il a donc été proposé que l'ALT est un mécanisme de réparation moléculaire ancestral toujours présent dans les cellules eukaryotes mais qui a été détrôné par la télomérase au cours de l'évolution (de Lange 2004). Son dysfonctionnement serait par contre, à l'origine de la prolifération incontrôlée retrouvée dans les cellules tumorales n'exprimant pas de télomérase.

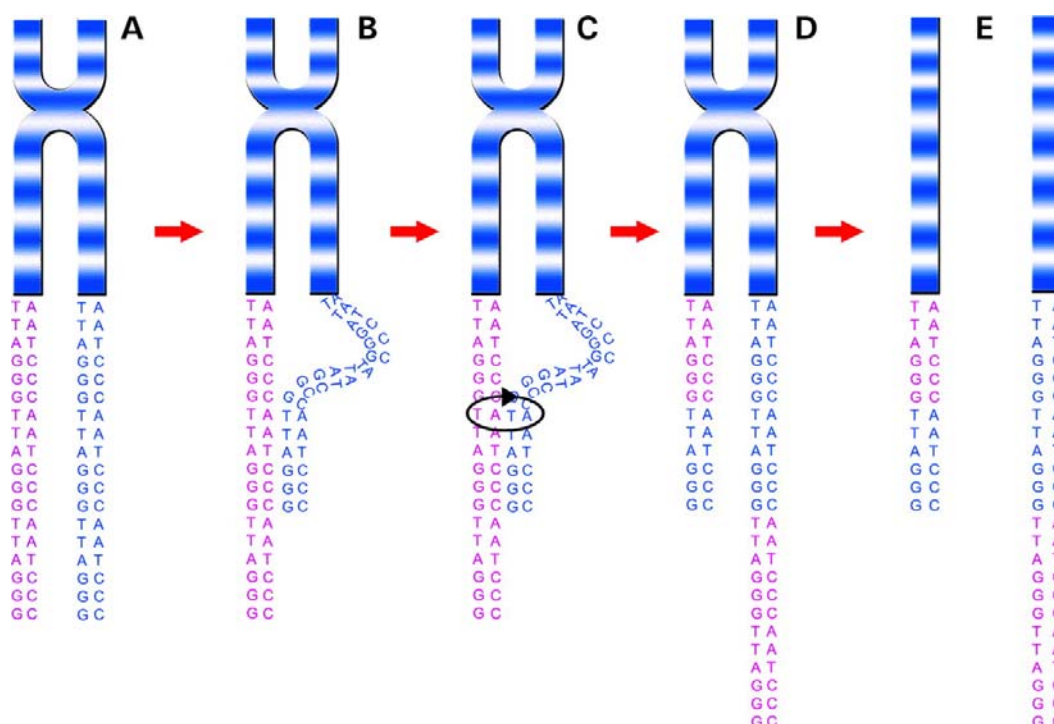


Figure 13: Mécanisme d'élongation alternatif des télomères (ALT) proposé par Reddel. (Selon Muntoni et Reddel, 2005)

En somme, les télomères jouent le rôle d'horloge mitotique dans la majorité des cellules somatiques. À cause de l'incapacité de la machinerie cellulaire à synthétiser l'extrémité des télomères, ces derniers raccourcissent jusqu'à une longueur minimale où les cellules reconnaissent les télomères comme étant dysfonctionnels et entrent alors en sénescence répllicative. La longueur des télomères étant proportionnelle au potentiel réplcatif des cellules, ils constituent un bon biomarqueur du vieillissement cellulaire.

En plus de la télomérase et du mécanisme d'élongation alternatif des télomères qui allongent les télomères et leur confèrent un potentiel répliatif illimité, leur intégrité est principalement maintenue par le complexe *shelterin* composé de plusieurs protéines qui leurs sont associées. Toutefois, en endommageant directement les télomères ou bien le complexe *shelterin*, différentes sources de stress peuvent altérer l'intégrité des télomères et entraîner leur dysfonction et la sénescence, et ce, même s'ils n'ont pas atteint leur longueur minimale. Parmi ces agents stressants, les radicaux libres constituent un ennemi de premier plan pour les télomères.

1.5. Les radicaux libres

Les substances réactives oxygénées (*Reactive Oxygen Species*, ROS) et azotées (*Reactive Nitrogen Species*, RNS) sont des produits d'un métabolisme cellulaire normal. Lorsque l'équilibre entre leur production et leur dégradation est bien contrôlé, les ROS et les RNS en concentrations normales possèdent des effets bénéfiques pour l'organisme, jouant divers rôles physiologiques. À l'opposé, lorsqu'il y a un déséquilibre résultant d'une augmentation de la production ou une diminution de leur dégradation, on parle alors de stress oxydant ou de stress azoté. Ces sources de stress physiologique peuvent engendrer plusieurs complications altérant différents systèmes de l'organisme. Dans cette section, nous verrons les sources endogènes de stress, les fonctions physiologiques ainsi que les conséquences pathologiques associées aux ROS et RNS.

1.5.1 Les sources endogènes de radicaux libres

Les radicaux libres sont définis comme étant des molécules contenant un électron ou plus non apparié(s) à leur orbite (Halliwell 1999). La présence d'un électron libre confère à ces molécules une grande instabilité et la possibilité de réagir de manière non-spécifique avec de nombreux composés. Les ROS représentent la plus importante classe d'espèces réactives générées dans les organismes vivants à cause de l'importance de leur métabolisme aérobie (Valko, Leibfritz et al. 2007). En effet, la respiration cellulaire survenant dans les mitochondries produit de grandes quantités d'anions superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) (Cadenas and Sies 1998). L' $O_2^{\bullet-}$ peut ensuite former d'autres ROS tels que le radical hydroxyl (OH^{\bullet}) ou être transformé par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Certaines molécules dérivées de l'azote peuvent également être réactives comme le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) et le peroxynitrite ($ONOO^-$).

Les radicaux libres régulant plusieurs fonctions physiologiques, divers systèmes enzymatiques génèrent des ROS et des RNS dans pratiquement tous les types cellulaires. Les principaux sont la xanthine oxydase, le cytochrome P450, la NADPH oxydase, les cyclooxygénases et lipooxygénases ainsi que les synthèses du NO (Figure 14) (Fortuno, San Jose et al. 2005).

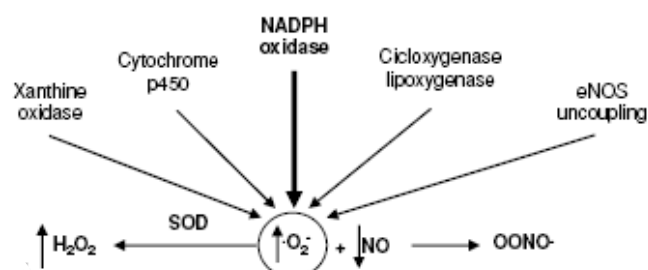


Figure 14: Source d'espèces réactives oxygénées et azotées (Adapté de Fortuno et al. 2005)

1.5.2. Les fonctions physiologiques des radicaux libres

1.5.2.1. Signalisation intracellulaire

Les cellules communiquent entre elles et répondent aux stimuli extracellulaires à l'aide de mécanismes biologiques appelés cascade de signalisation ou transduction cellulaire. Ces processus déclenchent ensuite une grande variété de fonctions biologiques comme la contraction musculaire, la croissance cellulaire et la transmission nerveuse (Thannickal and Fanburg 2000). Différents types cellulaires présentent une légère et rapide augmentation de faibles quantités de radicaux libres lorsque stimulés par des cytokines, hormones et facteurs de croissance et l'Ang II (Thannickal and Fanburg 2000). D'autres études ont suggéré que l'initiation et/ou le fonctionnement adéquat de certaines cascades de transduction s'appuyaient sur l'action des ROS en tant que molécules de signalisation comme telles à différents niveaux (Lowenstein, Dinerman et al. 1994; Storz 2005). La principale voie de signalisation affectée par les ROS serait la voie de la protéine kinase activée par les agents mitogéniques (*Mitogen-Activated Protein Kinase*, MAPK) (Sun and Oberley 1996). Finalement, plusieurs facteurs de transcription tels que NF- κ B, AP-1, p53 et le facteur hypoxique HIF-1, sont activés par les ROS (Pande and Ramos 2005; Valko, Leibfritz et al. 2007). Ils contribuent donc à ces voies de signalisation, nécessaires au développement et à la croissance physiologique de l'organisme, à de faibles concentrations.

1.5.2.2. La défense immunitaire

De fortes augmentations des niveaux de radicaux libres sont caractéristiques d'un environnement inflammatoire et jouent un rôle prépondérant dans la défense immunitaire. En effet, lors de l'inflammation, les neutrophiles et macrophages sont capables de reconnaître un agent pathogène et de produire de grandes quantités d' $O_2^{\bullet-}$ et autres ROS par l'entremise de la NADPH oxydase phagocytaire (Keisari, Braun et al. 1983). En parallèle avec l'augmentation de la production de H_2O_2 dans les péroxysomes, cette forte augmentation de l' $O_2^{\bullet-}$ génère des concentrations de radicaux libres importantes permettant la destruction de ces agents pathogènes (Decoursey and Ligeti 2005). Par ailleurs, la réponse lymphocytaire est également régulée par l'environnement rédox. L'activation des lymphocytes T par un antigène pathogène est significativement accentuée en présence de ROS (Los, Droge et al. 1995). Les leucocytes expriment également l'isoforme inductible de la NOS (iNOS), expression qui est, en partie, contrôlée par des facteurs de transcription sensibles au ROS tels que le NF- κ B et AP-1 (Valko, Leibfritz et al. 2007). De la même manière que les lymphocytes T, la iNOS stimulée par des cytokines produit des quantités toxiques de NO^{\bullet} . Ainsi, plusieurs évidences établissent un lien direct entre l'environnement rédox et la fonction immunitaire.

1.5.2.3. Le contrôle du tonus vasomoteur

Dans les vaisseaux sanguins, les ROS peuvent être produits tant par les cellules musculaires lisses que par les cellules endothéliales. L'impact des ROS au niveau du tonus vasomoteur a donc été étudié par différents groupes. Les espèces réactives

oxygénées semblent avoir à la fois un effet contractant et relaxant selon le lit vasculaire et le type de molécules. Par exemple, le H₂O₂ cause une vasodilatation des artères cérébrales (Drouin, Thorin-Trescases et al. 2007), coronariennes (Yada, Shimokawa et al. 2003), mésentériques et pulmonaires (Somers and Harrison 1999) et s'apparente à un EDRF. À l'inverse, dans les aortes de rat, la vasoconstriction induite par l'Ang II est dépendante du H₂O₂ (Torrecillas, Boyano-Adanez et al. 2001; Drouin, Thorin-Trescases et al. 2007), tandis qu'elle est indépendante du stress oxydant chez les humains et les porcs (Schuijt, Tom et al. 2003; Touyz, Cruzado et al. 2003). Par ailleurs, d'autres groupes ont montré que l'isoforme soluble de la guanylate cyclase (GCs) peut être activée à la fois par le H₂O₂ et le NO[•] (Ignarro and Kadowitz 1985; Wolin, Burke-Wolin et al. 1999; Drouin, Thorin-Trescases et al. 2007). La GCs produit le GMPc qui est capable de moduler la fonction de diverses molécules comme certaines protéines kinases, des canaux ioniques et d'autres cibles impliquées dans la régulation du tonus des cellules musculaires lisses vasculaires (Drouin, Thorin-Trescases et al. 2007; Valko, Leibfritz et al. 2007).

1.5.2.4. L'apoptose

L'apoptose est un processus nécessaire au développement adéquat de l'organisme. Elle permet notamment de détruire les cellules endommagées qui peuvent représenter une menace à l'intégrité des tissus. Le déclenchement de l'apoptose est basé sur la balance entre l'absence de signaux favorisant la croissance et la présence de signaux négatifs. Ces derniers éléments déclencheurs peuvent être de diverses origines comme des dommages moléculaires irréversibles et des niveaux élevés de radicaux libres (Hengartner 2000). En effet, lors de l'apoptose, la production de ROS est

significativement augmentée (Hockenbery, Oltvai et al. 1993; Banki, Hutter et al. 1999; Esteve, Mompo et al. 1999). Par ailleurs, d'autres groupes ont montré que les ROS produits en réponse au TNF α peuvent aussi provoquer l'apoptose (Schulze-Osthoff, Bakker et al. 1992; Hennet, Richter et al. 1993).

1.5.2.5. L'adhésion cellulaire

L'adhésion cellulaire joue un rôle prépondérant entre autres, dans l'embryogénèse, la croissance et la différenciation cellulaire ainsi que la réparation tissulaire. Plusieurs groupes ont révélé que les variations dans les propriétés adhésives des cellules composant les tissus étaient intimement liées à l'environnement rédox. Par exemple, l'expression de certaines molécules d'adhésion peut être stimulée par des lipopolysaccharides bactériens et autres cytokines telles que le TNF α , IL-1 et IL-1 β (Albelda, Smith et al. 1994; Frenette and Wagner 1996). De plus, l'adhésion des leukocytes aux cellules endothéliales durant le processus inflammatoire passerait par les ROS. En effet, les radicaux libres peuvent activer la protéine kinase C (Konishi, Tanaka et al. 1997) qui peut à son tour phosphoryler la protéine pp125^{FAK} endothéliale (Haimovich, Kaneshiki et al. 1996), une tyrosine kinase impliquée dans la régulation oxydative du processus d'adhésion (Schaller, Borgman et al. 1992).

1.5.3. Le stress oxydant et ses conséquences pathologiques

À faibles concentrations, les radicaux libres régulent diverses fonctions physiologiques. Cependant, ces mêmes radicaux libres peuvent devenir néfastes pour les cellules lorsque leur production est augmentée par différentes sources endogènes

et/ou exogènes, ou bien lorsqu'associée à une défense antioxydante endogène déficiente (Valko, Rhodes et al. 2006). À des niveaux élevés de radicaux libres, le stress oxydant engendre des altérations au niveau de la structure cellulaire et moléculaire, dérègle les fonctions physiologiques et favorise ainsi le développement de conditions physiopathologiques telles que le vieillissement, les maladies cardiovasculaires, le diabète et le cancer.

1.5.3.1. Les dommages cellulaires et moléculaires

À de fortes concentrations, dites pathologiques, les ROS peuvent s'avérer d'importants médiateurs de dommages aux protéines et lipides cellulaires ainsi qu'aux acides nucléiques (Valko, Rhodes et al. 2006). Par exemple, le radical hydroxyl (OH^\bullet) est connu comme pouvant réagir avec toutes les composantes de la molécule d'ADN, endommageant tant les purines, les pyrimidines que le squelette désoxyribose (Halliwell 1999). Ceci provoque des lésions moléculaires double ou simple brin pouvant être révélées par différents marqueurs comme le 8-OH-dG (8-hydroxydeoxyguanosine). Cette modification oxydative permanente du matériel génétique représente la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogénèse et le vieillissement (Valko, Izakovic et al. 2004). Parallèlement, les ROS peuvent s'attaquer plus précisément aux télomères. En effet, le groupe de von Zglinicki *et al.* a révélé que le triplet « GGG » composant l'hémamaxère télomérique était particulièrement sensible au stress oxydant (von Zglinicki 2002; Richter and von Zglinicki 2007). Les radicaux libres fragilisent donc les télomères et accélèrent le taux de raccourcissement des télomères, augmentant la longueur de la séquence télomérique non répliquée à chaque division cellulaire. Ceci mène donc ultimement à une accélération de l'horloge

mitotique des cellules. Par exemple, le groupe de Lansdorp a montré que le taux de raccourcissement des télomères de fibroblastes cultivés *in vitro* était augmenté et la sénescence était accélérée en présence de H₂O₂ exogène. En utilisant un antioxydant, il a observé que le taux de raccourcissement des télomères se rapprochaient de celui retrouvé dans les fibroblastes contrôles, non traités avec H₂O₂ (Tchirkov and Lansdorp 2003).

Les ROS ne s'attaquent pas uniquement à l'ADN mais peuvent également affecter d'autres composantes cellulaires telles que les acides gras polyinsaturés, résidus des phospholipides membranaires. En effet, le stress oxydant est responsable de l'oxydation des LDL circulantes, abondantes chez les individus hypercholestérolémiques. Les LDL oxydées stimulent par la suite un processus inflammatoire propice au développement de l'athérosclérose (Quinn, Parthasarathy et al. 1987; McMurray, Parthasarathy et al. 1993). De plus, cette oxydation des phospholipides provoque la formation de radicaux peroxy (ROO[•]) qui sont transformés finalement en malondialdéhyde (MDA), composé mutagénique chez les humains (Fedtke, Boucheron et al. 1990; Fink, Reddy et al. 1997; Mao, Schnetz-Boutaud et al. 1999). Un autre produit aldéhyde de la peroxydation des lipides membranaires est le 4-hydroxyl-2-nonenal (HNE), molécule capable d'altérer la fonction cellulaire comme par exemple de réprimer certaines cyclines (Pizzimenti, Barrera et al. 1999), le facteur de transcription *c-myc* (Pizzimenti, Barrera et al. 1999; Siems and Grune 2003; Pizzimenti, Briatore et al. 2006) et la TERT (Pizzimenti, Briatore et al. 2006). De plus, un autre composé serait impliqué dans la production excessive de stress oxydant en conditions physiopathologiques. Les AGEs sont des

produits très instables de la glycation non-enzymatique et de l'oxydation de protéines et de lipides (Dalle-Donne, Scaloni et al. 2005). Ces molécules, en se liant sur leur récepteur (RAGEs) peuvent stimuler un processus inflammatoire et une plus grande production de stress oxydant par l'entremise de l'activation de la NADPH (Ramasamy, Vannucci et al. 2005).

Finalement, l'espèce réactive oxygénée dérivée du monoxyde d'azote (NO^\bullet) peut également provoquer des modifications post-transcriptionnelles des protéines *via* une réaction appelée la S-nitrosylation (Ischiropoulos 1998; Ischiropoulos 2003; Gow, Farkouh et al. 2004). Ceci se produit lorsque le radical NO^\bullet réagit avec l'oxygène (O_2) pour former l'intermédiaire NO_2 . Cette dernière molécule réagit avec le NO^\bullet pour former finalement du N_2O_3 , l'agent responsable de la nitrosylation de résidus cystéines des protéines (Wink, Nims et al. 1994; Kharitonov, Sundquist et al. 1995; Handy and Loscalzo 2006). Ainsi, il a été suggéré que cette réaction puisse survenir autant dans des conditions physiologiques que pathologiques, étant réversible selon la concentrations de NO^\bullet présente (Wink, Darbyshire et al. 1993; Nedospasov, Rafikov et al. 2000). De plus, il semble également que cette réaction soit reliée à l'environnement rédox, des études ayant démontré une diminution de la S-nitrosylation de protéines en présence d'acide ascorbique (vitamine C), un antioxydant (Bryan, Rassaf et al. 2004; Yang and Loscalzo 2005). Plusieurs effets biologiques ont été associés lorsque cette réaction affecte certaines protéines. Par exemple, une S-nitrosylation de résidus cystéines d'une sous-unité du facteur NF- κ B diminue son activité transcriptionnelle (Grumbach, Chen et al. 2005; Handy and Loscalzo 2006), tandis qu'elle stimule l'activité antioxydante de la thioredoxine (Haendeler, Hoffmann et al. 2002;

Haendeler, Hoffmann et al. 2004). De plus, la S-nitrosylation entrerait également dans la régulation de l'activité de la eNOS. En effet, dans les cellules endothéliales, l'activité de la eNOS et la S-nitrosylation présentent un profil dynamique inverse : lorsque la eNOS est inactive, certains résidus cystéines sont S-nitrosylés tandis qu'une activation de la eNOS est associée à une perte de cette S-nitrosylation (Ravi, Brennan et al. 2004; Erwin, Lin et al. 2005; Mitchell, Erwin et al. 2005). Ainsi, cette réaction de S-nitrosylation pourrait, dans certains cas, servir de mécanisme de rétroaction afin de moduler l'activité de diverses protéines.

1.5.3.2. Les pathologies associées au stress oxydant

1.5.3.2.1. Les facteurs de risque cardiovasculaire

Tel que mentionné ci-haut, pratiquement tous les facteurs de risque cardiovasculaire sont causés ou associés à une augmentation du stress oxydant. Par exemple, les ROS participent à la formation des AGEs, à l'oxydation des LDL et à la dysfonction endothéliale, spécialement chez les fumeurs, conditions qui prédisposent fortement à l'athérogénèse.

Les ROS sont également responsables de changements dans la perméabilité membranaire, la disruption de la bicouche de lipides membranaires et de modifications fonctionnelles de plusieurs protéines cellulaires. Par exemple, le stress oxydant est connu pour augmenter la concentration de calcium intracellulaire (Perez, Gao et al. 1998). Cette augmentation de Ca^{2+} semble être un dénominateur commun dans le développement d'arythmie, d'hyperplasie néointimale (athérosclérose), de vasoconstriction (hypertension), dans la genèse de dommages aux cellules

myocardiques (ischémie-reperfusion) ainsi qu'à l'hypertrophie ventriculaire (insuffisance cardiaque) (Valko, Leibfritz et al. 2007).

Par ailleurs, les cellules bêta du pancréas synthétisant habituellement l'insuline, sont extrêmement sensibles au stress oxydant étant donné qu'elles expriment faiblement les enzymes responsables des défenses antioxydantes endogènes, accentuant par le fait même la dysfonction pancréatique observée dans le diabète (Valko, Leibfritz et al. 2007). De plus, l'augmentation du stress oxydant associée au diabète a été soupçonnée comme étant une des causes de rétinopathie (Fukami, Yamagishi et al. 2008; Sugimoto, Yasujima et al. 2008; Yamagishi, Ueda et al. 2008), de neuropathie (Sugimoto, Yasujima et al. 2008) et de néphropathie (Fukami, Yamagishi et al. 2008) engendrées par l'hyperglycémie.

Dans des conditions physiologiques, 1-3% des molécules d'oxygène dans les mitochondries sont transformées en anions superoxyde (Valko, Leibfritz et al. 2007). Le site de prédilection pour les dommages oxydatifs causés par l' $O_2^{\bullet-}$ est donc l'ADN mitochondrial (Cadenas and Davies 2000). Le groupe de Halliwell *et al.* a révélé une corrélation entre la consommation métabolique en oxygène et l'âge. Par exemple, les animaux plus imposants consomment moins d'oxygène par unité de poids corporel, possèdent des défenses antioxydantes plus efficaces et vivent plus longtemps que les animaux plus petits (Halliwell 1999). De plus, d'autres études ont observé que les dommages moléculaires (8-OH-dG) augmentaient avec le vieillissement, tant au niveau génomique que mitochondrial, et que ceci corrélait avec une accélération du taux de raccourcissement des télomères (Barnett and King 1995; King and Barnett 1995).

1.5.3.2.2 Le cancer

Les ROS peuvent également intervenir dans les processus néoplasiques, puisqu'ils peuvent causer des lésions à l'ADN. Lorsque la cellule possède des mécanismes de réparation moléculaire efficaces, ces dommages peuvent être réparés. Cependant, si ces mécanismes sont inadéquats et/ou si les lésions moléculaires dépassent la capacité réparatrice des cellules, les dommages à l'ADN, mutations et altérations de l'expression de certains gènes engendrés semblent s'avérer être le dénominateur commun dans le développement de cellules tumorales. Le stress oxydant jouerait donc un rôle prépondérant dans ce processus. (Valko, Izakovic et al. 2004; Valko, Morris et al. 2005; Valko, Rhodes et al. 2006). Par exemple, la fumée de cigarette, un agent carcinogène et source de ROS bien connu, augmente de plus de 30% l'excrétion urinaire de 8-OH-G, un indicateur de dommages à l'ADN causés par le stress oxydant (Loft and Poulsen 1996). Par ailleurs, certaines études ont établi un lien entre les fonctions de signalisation des ROS et le développement de cellules tumorales. En effet, le stress oxydant possède la capacité d'activer certains facteurs transcriptionnels tels que AP-1 et NF- κ B impliqués dans l'expression de molécules anti-apoptotiques et favorisant la prolifération cellulaire, caractéristiques typiques des cellules tumorales (Storz 2005; Valko, Rhodes et al. 2006).

En résumé, en concentrations physiologiques, l'importance des radicaux libres est cruciale pour plusieurs fonctions physiologiques telles que la signalisation intracellulaire, le contrôle vasomoteur et l'adhésion cellulaire. À des concentrations contrôlées, les radicaux libres ont la capacité d'induire l'apoptose de cellules

endommagées et jouent un rôle dans la défense immunitaire de l'organisme. Toutefois, lorsque leur production devient incontrôlée, le stress oxydant engendré endommage les structures cellulaires et moléculaires de cellules encore saines jusque là. Ceci peut favoriser le développement de processus physiopathologiques comme le vieillissement, le diabète, les maladies cardiovasculaires ainsi que le cancer. Afin de contrecarrer ces complications, les cellules se sont pourvues de défenses antioxydantes permettant d'équilibrer le mieux possible, les niveaux de radicaux libres.

1.6. Les antioxydants

L'exposition aux radicaux libres provenant de différentes sources a mené l'organisme à développer une série de mécanismes de défense (Cadenas 1997). Il existe deux grandes classes d'antioxydants endogènes, les antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques (Cadenas 1997). Dans des conditions physiologiques, il existe une balance entre l'activité des antioxydants endogènes et les molécules générant des radicaux libres, contrôlant ainsi les niveaux de ROS. Cependant, dans des conditions pathologiques, cet équilibre est altéré. Afin de rétablir cet environnement rédox, certaines molécules exogènes antioxydantes ont également été utilisées comme les polyphénols, le *N*-acétyl-*L*-cystéine ainsi que les statines, des agents hypolipidémiant possédant également des propriétés antioxydantes.

1.6.1. Les antioxydants endogènes

1.6.1.1. Les antioxydants enzymatiques

Les molécules antioxydantes enzymatiques comprennent la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathione peroxydase (GPx) (Valko, Leibfritz et al. 2007). La SOD catalyse la dismutation d'un électron de l' $O_2^{\bullet-}$ en une molécule de H_2O_2 et une d' O_2 (McCord and Fridovich 1969). Le peroxyde d'hydrogène ainsi produit pourrait être néfaste, mais la catalase se charge par la suite de dégrader le H_2O_2 en eau et oxygène (Chaudiere and Ferrari-Iliou 1999). Il a même été suggéré que la NADPH oxydase normalement chargée de produire de l'anion superoxyde, se lierait à la catalase afin de réguler l'équilibre rédox (Kirkman, Galiano et al. 1987). Finalement, la GPx dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau et les hydroperoxydes organiques en alcool (Flohe, Gunzler et al. 1973). Elle est la principale défense antioxydante dans les cellules endothéliales (Chaudiere and Ferrari-Iliou 1999).

1.6.1.2. Les antioxydants non-enzymatiques

Les antioxydants non-enzymatiques incluent l'acide ascorbique (vitamine C), l' α -tocophérol (vitamine E), la glutathione (GSH), les caroténoïdes et les flavonoïdes. La glutathione, un chélateur hydrophilique direct retrouvé dans pratiquement tous les compartiments cellulaires, constitue un cofacteur pour la GPx et permet de régénérer les vitamines C et E dans leur forme active (Masella, Di Benedetto et al. 2005). La vitamine E est le chélateur le plus efficace afin de contrecarrer les radicaux peroxy dans la bicouche de phospholipides membranaires. Cependant, un des produits finaux

de l' α -tocophérol (LOOH) est réactif et doit par la suite, être neutralisé par la glutathion peroxydase (Chaudiere and Ferrari-Iliou 1999).

1.6.2. Les antioxydants exogènes

1.6.2.1. Les polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal (Fraga 2007). Ils sont caractérisés, comme l'indique leur nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes. Ces composés sont les produits du métabolisme secondaire des plantes (Fraga 2007). Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment à cause de leurs effets bénéfiques sur la santé. En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer (Chen, Daniel et al. 2004), des maladies inflammatoires (Laughton, Evans et al. 1991; Frankel, Kanner et al. 1993; Orgogozo, Dartigues et al. 1997; Chen, Daniel et al. 2004)), cardiovasculaires (Frankel, Kanner et al. 1993) et neurodégénératives (Orgogozo, Dartigues et al. 1997). Les polyphénols sont présents dans diverses substances naturelles : sous forme d'anthocyanine dans les fruits rouges, le vin rouge, sous forme de flavonoïdes dans les agrumes, et sous forme de catéchines dans le thé vert (D'Archivio, Filesi et al. 2007; Fraga 2007).

1.6.2.2. Le *N*-acétyl-*L*-cystéine

Le *N*-acétyl-*L*-cystéine (NAC) est une molécule pharmacologique antioxydante possédant un groupement thiol et se rapprochant des composés endogènes tels que la

glutathione (Zafarullah, Li et al. 2003). Plusieurs vertus sont attribuées au NAC. Premièrement, il neutralise directement le OH^\bullet et le H_2O_2 sans toutefois avoir d'effet direct sur l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Aruoma, Halliwell et al. 1989). Le NAC est également capable de régénérer les concentrations intracellulaires de GSH et, indirectement, de GPx (Moldeus, Cotgreave et al. 1986). Parallèlement, certaines études ont montré des effets anti-inflammatoires du NAC. En effet, le *N*-acétyl-*L*-cystéine peut inhiber l'activation du facteur NF- κ B induite par divers stimuli comme l'IL-1, le $\text{TNF}\alpha$ et le H_2O_2 , diminuant par le fait même les molécules qui lui sont rattachées (VCAM-1, ICAM-1, IL-6 et IL-8) (Schmidt, Hori et al. 1995; Sato, Miyazaki et al. 1996; Zafarullah, Li et al. 2003). De plus, tel que mentionné auparavant, le stress oxydant peut activer la voie du p38 MAPK (Yoon, Yun et al. 2002; Colavitti and Finkel 2005; Zdanov, Debaq-Chainiaux et al. 2006; Dolado, Swat et al. 2007; Han and Sun 2007) et induire l'arrêt de la croissance cellulaire en activant les protéines inhibitrices du cycle cellulaire p16, p27, p21 et p53 (Lin, Barradas et al. 1998; Wang, Chen et al. 2002; Iwasa, Han et al. 2003; Colavitti and Finkel 2005; Han and Sun 2007). Ainsi, d'autres études ont montré qu'un traitement avec NAC pouvait prévenir cette activation de p38 MAPK et favoriser la division cellulaire (Hsieh and Papaconstantinou 2006; Ramos, Fernandez et al. 2006; Probin, Wang et al. 2007; Chen, Liu et al. 2008). Toutefois, à fortes concentrations, le NAC peut s'avérer toxique, induisant la mort cellulaire par apoptose (Zafarullah, Li et al. 2003). Cliniquement, le NAC est utilisé *in vivo* entre autres, comme antidote contre l'empoisonnement à l'acétaminophène et à l'arsenic (Hirano, Kobayashi et al. 2004), comme médicament contre l'angine de poitrine et pour augmenter les effets des nitrates (Sochman 2002; Hirano, Kobayashi et al. 2004).

1.6.2.3. Les statines

Les statines (ou inhibiteurs de la HMG-CoA réductase) forment une classe d'hypolipémiants, utilisés comme médicaments pour baisser l'hypercholestérolémie des personnes à risque de maladies cardiovasculaires. Plusieurs études ont également démontré des effets antioxydants des statines. Cette classe d'agents pharmacologiques possède la capacité de neutraliser directement certains radicaux libres, bien que leurs efficacités diffèrent selon le type de statines et de ROS. Par exemple, la fluvastatine présente la meilleure défense contre les radicaux peroxy tandis que la simvastatine s'avère plus efficace contre les radicaux hydroxyl (Franzoni, Quinones-Galvan et al. 2003). Cependant, les effets antioxydants des statines sont également dus à leur capacité à inhiber l'activité de certaines sources de productions de ROS telles que la NADPH oxydase (Delbosc, Morena et al. 2002; Davignon, Jacob et al. 2004) et à activer certaines enzymes antioxydantes endogènes comme la catalase, la superoxyde dismutase et la glutathione peroxydase (Wassmann, Laufs et al. 2001; Wassmann, Laufs et al. 2002; Perez-Guerrero, Alvarez de Sotomayor et al. 2003).

Ainsi, l'organisme s'est pourvu de défenses antioxydantes endogènes qui permettent de contrôler les niveaux des divers radicaux libres générés par le métabolisme aérobie des cellules. Dans des conditions physiologiques, ces antioxydants intrinsèques permettent d'ajuster un certain équilibre en la production de radicaux libres et leur élimination. Par contre, dans certaines conditions pathologiques, leurs activités ne suffisent pas à éliminer la production excessive de ROS ce qui mène au stress oxydant et aux complications physiopathologiques associées comme le vieillissement et les maladies cardiovasculaires. Plusieurs alternatives

pharmacologiques ont donc été utilisées afin de contrecarrer cette surproduction de ROS.

1.7. Modèles expérimentaux de vieillissement

Certaines maladies, appelés globalement « syndromes de progérie », présentent diverses caractéristiques d'un vieillissement prématuré chez les humains mais diffèrent sur certains aspects. Quelques mécanismes ont été suggérés comme étant responsables des syndromes de progérie. Parmi ceux-ci, les syndromes de Werner, de Bloom, de Rothmund-Thompson et de Cockayne seraient causés par une altération des mécanismes de réparation de l'ADN (Martin and Oshima 2000; Hickson 2003; Andressoo and Hoeijmakers 2005). Le syndrome de Hutchinson-Gilford, la dermatopathie restrictive, la dysplasie mandibulaire ainsi qu'une forme atypique du syndrome de Werner seraient quant à eux, le résultat d'une aberration dans la production d'une lamine nucléaire (Novelli, Muchir et al. 2002; Maraldi, Squarzoni et al. 2005; Navarro, Cadinanos et al. 2005; Jacob and Garg 2006). Une forme de progérie atypique des deux premières est l'ataxie télangiectasie (AT) qui est un vieillissement prématuré provoqué par une mutation d'une protéine kinase (Lavin and Shiloh 1997). Finalement, la dyskératosis congenita serait le résultat d'une dysfonction des molécules d'ARN ainsi que de la télomérase (Heiss, Knight et al. 1998). Cependant, malgré les limitations qui démarquent les syndromes de progéria du vieillissement normal, de nombreuses études dérivées d'approches génétiques, chez les humains et modèles animaux, ont révélé des mécanismes qui pourraient être transposés au vieillissement physiologique.

1.7.1. Syndrome de Werner

Le syndrome de Werner est une pathologie autosomale récessive rare, caractérisée par une instabilité génomique et un développement prématuré de plusieurs maladies normalement associées au vieillissement comme le cancer et l'athérosclérose. Le gène responsable, *Wrn*, code pour une protéine possédant un domaine exonucléase 3' et un domaine similaire aux RecQ hélicases de l'ADN (Epstein, Martin et al. 1966; Lebel 2001). Les études sur des modèles animaux et des patients portant une mutation du gène *Wrn* ont révélé que les cellules affectées présentaient une diminution du potentiel réplicatif ainsi qu'une accélération de l'induction de la sénescence induite par les télomères (Salk, Bryant et al. 1981; Faragher, Kill et al. 1993; Schulz, Zakian et al. 1996; Tahara, Tokutake et al. 1997). Au contraire, différents groupes ont également démontré que les cellules arrêtaient de se diviser avec des télomères longs et qu'une surexpression de la sous-unité catalytique de la télomérase (TERT) pouvait prévenir cette sénescence (Tahara, Tokutake et al. 1997; Wyllie, Jones et al. 2000). Plusieurs évidences montrent que la protéine codée par *Wrn* serait impliquée dans la réparation des structures moléculaires aberrantes qui surviennent durant la réplication et la transcription de l'ADN. Certaines études ont observé que les cellules Werner n'étaient sensibles qu'à deux classes d'agents endommageant l'ADN, les inhibiteurs de la topoisomérase et la molécule 4-nitroquinoline 1-oxyde (Monnat 1992; Sargent, Brenneman et al. 1997). Les inhibiteurs de la topoisomérase (etoposide et camptothécine) produisent des cassures à l'ADN qui ne peuvent être réparées (Wang 1985) tandis que l'agent 4-nitroquinoline 1-oxyde est une molécule pro-carcinogène pouvant induire la production de stress oxydant et les dommages moléculaires associés

(Nunoshiba and Demple 1993). Parallèlement, les cellules Werner semblent plus sensibles au stress oxydant généré par les radiations γ , mais pas par les radiations elles-mêmes (Lebel 2001) suggérant que le gène *Wrn* serait impliqué dans une résolution sélective de structures moléculaires inhabituelles qui émergent seulement dans certaines conditions cellulaires. L'absence d'un gène *Wrn* fonctionnel serait donc associée à une recombinaison inefficace durant la réparation des cassures à l'ADN, créant de légères délétions génétiques ou translocations chromosomiques pouvant expliquer les phénotypes de vieillissement accéléré et de cancer souvent attribués au syndrome de Werner. De plus, il a été rapporté que les cellules isolées à partir de souris *Wrn*^{-/-} présentent une diminution de leur potentiel réplicatif et que ces souris *Wrn*^{-/-} présentent des signes de dysfonction cardiovasculaire (fibrose cardiaque, sténose aortique, diminution de la pression diastolique) ainsi qu'une augmentation de la production de stress oxydant (Lebel, Lavoie et al. 2003; Massip, Garand et al. 2006)

1.7.2. Syndrome Hutchinson-Gilford

Le syndrome de Hutchinson-Gilford (HG), simplement appelé progérie, est une maladie génétique qui provoque des changements physiques qui semblent fortement causés par une sénescence cellulaire accélérée (Hennekam 2006). Elle se manifeste par une croissance retardée, une alopécie et une morphologie de la face caractéristique, marquée par sa petitesse. En évoluant, la maladie cause un vieillissement accéléré de la peau, l'athérosclérose, une ostéolyse des clavicules et des phalanges, et des problèmes cardiovasculaires causant la mort habituellement entre 13 et 16 ans (Hennekam 2006). L'étiologie du syndrome de Hutchinson-Gilford est complexe mais les études

convergent vers une mutation dans le gène *LMNA* codant la lamine A, une protéine structurale de la matrice nucléaire (De Sandre-Giovannoli, Bernard et al. 2003; Eriksson, Brown et al. 2003). Dans la forme mutée, la lamine A défectueuse forme une protéine appelée « progérine » qui entraîne la déformation de la membrane nucléaire et l'adhésion de la chromatine à cette dernière (Figure 15) (Scaffidi, Gordon et al. 2005; Ramirez, Cadinanos et al. 2007). L'accumulation de progérine à l'enveloppe nucléaire est suggérée comme étant la principale cause de déformation nucléaire et de stress à la chromatine menant à la mort cellulaire (Goldman, Shumaker et al. 2004). Cette déformation est également retrouvée dans d'autres modèles de vieillissement prématuré, par exemple, les fibroblastes isolés de souris *Zmpste24*, un modèle de HG, sont plus sensibles aux agents endommageant l'ADN et présentent un recrutement déficient de la protéine 53BP1,

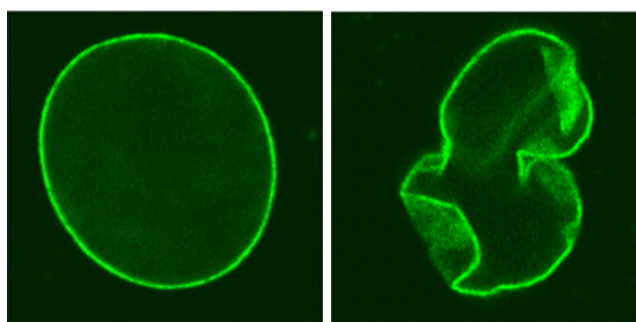


Figure 15: Déformation de l'enveloppe nucléaire associée au syndrome de Hutchinson-Gilford. (Selon Scaffidi *et al.* 2005).

menant à une déféctuosité dans la réparation moléculaire (Liu, Wang et al. 2005). Par ailleurs, ce même modèle a révélé une activation augmentée de p53 corrélant avec la sévérité du vieillissement accéléré (Campisi 2005). Cette augmentation serait associée à une prédisposition à la sénescence cellulaire, expliquant par le fait même pourquoi les individus atteints du syndrome HG ne développent pas de cancer (Varela,

Cadinanos et al. 2005). De plus, les travaux de Varga *et al.* utilisant un modèle de souris HG exprimant la progérine ont expliqué pourquoi les patients atteints du syndrome de Hutchinson-Gilford succombaient principalement à des complications cardiovasculaires. En effet, ils ont démontré que la progérine s'accumule principalement dans les noyaux de cellules musculaires lisses vasculaires et diminue leur nombre en plus de favoriser une calcification de la paroi vasculaire (Varga, Eriksson et al. 2006).

1.7.3. Ataxie télangiectasie

L'ataxie télangiectasie (AT), aussi connue sous le nom du syndrome de Louis-Bar, est un désordre autosomal récessif caractérisé par une dégénérescence cérébelleuse progressive causant une sévère ataxie, une vasodilatation des vaisseaux sanguins (télangiectasie), des troubles immunitaires, une augmentation des risques de développement du cancer et une hypersensibilité aux radiations et agents endommageant l'ADN (Lavin and Shiloh 1997; McKinnon 2004). La découverte d'une mutation sur un gène, *ATM* (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), par Savitsky *et al.* en 1995, insistait sur le rôle de l'instabilité génomique dans la prédisposition au cancer et au vieillissement accéléré (Savitsky, Bar-Shira et al. 1995). ATM est une protéine kinase agissant comme instigatrice des mécanismes de réparation moléculaire en réponse aux dommages à l'ADN (Guo, Deng et al. 2007). Plusieurs cibles d'ATM telles que p53, BRCA1, CHK2, NBS1 et FANCD2, sont toutes impliquées dans le maintien de l'intégrité génomique (Ramirez, Cadinanos et al. 2007). De plus, tel qu'expliqué auparavant, la protéine ATM est également liée à l'intégrité des télomères.

ATM jouerait donc un rôle de chef d'orchestre dans les réponses cellulaires associées aux dommages sévères à l'ADN, aiguillant la cellule touchée dans les voies de cancer ou de vieillissement. L'absence de la protéine ATM fonctionnelle dans l'ataxie télangiectasie explique ainsi les symptômes cliniques associés. Une meilleure étude de ce syndrome de vieillissement accéléré apporterait des informations importantes quant à l'implication de ATM dans la sénescence et le développement tumoral.

1.7.4. Dyskeratosis congenita

La dyskeratosis congenita (DC) est une maladie génétique rare liée au chromosome X et causée par une mutation du gène *Dkc1* (Heiss, Knight et al. 1998). Les individus touchés par cette pathologie présentent également des caractéristiques de vieillissement prématuré et une augmentation accrue de la susceptibilité à développer un cancer (Dokal 2000; Knight, Vulliamy et al. 2001). Les tissus les plus souvent touchés sont la moelle osseuse et la peau, tissus présentant un fort taux de divisions cellulaires (Ruggero, Grisendi et al. 2003).

Le gène *Dkc1* code pour la protéine dyskérine, une pseudo-uridine synthétase comprise dans un complexe de petit ARN nucléaire (*small nuclear RNA, snRNA*) et régulant la modification post-transcriptionnelle des ARN ribosomiaux (Ni, Tien et al. 1997). La dyskérine s'associe également avec la composante d'ARN de la télomérase (TR) (Mitchell, Wood et al. 1999). Les cellules dérivées de patients atteints de DC et de souris *Dkc1*^{-/-} présentent une activité de la télomérase diminuée ainsi que des télomères plus courts que les contrôles sains (Mitchell, Wood et al. 1999; Rudolph,

Chang et al. 1999; Ruggero, Grisendi et al. 2003). Cependant, cet effet ne toucherait que les tissus où les cellules possèdent initialement une activité endogène de la télomérase significative et donc, un fort taux de réplication comme par exemple les fibroblastes et les lymphoblastes (Marciniak, Johnson et al. 2000).

En somme, bien qu'ils diffèrent les uns des autres, les divers modèles de vieillissement prématuré décrits ci-dessus partagent tous un dénominateur commun: une instabilité moléculaire. Qu'elle soit causée par une altération au niveau de la machinerie responsable de la réparation de l'ADN, par une mauvaise conformation de la chromatine ou bien par une défectuosité de la télomérase, les cellules cessent dans chaque cas de se diviser. Ces problèmes, caractéristiques des syndromes de progérie, pourraient donc être directement responsables des symptômes et complications physiopathologiques associés au vieillissement. Bien que ces modèles expérimentaux n'ont pas permis encore d'élucider complètement tous les mécanismes responsables du vieillissement, ils fournissent néanmoins des pistes intéressantes à suivre, notamment des biomarqueurs potentiels pouvant être utilisés afin d'étudier le vieillissement *in vivo*.

1.8. Biomarqueurs potentiels du vieillissement

Comme l'âge s'avère un facteur de risque indépendant de plusieurs pathologies et que le vieillissement biologique diffère de l'âge chronologique, plusieurs groupes de recherche ont tenté d'établir des biomarqueurs du vieillissement. Ce type de biomarqueurs constitue un paramètre biologique qui prédirait, individuellement ou

jumelé à d'autres analyses multivariées, la capacité fonctionnelle d'un organisme à un stade avancé de la vie (Baker and Sprott 1988; Simm, Nass et al. 2008). Quatre critères ont été suggérés afin de caractériser ces biomarqueurs (Johnson 2006) : (1) Il doit prédire la vitesse de développement du vieillissement, à quel point se situe un individu au cours de sa vie; (2) Le biomarqueur devra être associé directement au vieillissement et non à un marqueur collatéral d'une pathologie; (3) Idéalement le paramètre devra être mesurable facilement, par prélèvement sanguin ou imagerie par exemple; (4) Finalement, aux fins de recherche, on devra retrouver ce marqueur dans différents espèces animales, tant chez les humains que les modèles animaux de laboratoire. Plusieurs paramètres ont été suggérés et seront décrits brièvement dans cette section (Tableau 1).

Tableau 1: Biomarqueurs potentiels du vieillissement (Selon Simm *et al.* 2008)

Underlying biological process	Possible biomarker	Change with age	Validated in studies		
			Cell culture/ animal	Human	
				Cross-sectional	Longitudinal
Oxidative stress	8-OHdG (DNA)	Increase	+	+	-
	MDA	Increase	+	+	-
	HNE	Increase	+	+	-
	oxLDL (lipide)	Increase	+	+	-
	Carbonyl groups (proteins)	Increase	+	-	-
Protein glycation	CML	Increase	+	+	-
	Pentosidine	Increase	+	+	-
Inflammation	IL-6	Increase	+	+	+
	CD4-positive CD8 T-cells	Increase	+	+	-
Replicative senescence	Senescence-associated β -Gal	Increase	+	-	-
	P16 ^{INK4a}	Increase	+	-	-
Telomeres	Telomere length	Decrease	+	+	-
Hormones	Growth hormone	Decrease	+	+	-
	IGF	Decrease	+	+	-
	DHEA	Decrease	+	+	+
	Oestrogen	Decrease	+	+	+
	Testosterone	Decrease	+	+	-

1.8.1. Les marqueurs de stress oxydant

Tel que décrit précédemment, Harman (1956) postula que le stress oxydant pouvait être une cause du vieillissement cellulaire. Un des principaux marqueurs de

dommages oxydatifs moléculaires est le 8-OH-dG, formé par l'oxydation de l'ADN. Par une méthylation, cette molécule peut altérer l'expression génique et induire une mutation, étant capable de convertir les bases GC en AT (Simm, Nass et al. 2008). Les niveaux de 8-OH-dG ont été inversement corrélés à l'espérance de vie chez les mammifères et sont plus élevés dans certaines maladies dégénératives telles que le Parkinson, le diabète, la fibrose kystique et la dystrophie musculaire (Lopez-Torres, Gredilla et al. 2002; Evans, Dizdaroglu et al. 2004). Le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), deux produits de la peroxydation des lipides ont également été retenus comme biomarqueurs. En effet, les concentrations sanguines de MDA et de HNE augmentent avec l'âge et sont plus élevées chez les patients diabétiques (Slatter, Bolton et al. 2000) et athérosclérotiques (Slatter, Bolton et al. 2000; Uchida 2003; Gil, Siems et al. 2006).

1.8.2. Les marqueurs de glycation protéique

La glycosylation des protéines par la réaction Maillard mène ultimement à la formation de AGEs (Simm, Nass et al. 2008). Comme les AGEs sont associés à plusieurs complications physiopathologiques, certains produits dérivés de ce processus ont été suggérés comme biomarqueurs potentiels. Parmi ceux-ci, la lysine carboxyméthyle (*CarboxyMethyl Lysine*, CML) semble représenter la modification principale de la réaction Maillard. L'accumulation de CML et de AGEs avec l'âge a été observée dans différents tissus comme les muscles, les cartillages et la peau (Dyer, Dunn et al. 1992; Schleicher, Wagner et al. 1997; Sato, Kondo et al. 2001; Haus, Carrithers et al. 2007). Le groupe de Sato *et al.* a même été capable d'estimer l'âge de

cadavres en mesurant les taux de AGEs dans l'hippocampe (Sato, Kondo et al. 2001). Finalement, des niveaux importants de AGEs ont également été quantifiés dans diverses maladies dégénératives comme l'athérosclérose, l'ostéoarthrite, le diabète, les rétinopathies et les néphropathies (Nakamura, Horii et al. 1993; Aso, Inukai et al. 2000; Wautier, Massin et al. 2003; DeGroot, Verzijl et al. 2004). Bien qu'il a été difficile de distinguer dans ces cas si ces niveaux de AGEs étaient dus à la maladie même ou bien au vieillissement, il est clair qu'un lien existe entre ces produits de glycation avancés et les complications physiopathologiques associées avec l'âge.

1.8.3. Les marqueurs d'inflammation

Des marqueurs d'inflammation ont été proposés comme biomarqueurs du vieillissement puisque que l'organisme est exposé tout au long de sa vie à des facteurs environnementaux comme des virus, bactéries et parasites et doit donc développer des défenses pour se protéger. Cette théorie est appelée « *inflamm-ageing* » (Simm, Nass et al. 2008). Le vieillissement serait en effet associé à une activation à la fois des systèmes immunitaires innés et acquis. Une diminution du nombre de lymphocytes T associée à une augmentation des niveaux sanguins des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF α a été observée avec le vieillissement (Wack, Cossarizza et al. 1998; Bruunsgaard and Pedersen 2003). Des taux élevés de ces deux cytokines s'avèreraient des prédictors de mortalité chez les personnes âgées en bonne santé (Bruunsgaard and Pedersen 2003) et les niveaux d'IL-6 corrélerent avec le risque de développer des maladies coronariennes (Koenig, Khuseyinova et al. 2006).

1.8.4. Les télomères et la sénescence

Les télomères constituent également un bon marqueur du vieillissement cellulaire puisque leur raccourcissement est proportionnel au taux de division cellulaire. Certains groupes ont révélé une corrélation inverse entre la longueur des télomères et l'âge chronologique des donneurs spécialement dans les cellules où le taux de réplication est important comme les cellules sanguines mononuclées (Rufer, Brummendorf et al. 1999; Robertson, Gale et al. 2000; Martin-Ruiz, Gussekloo et al. 2005; von Zglinicki and Martin-Ruiz 2005). De plus, la mesure de la longueur des télomères dans l'ADN de cellules sanguines de 143 individus âgés de 60 ans et plus révélait que les télomères les plus courts corrélaient avec un faible taux de survie, les individus correspondants étant sujets à un risque de mortalité plus élevé associé aux maladies cardiovasculaires (3x) et des maladies infectieuses (8x) (Cawthon, Smith et al. 2003). Par ailleurs, des études ont démontré que la longueur des télomères de leucocytes corrèlent directement avec l'âge de femmes centenaires, mais cette corrélation n'était toutefois pas retrouvée chez les hommes (Bischoff, Graakjaer et al. 2005; Bischoff, Graakjaer et al. 2005). Les hypothèses retenues pour expliquer cette différence étaient une sélection dans la mortalité, la régulation hormonale, la différence des populations de leucocytes ou bien des différences dans l'expression de la télomérase (Bischoff, Graakjaer et al. 2005).

Finalement, le groupe de Dimri *et al.* a démontré une activité de la *Senescence Associated* β -galactosidase (SA- β -galactosidase) à pH 6 permettant de marquer en culture, spécifiquement les cellules humaines sénescents en bleu (Figure 16B),

activité qui n'est pas présente dans des cellules humaines quiescentes ou non sénescents (Figure 16A) (Dimri, Lee et al. 1995). L'activité de la β -D-galactosidase à pH 6 spécifiquement, serait due à une augmentation de la masse enzymatique au niveau des lysosomes. L'augmentation du contenu présent dans les lysosomes à la sénescence serait causée par une accumulation de macromolécules intracellulaires non-dégradables associée au vieillissement cellulaire ce qui aurait comme effet de débalancer les enzymes responsables du maintien d'un pH autour de 4 (Yin 1996; Kurz, Decary et al. 2000). Ce marquage permet donc de colorer en bleu, les cellules sénescents (Figure 16). Ce biomarqueur a été utilisé expérimentalement afin de détecter des populations de cellules hyperprolifératives ayant atteints la sénescence comme dans des plaques athérosclérotiques (Minamino, Miyauchi et al. 2002) et des ulcères veineux (Stanley and Osler 2001).

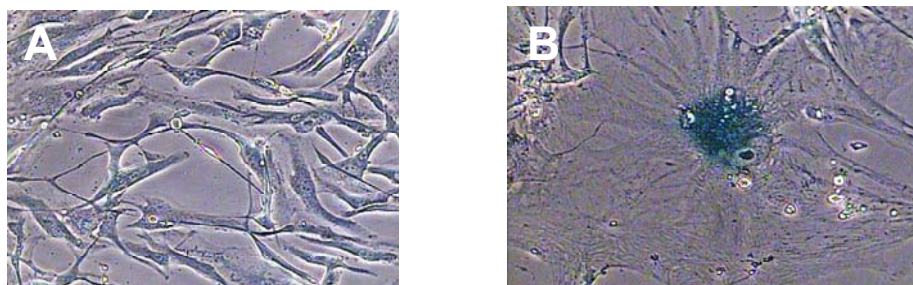


Figure 16: Marquage cytochimique de la SA- β -galactosidase dans des cellules non sénescents (A) et sénescents (B)

1.8.5. Les hormones et le vieillissement

Plusieurs hormones sont impliquées dans le processus de vieillissement et constituent donc des paramètres intéressants. Parmi celles-ci, l'hormone de croissance (GH) s'avère une candidate de choix car certaines études ont confirmé une diminution de la sécrétion de cette hormone par l'adénohypophyse avec le vieillissement.

Parallèlement, la sensibilité des récepteurs à la GH diminuerait également avec l'âge (Simm, Nass et al. 2008). Il a été proposé par Corpas *et al.* que cette résistance à la GH jumelée avec son hyposécrétion serait responsable de la prise de masse adipeuse, la perte de la masse musculaire et de minéralisation osseuse associée normalement avec le vieillissement (Corpas, Harman et al. 1993). Une autre hormone potentielle est la dihydroepiandrosterone (DHEA), dérivée stéroïde menant à la production d'hormones sexuelles comme les oestrogènes et la testostérone. Certaines études ont observé que les niveaux sanguins de DHEA et de sa forme sulfate (DHEAS) diminuent avec l'âge après avoir atteint un pic vers l'âge de 25-30 ans pour atteindre environ 10% vers l'âge de 80 ans (Migeon, Keller et al. 1957). Le groupe de Barrett-Connor *et al.* a même rapporté que la concentration de DHEAS était indépendamment et inversement reliée aux décès causés par des maladies cardiovasculaires chez les hommes âgés de 50 ans et plus (Barrett-Connor, Khaw et al. 1986). Parallèlement, les risques de maladies cardiovasculaires sont plus faibles chez les femmes préménopausées mais les niveaux d'oestrogènes diminuent drastiquement vers l'âge de 45-55 ans. Cette réduction est associée à une augmentation des risques cardiovasculaires, une perte rapide de la masse osseuse et une instabilité vasomotrice (Johnson 1998).

En conclusion, ce résumé descriptif trace un portrait de l'avancement des travaux en biogérontologie. Malheureusement, la plupart des marqueurs discutés ci-dessus ne s'applique pas strictement à l'âge, mais également aux pathologies normalement associées au vieillissement. Cependant, comme le vieillissement est un facteur de risque en soi pour plusieurs conditions physiopathologiques, ces marqueurs peuvent s'avérer utiles afin d'identifier des individus à haut risque de développer un désordre associé normalement au vieillissement.

2. Raisonnement et démarches

La dysfonction vasculaire associée au vieillissement a été proposée comme étant responsable de complications cardiovasculaires. Ces dernières années, la sénescence a été ciblée comme responsable de cette dysfonction car elle peut être accélérée à la fois par (i) le raccourcissement excessif des télomères dû à une accumulation avec le temps du nombre de divisions cellulaires dites « réparatives », et par (ii) l'augmentation de la production de stress oxydant associée aux différents facteurs de risque cardiovasculaire. Ainsi, il est logique de spéculer que les facteurs de risque cardiovasculaire peuvent accélérer le processus normal du vieillissement. Toutefois, aucune étude encore n'a établi d'association directe entre la sénescence de cellules endothéliales vasculaires et ces facteurs de risque cardiovasculaire. Les quatre études présentées dans cette thèse tentent d'élucider les mécanismes impliqués dans le vieillissement vasculaire chez des patients athérosclérotiques.

Étude #1

L'objectif de cette étude consiste en la caractérisation de la sénescence de cellules endothéliales vasculaires ayant été exposées aux facteurs de risque cardiovasculaire. Nous avons testé les hypothèses que (i) ces différents facteurs de risque cardiovasculaire accélèrent le développement de la sénescence cellulaire et que (ii) les deux principales voies de la sénescence (réplicative et induite par le stress) sont impliquées. Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules endothéliales isolées à partir d'artères mammaires internes provenant de patients athérosclérotiques ayant subi des pontages coronariens. Les cellules ont été cultivées *in vitro* jusqu'à ce qu'elles

atteignent la sénescence. La précocité du développement de la sénescence ainsi que différents marqueurs des deux voies de sénescence ont été quantifiés. Cette étude a permis d'observer que, plus les cellules ont été exposées longtemps aux facteurs de risque cardiovasculaire, plus la sénescence cellulaire est précoce. De plus, la longueur initiale des télomères ainsi que les niveaux de stress oxydant prédisent l'apparition de cette sénescence, suggérant fortement l'implication des deux principales voies de sénescence dans ces cellules.

Étude #2

Afin de confirmer l'implication des télomères et du stress oxydant dans la sénescence des cellules endothéliales de patients athérosclérotiques dans cette deuxième étude, nous avons bloqué une des deux voies impliquées dans la sénescence. Sachant que la sénescence est, en partie, causée par le stress oxydant associé aux facteurs de risque cardiovasculaire, nous avons émis comme hypothèse, qu'un traitement chronique avec un antioxydant peut ralentir le développement de la sénescence. Nous avons utilisé la même démarche expérimentale que dans la première étude mais cette fois, les cellules ont été cultivées *in vitro*, en présence ou en absence de l'antioxydant *N*-acétyl-*L*-cystéine (NAC), jusqu'à ce qu'elles atteignent la sénescence. Cette étude a permis d'observer que, dans des cellules endothéliales de patients athérosclérotiques, un traitement chronique avec l'antioxydant NAC peut ralentir l'apparition de la sénescence seulement dans une sous-population de cellules présentant moins de dommages cellulaires et moléculaires induits par les radicaux

libres. Dans les cellules irréversiblement endommagées, le NAC n'a eu aucun effet sur la sénescence.

Étude #3

Puisqu'un traitement chronique avec un antioxydant peut retarder l'apparition de la sénescence en bloquant la voie de la sénescence induite par le stress dans les cellules les moins affectées par les radicaux libres, nous avons décidé d'inhiber la voie de la sénescence répliquative seule en absence ou en présence d'antioxydant. Les hypothèses émises sont que (i) l'inhibition seulement de la voie de la sénescence répliquative retarde l'apparition de la sénescence et que (ii), l'inhibition simultanée des deux voies de la sénescence induit une immortalisation cellulaire. Nous avons utilisé la même démarche expérimentale que dans la première étude mais cette fois, les cellules ont été infectées ou non avec un lentivirus surexprimant la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT) et cultivées *in vitro*, en présence ou en absence de l'antioxydant *N*-acétyl-L-cystéine (NAC), jusqu'à ce qu'elles atteignent la sénescence. Cette étude a démontré que si l'on bloque uniquement la sénescence répliquative, le stress oxydant se chargera éventuellement d'induire la sénescence dans toutes les populations cellulaires. De plus, nous avons observé qu'une combinaison de hTERT-NAC peut immortaliser les cellules mais seulement les moins affectées par le stress oxydant. Par contre, lorsque les cellules sont plus endommagées par les radicaux libres, l'antioxydant n'ayant pas d'effet bénéfique, la sénescence est seulement retardée.

Étude #4

Nos deux premières études ont révélé que les facteurs de risque cardiovasculaire accélèrent l'apparition de la sénescence cellulaire et que le stress oxydant y joue un rôle prépondérant. Sachant que le tabagisme est le facteur de risque cardiovasculaire générant le plus de stress oxydant, l'objectif de cette quatrième étude consiste à comparer la sénescence cellulaire de patients athérosclérotiques fumeurs à celle de patients athérosclérotiques non-fumeurs. Nous avons utilisé dans cette étude, la même démarche expérimentale que décrite dans la première. Cette quatrième étude a révélé que la sénescence cellulaire de patients athérosclérotiques fumeurs est indépendante de la longueur de télomères et directement reliée aux dommages oxydatifs.

3. Méthodologie

Dans cette section, je présenterai le modèle expérimental utilisé au cours des différentes études et je décrirai également les différentes techniques effectuées ainsi que le matériel requis.

3.1. Modèle expérimental

Afin d'étudier le plus précisément possible le vieillissement de l'endothélium vasculaire, nous avons utilisé des artères mammaires internes thoracique (hIMA) obtenues lors de pontage coronarien. Les artères coronariennes des patients athérosclérotiques présentent souvent une diminution de leur capacité à s'adapter aux différences de débit. Par conséquent, ceci entraîne une irrigation sanguine déficiente lorsque les besoins en oxygène sont augmentés, ce qui constitue un risque accru pour l'apparition d'un infarctus du myocarde. Selon le degré d'obstruction vasculaire, différentes approches peuvent être utilisées. L'approche pharmacologique permet de diminuer la viscosité du sang (aspirine, statines), d'améliorer la circulation sanguine (vasodilatateurs, inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine) ainsi que de diminuer le travail cardiaque (β -bloqueurs) (Burfeind, Glower et al. 2004; Tashiro, Morishige et al. 2007). Lorsque les patients ont une obstruction coronarienne plus importante, l'angioplastie ainsi que le pontage coronarien s'avèrent efficaces. Cette dernière technique chirurgicale est utilisée depuis plus de trente ans et permet de rétablir une circulation coronarienne adéquate (Christian, Mack et al. 1985; Burfeind, Glower et al. 2004). Cette chirurgie consiste à utiliser un vaisseau sanguin prélevé sur

l'individu et de le greffer de part et d'autre de la région vasculaire occluse de manière à former un pont. Bien que la veine saphène demeure toujours utilisée, des études ont démontré de meilleurs résultats en utilisant l'artère mammaire interne thoracique (Zeff, Kongtahworn et al. 1988). Ces dernières sont prélevées à proximité de la bifurcation vasculaire à l'aide d'un galvanocautère à faible énergie et excisées à froid. Lors du pontage coronarien en salle d'opération, les segments d'artères mammaires internes non utilisés sont mis dans un milieu de culture Dubelcco's modified Eagle (DMEM) stérile et envoyés au laboratoire dans un intervalle de trente minutes. Le protocole de recherche a été approuvé par le comité d'éthique de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Dans la première étude, les segments d'artères mammaires de 58 patients ont été utilisés, 26 pour la seconde, 11 pour la troisième et 46 pour la quatrième étude. Tous les patients étudiés (110 hommes et 31 femmes ; 64 ± 4 ans) présentaient une combinaison de plusieurs facteurs de risque cardiovasculaires tels que le tabagisme, l'hypertension, le diabète, l'hypercholestérolémie et l'obésité. Leurs profils cliniques sont décrits dans chacune des études. Les patients soumis à cette étude étaient traités avec une médication similaire (aspirine, bloqueurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, β -bloqueurs, bloqueurs des canaux calciques, statines et nitrates).

3.2. Culture cellulaire

3.2.1. Première étude : caractérisation de la sénescence en conditions pathologiques

Une fois les segments d'artères mammaires internes reçus au laboratoire, les cellules endothéliales vasculaires sont immédiatement isolées suivant un protocole

décrit précédemment (Thorin, Shatos et al. 1997; Shi, Haberland et al. 2000). Les artères sont premièrement dénudées de tout tissu conjonctif et adipeux et ensuite ouvertes dans le sens de la longueur. Six à huit segments de 1 mm² sont ensuite découpés et placés dans une boîte de Pétri (35 mm²) recouverte de Matrigel (Becton Dickinson) de manière à ce que la face interne de l'artère (endothélium) soit en contact avec le Matrigel. Cette matrice est composée de laminine, de collagène IV, de protéoglycans et d'entactine, ce qui favorise la migration, l'implantation et la prolifération de cellules endothéliales (Kleinman, McGarvey et al. 1982). Les cellules sont ensuite incubées dans un milieu de culture DMEM stérile additionné de sérum et de facteurs de croissance (10% sérum foetal bovin, 10% de sérum de veau, 1% pénicilline/streptomycine, 90 µg/ml sodium héparine (Sigma), 60 µg/ml suppléments de croissance pour cellules endothéliales (Beckton Dickinson), et 100 U/ml fungizone (Gibco)) à 37°C dans un environnement comprenant 95% d'air atmosphérique et 5% de gaz carbonique (CO₂). Le milieu de culture est remplacé par du milieu frais tous les 2 à 3 jours. Les premières cellules endothéliales prolifèrent après 8±1 post-implantation. Lorsque les segments d'artères sont entourés d'un tapis de cellules, ils sont retirés, et lorsque la boîte de Pétri est pratiquement recouverte de cellules endothéliales, soit après 32±5 jours, le Matrigel est digéré par de la dispase (Beckton Dickinson), une métalloprotéinase dégradant la matrice. Ceci constitue un premier passage (P#1), c'est-à-dire que les cellules sont détachées de la matrice, séparées et resuspendues dans le milieu de culture. Elles sont ensuite transférées dans deux boîtes de Pétri « cell⁺ » plus grandes (60mm², Sarstedt). À chaque passage, le nombre de cellules est compté à l'aide d'un hémacymètre observé au microscope inversé (Nikon TMS) . Les cellules sont suspendues dans du milieu de culture et 10 µl de solution sont déposés au centre

de l'hémacymètre. Le nombre de cellules est compté dans chacun des champs (Figure 17 A-D). La moyenne du nombre de cellules des quatre champs est calculée et représente le nombre de cellules pour 0.1 μ l. Une multiplication par dix ou par dix mille permet d'avoir ainsi la concentration cellulaire par μ l ou par ml respectivement.

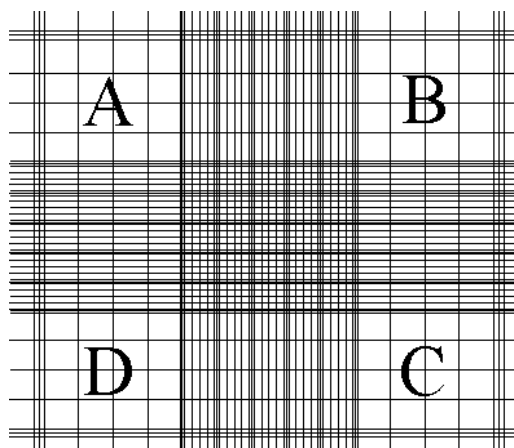


Figure 17 : Hémacymètre permettant le compte cellulaire

Le nombre de divisions cellulaires (*population doubling level, PDL*) peut ainsi être calculé selon l'équation suivante :

$$PDL = (\log_{10}Y - \log_{10}X)/\log_{10}2$$

où Y est le nombre de cellules comptées à la fin du passage et X est le nombre de cellules mises en culture au début du même passage. En moyenne, le PDL calculé à la fin du P#1 est de 2.9 ± 0.1 , c'est-à-dire que chaque cellule du pétri s'est divisée environ 2.9 fois. Lorsque les boîtes de Pétri de 60 mm² sont rendues à confluence, les cellules sont digérées pendant 5 minutes à 37°C par 300 μ l de trypsine (Invitrogen), une endoprotéase qui hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé basique (Lysine ou Arginine) engage sa fonction acide. Cette endoprotéase est ensuite inhibée lorsque les cellules détachées sont resuspendues du milieu de culture (DMEM) contenant du sérum avant d'être à nouveau transférées dans des boîtes de Pétri de plus

grande surface (100 mm² et 75 cm²). Ceci constitue le deuxième passage (P#2). Ainsi, les expériences commencent à P#2 avec un PDL inférieur à 3. Les cellules endothéliales sont ensuite cultivées et passées successivement jusqu'à ce qu'elles atteignent la sénescence. À chaque passage, des cellules sont collectées et utilisées immédiatement pour effectuer différentes expérimentations, ou bien congelées à -80°C pour une utilisation ultérieure. L'origine endothéliale des cellules isolées est confirmée à l'aide d'un marquage immunohistochimique contre les facteurs von Willebrand et CD31, selon un protocole décrit plus bas.

3.2.2. Deuxième étude : Effets d'un traitement chronique avec un antioxydant

Le but de la seconde étude est d'évaluer l'impact d'un traitement chronique avec l'antioxydant *N*-acétyl-*L*-cystéine (NAC) sur la sénescence de cellules endothéliales isolées chez des patients athérosclérotiques. L'isolation et la caractérisation cellulaires sont effectuées selon les protocoles décrits précédemment. Cependant, pour un même patient à passage #3, les cellules ont été séparées en deux groupes (Figure 18) : un groupe contrôle de cellules et un groupe de cellules traitées chroniquement avec du NAC ajouté au milieu de culture à une concentration finale de 10 µM. Les deux groupes de cellules ont été cultivées en parallèle jusqu'à la sénescence. Comme décrit précédemment, des cellules sont collectées à chaque passage, utilisées immédiatement ou bien congelées à -80°C pour une utilisation ultérieure.

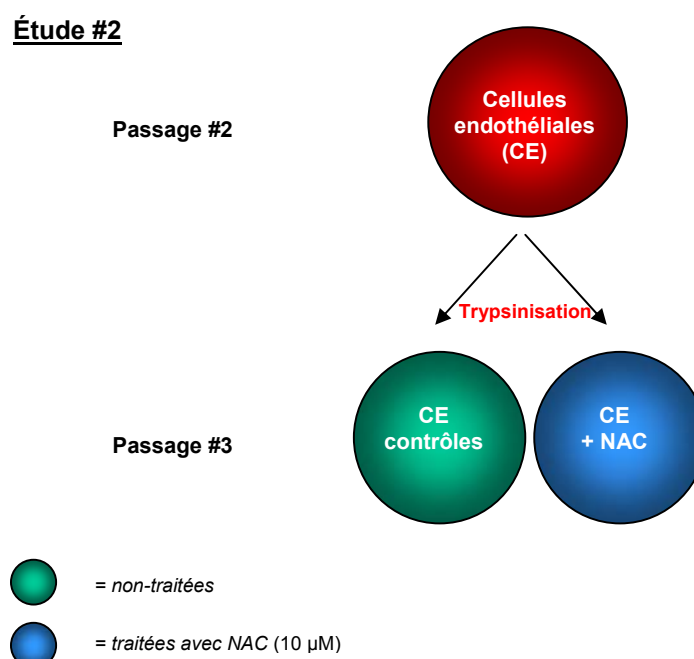


Figure 18 : Description des groupes de cellules endothéliales (CE) dans la deuxième étude.

3.2.3. Troisième étude : Effets d'un traitement chronique avec l'antioxydant NAC combiné ou non avec une surexpression de la sous-unité catalytique de la télomérase.

Dans cette troisième étude, nous avons infecté des cellules endothéliales avec un vecteur lentiviral (FG12-CMV) surexprimant ou non la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT), en la présence ou en l'absence de *N*-acétyl-*L*-cystéine. Les cellules d'un même patient ont été divisées en six groupes à P#3 (Figure 19) : une population de cellules non-infectées, une infectée avec le vecteur lentiviral seul (CMV) et une population infectée avec le vecteur lentiviral possédant la sous-unité catalytique de la télomérase (CMV-hTERT) ont été cultivées en la

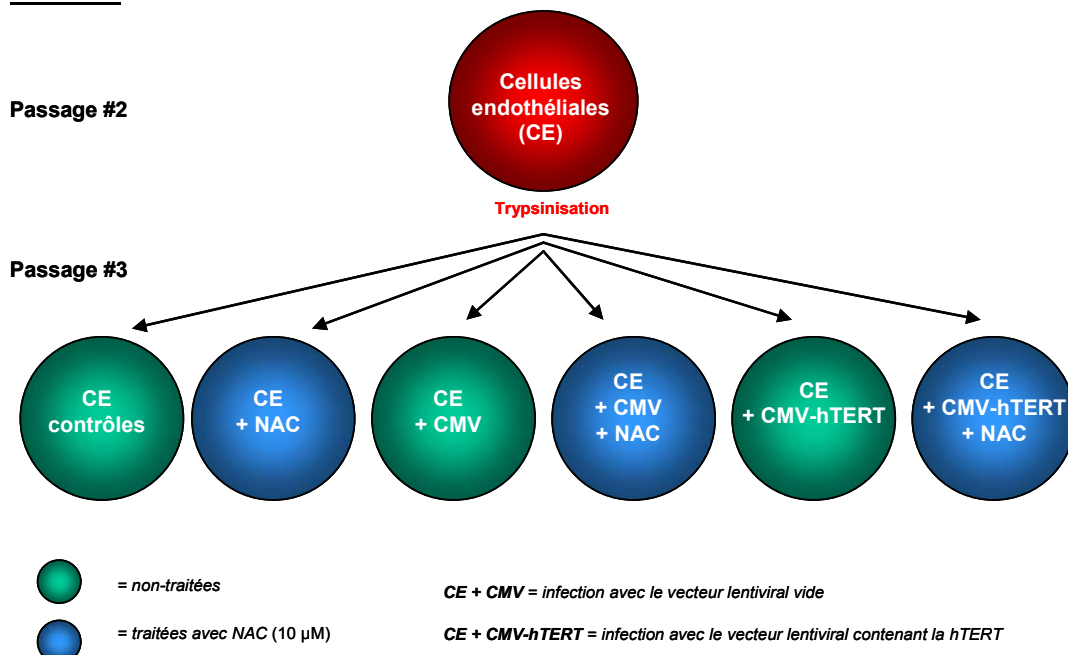
Étude #3

Figure 19: Description des groupes de cellules endothéliales (CE) dans la troisième étude.

présence ou en l'absence de NAC successivement jusqu'à ce qu'elles atteignent la sénescence. Dans certains cas, l'infection hTERT a conduit à l'immortalisation cellulaire, la culture de ces cellules a été volontairement arrêtée après ± 1an étant donné qu'aucun signe de sénescence n'était observé. La description de l'infection lentivirale sera décrite plus loin. Comme expliqué précédemment, les cellules sont collectées à chaque passage et utilisées immédiatement ou bien congelées à -80°C pour une utilisation ultérieure.

3.2.4. Quatrième étude : Identifier l'impact du tabagisme sur la sénescence cellulaire

Le but de la quatrième étude est de caractériser l'impact du tabagisme sur la sénescence cellulaire. L'isolation et la caractérisation cellulaires sont effectuées selon

les protocoles décrits dans la section 3.2.1. Comme expliqué précédemment, des cellules sont collectées à chaque passage, utilisées immédiatement ou bien congelées à -80°C pour une utilisation ultérieure.

3.3. Détection de l'activité de la β -Galactosidase associée à la sénescence

La β -D-galactosidase est une hydrolase eukaryotique, localisée dans les lysosomes, responsable du clivage des résidus terminaux galactosyle de plusieurs substrats tels que les gangliosides, les glycoprotéines et les glycosaminoglycans ainsi que d'autres substrats artificiels (Kurz, Decary et al. 2000). Dans des cellules normales, son activité est optimale à un pH acide (pH 4.0-4.5) semblable à celui que l'on retrouve dans les lysosomes et elle peut être détectée *in situ* par un marquage cytochimique à pH 4 en utilisant un substrat chromogénique, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside (X-Gal) (Dimri, Lee et al. 1995; van der Loo, Fenton et al. 1998). Cette hydrolase est notamment utilisée lors de clonage génétique afin de vérifier l'efficacité de la construction moléculaire et de la transfection cellulaire ou bactérienne. Cependant, le groupe de Dimri *et al.* a démontré une activité de la β -D-galactosidase à pH 6 spécifique aux cellules humaines sénescents en culture, activité qui n'est pas présente dans des cellules humaines quiescentes ou prolifératives (Dimri, Lee et al. 1995). Cette technique, appelée *Senescence-Associated β -galactosidase (SA- β -galactosidase)* s'avère dorénavant un bon marqueur cytochimique de la sénescence cellulaire et corrèle avec d'autres marqueurs de sénescence tels que le

raccourcissement de la longueur des télomères, une baisse de la viabilité cellulaire et de la synthèse d'ADN (Dimri, Lee et al. 1995; Zhang, Aviv et al. 2000).

3.3.1. Description de la méthode

À chaque passage, les cellules endothéliales sont comptées et le même nombre de cellules est mis dans deux boîtes de Pétri de 35 mm². Le marquage cytochimique est effectué lorsque le niveau de confluence est à environ 50-60%. Les cellules d'une des deux boîtes de Pétri sont lavées deux fois avec du tampon phosphate salin (*Phosphate Buffered Saline*, PBS, 136.8 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄-7H₂O, 1.5 mM 2.4 KH₂PO₄ dans 1L d'eau, pH 7.4, tous les produits provenant de chez Sigma) puis fixées pendant cinq minutes à température de la pièce à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde 2% (Sigma) et de 0.2% glutaraldéhyde (EM Science) diluée dans du PBS. Les cellules sont ensuite lavées deux fois au PBS, incubées à 37°C à air ambiant (sans CO₂) durant 16-18h dans une solution à base de PBS contenant le substrat chromogénique 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside (X-Gal, Sigma) à une concentration de 1mg/ml (acide citrique 40 mM titré à pH 6 à l'aide de NaH₂PO₄, NaCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM, K₃Fe(CN)₆, 5 mM K₄Fe(CN)₆, tous les produits provenant de chez Sigma). Suite à l'incubation, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS et le pourcentage de cellules colorées en bleu, et donc positives à la SA-β-Gal, est déterminé en comptant à l'aide d'un hémacymètre observé au microscope inversé (Nikon TMS), au moins deux cents cellules dans quatre champs optiques différents. Certains de ces champs ont été photographiés à l'aide du logiciel BTV afin de représenter visuellement les pourcentages de cellules sénescents (Figure 16). Les

cellules endothéliales de la seconde boîte de Pétri de 35 mm² sont lavées deux fois avec du PBS, trypsinisées et resuspendues dans du milieu de culture. Le nombre de cellules est compté afin de déterminer le nombre de PDL correspondant au niveau de sénescence détecté dans la première boîte de Pétri. Cette seconde boîte de Pétri peut également servir à la détermination de la viabilité cellulaire.

3.4. Test de viabilité cellulaire (bleu de trypan)

Afin de corroborer les résultats obtenus à l'aide de la quantification de la SA- β -Gal, nous avons effectué des tests de viabilité cellulaire à l'aide d'une coloration au bleu de trypan. Ce test se base sur le principe que les cellules viables possèdent des membranes cytoplasmiques intactes capables d'exclure certains colorants comme l'éosine, le propidium et le bleu de trypan tandis que les cellules non viables sont dans l'incapacité d'exclure ces colorants et demeurent donc marquées par la coloration (Shapiro 1988; Rosso, Balsamo et al. 2006).

3.4.1. Description de la méthode

Les cellules endothéliales d'une boîte de Pétri de 35 mm² sont lavées deux fois avec du PBS, trypsinisées, resuspendues dans 1 ml de milieu de culture, comptées et centrifugées à 2000 tours/minute à 4°C pendant cinq minutes. Le surnageant est ensuite retiré et le culot est lavé deux fois avec du PBS pour finalement être resuspendu dans 1 ml de PBS. Cinquante microlitres de bleu de trypan (Sigma) sont ajoutés à la suspension qui est ensuite incubée à température de la pièce pendant cinq minutes. Il est important de ne pas incuber plus de dix minutes car le trypan deviendrait toxique

pour les cellules et le test de viabilité serait faussé. Puis, 10 µl de suspension cellulaire sont prélevés et mis sur un hémacymètre et le nombre de cellules marquées et non-marquées par le bleu de trypan est calculé afin de déterminer le pourcentage de cellules viables selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Viabilité} = \frac{\text{nombre total de cellules viables (non-marquées)}}{\text{nombre de cellules totales (marquées et non-marquées)}} * 100$$

3.5. Mesure de la longueur des télomères par immunobuvardage de type Southern

Comme les télomères jouent le rôle d'horloge mitotique des cellules somatiques, ils constituent un bon indicateur de l'âge biologique des cellules endothéliales. Parallèlement au marquage cytochimique de la SA-β-galactosidase, la mesure de la longueur des télomères sera utilisée comme marqueur de référence et effectuée dans chacune de nos quatre études.

Au cours des dernières années, différentes techniques ont été mises au point afin de peaufiner les méthodes de quantification de la longueur des télomères. L'hybridation *in situ* par fluorescence (*fluorescence in situ hybridization, FISH*) est une technique qui permet le marquage direct d'une sonde d'oligonucléotides, une séquence synthétique d'acides nucléiques, au niveau des télomères à l'intérieur même des cellules. La fluorescence émise par l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC) couplé à la sonde est quantifiée par microscopie à fluorescence (Lansdorp, Verwoerd et al. 1996). Les plus grands inconvénients de cette méthode résident dans le fait (i) qu'il est nécessaire d'avoir des chromosomes condensés en métaphase du cycle cellulaire et (ii)

qu'elle demeure une technique semi-quantitative. Cependant, son principal avantage est de pouvoir mesurer individuellement la longueur des télomères de chacun des chromosomes de la cellule (Lansdorp, Verwoerd et al. 1996; Lin and Yan 2005). Quelques variantes du FISH ont été développées afin d'améliorer la sensibilité de la technique comme par exemple, le FISH quantitatif (Q-FISH) (McNeil and Ried 2000), le FISH utilisant un peptide d'acides nucléiques plutôt qu'une sonde (PNA-FISH) (Lansdorp, Verwoerd et al. 1996; Uhlmann, Prasad et al. 2000) ainsi que le FISH par cytofluorométrie en flux (flow-FISH) (Ishikawa 1998; Ruffer, Dragowska et al. 1998). Cependant, une des méthodes les plus utilisées aujourd'hui encore pour mesurer la longueur des télomères demeure l'immunobuvardage du type Southern. Cette méthode a été décrite pour la première fois par le biologiste britannique Edwin Southern en 1975 (Southern 1975). Elle consiste à extraire et digérer l'ADN génomique en petits fragments par des enzymes de restriction, à les séparer sur gel d'agarose par électrophorèse et à les transférer sur une membrane de nitrocellulose (Figure 20). L'ADN est ensuite hybridé par une sonde spécifique à la séquence télomérique et marqué à l'aide d'un isotope radioactif ou d'un composé chimiluminescent. La grosseur et l'abondance des fragments de restriction télomériques terminaux (*terminal restriction fragment, TRF*) sont quantifiées par densitométrie (Figure 22) (Southern 1975; Zhang, Aviv et al. 2000; Saldanha, Andrews et al. 2003).

Le principal désavantage de cette technique est qu'elle mesure la longueur moyenne des télomères de tous les chromosomes de toute une population cellulaire retrouvée dans une même culture (Saldanha, Andrews et al. 2003; Lin and Yan 2005). Cependant, plusieurs études confirment qu'en combinaison avec d'autres marqueurs de

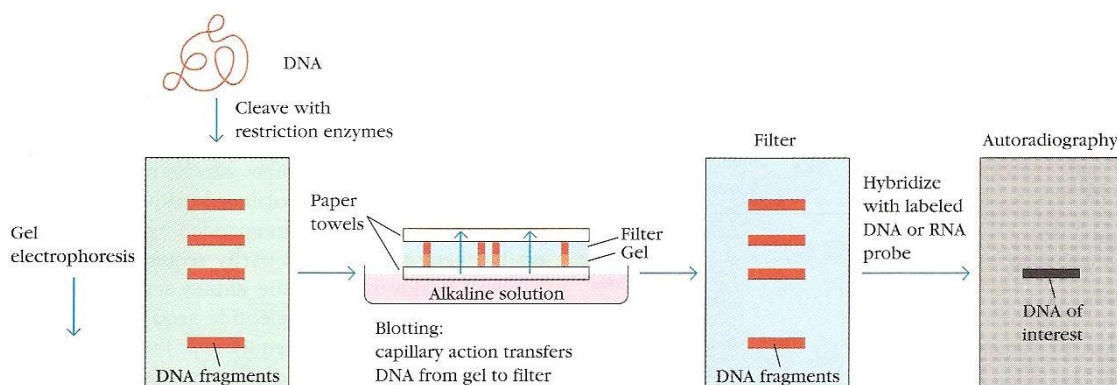


Figure 20: Technique d'immunobuvardage de type Southern (Tiré de Goldsby *et al.*, 2000)

sénescence tel que la SA- β -galactosidase, l'immunobuvardage de type Southern s'avère un outil très efficace pour quantifier le vieillissement cellulaire (Zhang, Aviv et al. 2000; Martin-Ruiz, Saretzki et al. 2004; Matthews, Gorenne et al. 2006).

3.5.1. Extraction de l'ADN génomique

Les cellules endothéliales cultivées dans des flacons de 75 cm² sont lavées deux fois au PBS, grattées et centrifugées pendant cinq minutes à 4°C à 4000 tours/minute. Le surnageant est enlevé, les culots cellulaires sont congelés (-80°C). Le jour de l'extraction de l'ADN, le culot cellulaire est décongelé sur glace et incubé avec 500 μ l de tampon de lyse (EDTA 25 mM, Tris-HCl 10 mM, SDS 0.5%, NaCl 100 mM) comprenant 100 μ g/ml de Rnase A (Roche) pendant 1h à 37°C. Cette première incubation lysera les membranes cytoplasmiques libérant ainsi les acides nucléiques. La présence de Rnase dégradera l'ARN en laissant intact l'ADN génomique afin de ne pas altérer les expériences subséquentes. Une seconde incubation de 16-18h à 55°C cette fois, est effectuée en ajoutant au tampon de lyse de la protéinase K (Gibco) à une concentration finale de 100 mg/ml. Cette sérine protéase endolytique coupe les liens

peptidiques aux extrémités carboxyles d'acides aminés aliphatiques, aromatiques ou hydrophobiques (Ebeling, Hennrich et al. 1974; Bajorath, Hinrichs et al. 1988). Par la suite, l'ADN est isolé en utilisant une extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamyl. Nous ajoutons au mélange cellules-tampon de lyse-Rnase-protéinase K un demi-volume ($\pm 250 \mu\text{l}$ d'oxaloacétate d'ammonium, NH_4Oac , 7.5 M) et un volume ($\pm 750 \mu\text{l}$) d'une solution de phénol saturé :chloroforme :alcool isoamyl (25 :24 :1, tous les produits provenant de chez Sigma). Dans un tube à prélèvement contenant une matrice de silicone (Vacutainer, BD Biosciences), la solution est ensuite vortexée à vitesse maximum durant 15 secondes et centrifugée pendant 5 minutes à 13000 tours/minute à 4°C. Le phénol et le chloroforme, en plus d'être de puissants agents dénaturants de protéines, sont deux solvants organiques qui piègeront les débris cellulaires hydrophobiques laissant les composés hydrophiles tels que l'ADN dans la solution aqueuse. Le phénol pénètre dans la matrice de silicone, laissant l'ADN dans la phase aqueuse. Le phénol pouvant altérer certaines étapes des expériences subséquentes telle que la quantification par spectrofluorométrie, un lavage de la phase aqueuse est effectué en ajoutant 500 μl de chloroforme-alcool isoamyl (24 :1) sans phénol. La solution est vortexée à vitesse maximum durant 15 secondes et centrifugée pendant 5 minutes à 13000 tours/minute à 4°C. Le surnageant contenant la phase aqueuse et l'ADN est ensuite transférée dans des tubes 1.5 ml propres. Finalement, l'ADN est précipité en ajoutant 2 volumes ($\pm 1 \text{ ml}$) d'éthanol 100% (Laboratoire Mat) refroidi à -80°C. Le mélange est incubé 15 minutes à -80°C puis centrifugé pendant 30 minutes à 13000 tours/minute à 4°C. Le culot formé lors de la centrifugation constitue l'ADN génomique. Le surnageant est délicatement ôté et le culot, lavé avec de l'éthanol 70%. Une dernière centrifugation de 5 minutes à 13000 tours/minute à 4°C

est effectuée. Le surnageant est une fois de plus délicatement enlevé et le tube est laissé sous la hotte chimique le temps que l'éthanol, qui peut nuire à la quantification par spectrofluorométrie, soit complètement évaporé. Une fois toute trace d'éthanol éliminée, le culot d'ADN est élué et resuspendu dans 50 µl de tris-HCl 10 mM à pH 8.6 (Sigma) préalablement réchauffé à 37°C. La concentration en ADN génomique est finalement quantifiée par spectrofluorométrie (*Thermo Scientific Nanodrop*, ND1000) à des longueurs d'onde de 260 nm et 280 nm.

3.5.2. Marquage radioactif des poids moléculaires et de la sonde d'oligonucléotides

Nous avons utilisé des fragments d'ADN du bactériophage λ digéré par l'enzyme de restriction *Hind III* (564 pb-23.1 kb, Invitrogen) comme échelle de poids moléculaires en combinaison avec le marqueur commercial 1Kb (506 pb-12 kb, Invitrogen). Les marqueurs de poids moléculaires ne pouvant être hybridés avec la sonde télomérique radioactive, nous les avons dans un premier temps marqués avec l'isotope radioactif ^{32}P . Dans deux tubes différents sont ajoutés cinq microgrammes de chacun des deux poids moléculaires, 2.5 µl d'albumine de sérum bovin (BSA 10X), 5 µl de tampon de réaction d'échange de la kinase T4 (*exchange reaction buffer*, New England BioLab, 5X), 40 µCi de [γ ^{32}P]-ATP (\pm 4 µl à son activité maximale de 10 µCi/µl, Amersham) et 2 µl (20 unités) de la polynucléotide kinase T4 (New England BioLab), le tout complété à un volume final de 25 µl avec de l'eau bi-distillée (ddH₂O). Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 30 minutes avant que la réaction ne soit inactivée avec l'ajout de 1µl d'EDTA 0.5 M, un chélateur du calcium requis pour le

marquage. Le mélange est ensuite purifié à l'aide de colonne G-25 (Amersham) afin d'enlever l'excès d'isotopes non-liés aux poids moléculaires.

Pour la sonde télomérique servant à l'hybridation, à 3 μ l de la sonde d'oligonucléotides (5'-[CCTAAA]₄-3', 1-50 pmol de 5'termini, Invitrogen) sont ajoutés 5 μ l d'albumine de sérum bovin (BSA 10X), 5 μ l de tampon spécifique la kinase T4 (New England BioLab, 10X), 150 μ Ci de [γ ³²P]-ATP (Amersham) et 3 μ l (30 unités) de la polynucléotide kinase T4, le tout complété à un volume final de 50 μ l avec de la ddH₂O. Le tube est ensuite incubé à 37°C pendant 1h30 avant que la réaction ne soit inactivée avec l'ajout de 2 μ l d'EDTA 0.5M. Comme pour les poids moléculaires, le mélange est ensuite purifié à l'aide de colonne G-25 (Amersham) et l'efficacité du marquage radioactif est mesuré par un compteur à rayons bêta (Beckman).

3.5.3 Préparation des échantillons

Pour chacune des populations cellulaires des patients, 10 μ g d'ADN génomique provenant des passages initiaux (P#3, début de culture) et finaux (sénescence) sont digérés dans un volume égal (45 μ l final) à l'aide des enzymes de restriction *Rsa I* et *Hinf I* (New England BioLab) à une concentration d'une unité/ μ g d'ADN pendant 16-18h à 37°C en présence de tampon spécifique aux enzymes et d'albumine isolée à partir de sérum bovin (BSA, 1X). L'activité des enzymes est ensuite inhibée à 65°C pendant 20 minutes. Ces enzymes de restriction coupent l'ADN génomique en petits fragments sans toucher aux télomères. Cette digestion a pour but de dégrader l'ADN

situé aux régions subtélomériques laissant uniquement les séquences télomériques intactes. Une fois l'inactivation terminée, 5 μ l de tampon de chargement (*loading buffer* 10X, 250 mg bleu de bromophénol, 33 ml Tris-HCl 150 mM pH 7.6, 60 ml glycérol, 7 ml ddH₂O) sont ajoutés aux échantillons d'ADN. Les échantillons sont maintenant prêts à être utilisés.

3.5.4. Description de la méthode d'immunobuvardage de type

Southern

Les échantillons d'ADN (10 μ g) digérés et les échelles de poids moléculaires marquées radioactivement sont déposés dans les puits d'un gel d'agarose SeaKem LE (Cambrex) à 0.7% coulé dans un bac à électrophorèse (Fisher). Un courant de 30V est imposé par un générateur de courant (BioRad) permettant de séparer l'ADN par électrophorèse dans un tampon composé de TAE 1X (Solution TAE 50X = Tris 2M, Na₂EDTA 0,05M, acide acétique glacial 5% ajusté avec de l'eau pour avoir 1L final) pendant 20h ou jusqu'à ce que le front de migration (bleu de bromophénol) soit sorti du gel. Le gel est ensuite retiré et lavé deux fois pendant 5 minutes avec de la ddH₂O avant d'être dépuriné pendant 10 minutes (HCl 0.125N). Deux lavages de 5 minutes avec de l'eau ddH₂O sont ensuite effectués avant de dénaturer le gel pendant 30 minutes (NaOH 0.5M, NaCl 1.5M). Après deux autres lavages (5 minutes, ddH₂O), le gel est finalement neutralisé (Tris-HCl 0.5M, NaCl 1.5M) avant d'être rincé deux dernières fois avec de l'eau ddH₂O pendant 5 minutes. Toutes ces étapes sont effectuées à la température de la pièce sur une plaque agitatrice. L'ADN est ensuite transféré du gel d'agarose sur une membrane de nitrocellulose (Hybond N+, Amersham) à l'aide

d'une pompe à vide (*vacuum blotter*, BioRad) plutôt que par capillarité. Le montage est effectué comme illustré (Figure 21): gel, membrane de plastique (scellant), membrane de nitrocellulose, papier buvard (Whattman), plaque-éponge. Il est important de placer le gel de manière à ce qu'il soit hermétiquement collé et aspiré à la membrane de plastique. Le « sandwich » ainsi formé est recouvert d'une solution saline de sodium citrate 10X (NaCl 1.5M, sodium citrate-2H₂O 0.15M, dans 2L d'eau, pH 7.45) et le transfert est effectué à une pression de 5 mmHg pendant 1h30. L'ADN ainsi transféré est fixé à la membrane par une exposition de 7 secondes aux rayons ultraviolets à l'aide d'un *U.V. crosslinker* (Fisher). La membrane est ensuite hybridée dans 100 ml de tampon phosphate 0,5M pH 7,2 (NaH₂PO₄ anhydre 0.28M, Na₂HPO₄-7H₂O 78M, SDS 0.12M, 10ml de EDTA 0.01M, chauffée pour homogénéisation) pendant 16-18h à 49°C afin de bloquer les sites non-spécifiques. Puis, la membrane est hybridée dans les mêmes conditions (16-18h, 49°C) à l'aide de la sonde télomérique marquée avec l'isotope $\gamma^{32}\text{P}$ à une concentration de 10⁶ cpm/ml de tampon d'hybridation (40 ml).

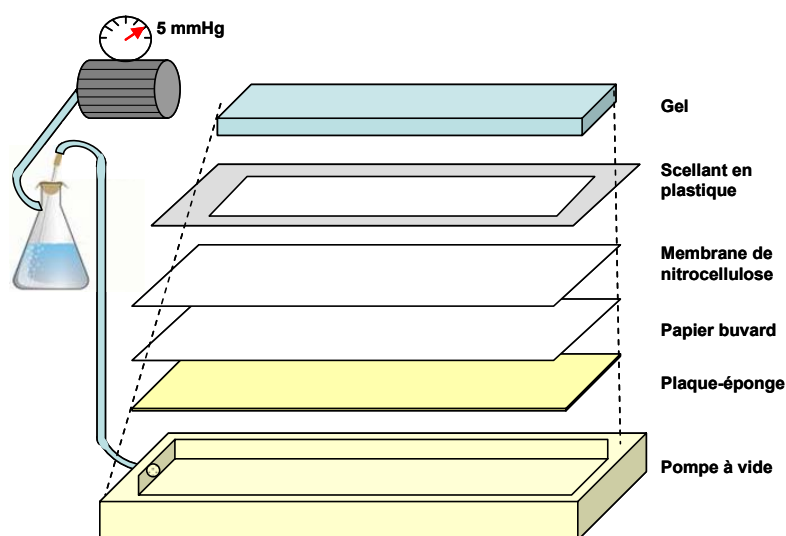


Figure 21: Montage de la pompe à vide (*vacuum blotter*)

La membrane est finalement lavée à la température de la pièce deux fois pendant 5 minutes (SSC 1X, SDS 0,1%) et deux autres fois pendant 5 minutes (SSC 0,1X, SDS 0,1%). La membrane est enfin séchée et exposée dans une cassette à autoradiographie (BioRad) pendant 30h. La révélation s'effectue à l'aide d'un phosphoImager (BioRad) (Figure 22). La longueur moyenne des télomères (TRF) est calculée selon l'équation suivante :

$$TRF = \sum D.O.i / \sum (D.O.i / P.M.i),$$

où D.O.i est la densité optique calculée, donc l'abondance des fragments télomériques, à un point donné (i) de la migration, et P.M._i est le poids moléculaire en kilopaires de bases (kb) à ce même point (i) de la migration. La distance de migration des différentes bandes des échelles de poids moléculaires (à gauche de la figure 22) permet d'établir une courbe standard. Pour chaque échantillon, plusieurs cases (plus de 10) sont découpées le long du signal (entre 5 et 20 kbp). À partir de la courbe standard et selon leur distance de migration, nous pouvons calculer le poids moléculaire correspondant à chaque case. Ensuite, pour chacune d'elle, l'intensité du marquage est quantifié, reflétant le nombre de fragments télomériques à un poids moléculaire précis. Pour chacun des échantillons, une courbe de distribution (à droite de la figure 22) est établie afin d'observer la répartition de fragments de télomères courts (5-10kbp), de longueur intermédiaire (10-15kbp) et de longs télomères (15-20kbp).

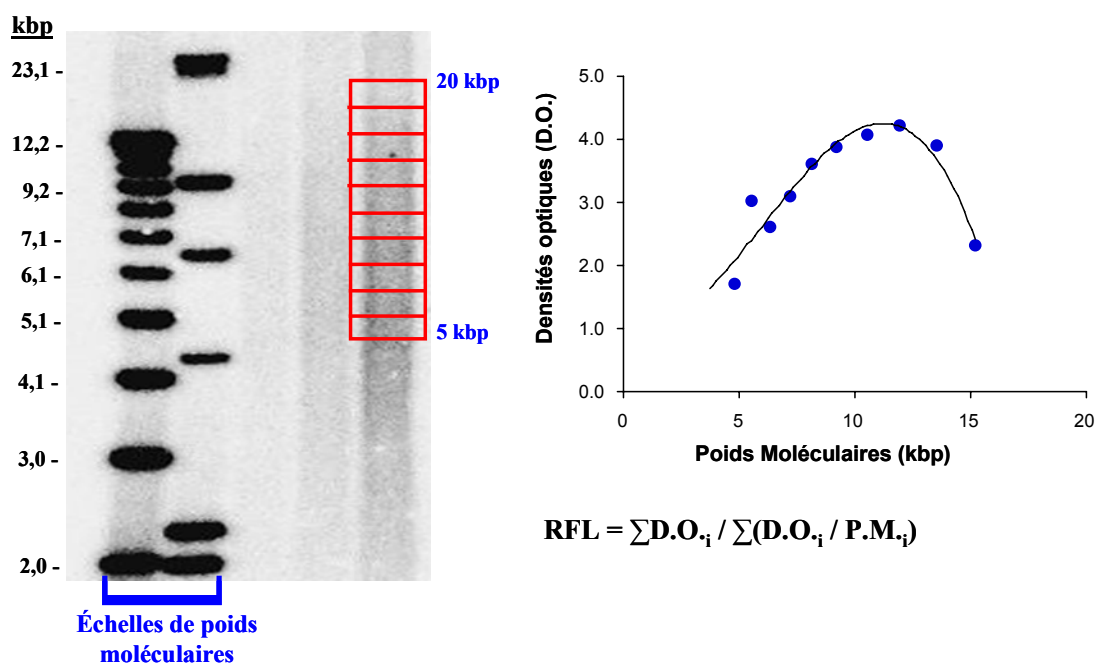


Figure 22 : Quantification de la longueur des télomères (TRF)

3.6. Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique d'immunomarquage qui permet de mettre en évidence une ou plusieurs protéines (simple ou double marquage) par l'utilisation d'un fluorochrome couplé à un anticorps. Les cellules sont déposées sur des lames de microscopes avant d'être fixées et perméabilisées. Tel qu'illustré à la figure 23, un premier anticorps (primaire) est ensuite dirigé contre la protéine d'intérêt (ou son antigène). Un deuxième anticorps (secondaire), spécifique à l'isotype de l'anticorps primaire, est enfin couplé à un fluorochrome (Figure 23) (Goldsby RA 2000). Les lames sont ensuite observées sous un microscope confocal et la fluorescence est quantifiée. Nous avons utilisée la technique d'immunofluorescence dans nos quatre

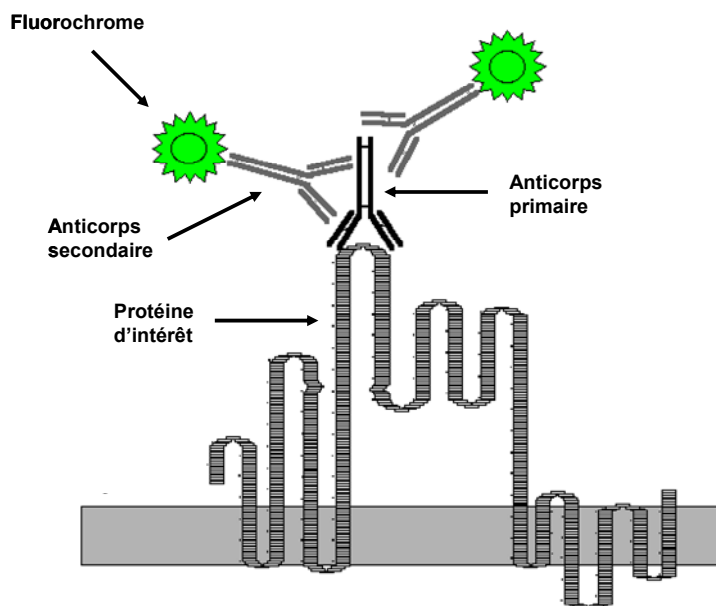


Figure 23: Technique de marquage immunofluorescent (Selon Goldsby RA 2000)

études, dans un premier temps pour observer la localisation cellulaire de certaines protéines, mais également pour une analyse semi-quantitative de l'expression protéique.

3.6.1. Description de la méthode

Les cellules endothéliales en culture à différents niveaux de sénescence sont trypsinisées, resuspendues et déposées sur des lamelles stériles (Fisher, taille = 18 x 18 mm, #1) dans une plaque à six puits (Sartstedt) et incubées à 37°C (95% d'air atmosphérique et 5% de gaz carbonique) afin que les cellules y adhèrent et prolifèrent. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec du PBS, puis fixées par une solution fraîche de paraformaldéhyde 2% pH 7.2 pendant 20 minutes. Les lamelles sont ensuite rincées (3x 5 minutes, PBS). À cette étape, les cellules peuvent être congelées

(PBS/glycérol, 1:1) à -30°C ou utilisées immédiatement. Puis, un blocage des sites non spécifiques et une perméabilisation des cellules sont effectuées pendant 1h à la température de la pièce (2% Sérum normal correspondant à celui de l'hôte de l'anticorps secondaire, Triton-X100 0.2% dans du PBS). Une première incubation pendant 16-18h à 4°C avec une solution (Sérum normal 1%, Triton-X100 0.05% dans du PBS) contenant les anticorps primaires est réalisée contre le 4-hydroxy-nonanal (HNE) (anti-HNE polyclonal de lapin, 1:200, Alpha Diagnostics), p53 (anti-p53 monoclonal de souris, 1:200, Upstate), p16 (anti-p16 de lapin, 1:50, Santa Cruz), p21 (anti-p21 de souris, 1:25, Santa Cruz), cavéoline-1 (anti-caveolin-1 de souris, 1:400, BD Transduction Laboratories), phospho H2AX (anti- γ H2AX monoclonal de souris, 1:200, Upstate), ATM (anti-ATM polyclonal de lapin, 1:100, Santa Cruz), *promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies* (anti-PML de lapin, 1:200, généreusement offert par le Dr G. Ferbeyre, Université de Montréal, Canada), TRF1 (anti-TRF1 de souris, 1:200, Sigma), TRF2 (anti-TRF2 polyclonal de lapin, 1:100, Santa Cruz) et hTERT (anti-hTERT monoclonal de souris, 1:200, Abcam) à différent niveaux de sénescence dans les quatre études. Les lamelles sont ensuite lavées (3x 5 minutes, PBS) afin d'enlever le surplus d'anticorps primaires non-lié et une deuxième incubation de 1h à la température de la pièce dans le noir est réalisée en présence des anticorps secondaires appropriés (chèvre/bovin anti-lapin/souris, 1:200, Santa Cruz). Trois autres lavages de 5 minutes avec du PBS permettent de rincer les cellules avant qu'un contre-marquage de l'ADN soit effectué en incubant dans un premier temps, les cellules 20 minutes à 37°C avec de la RNase exempte de DNase (100 μ g/ml dans du SSC 2X) et ensuite avec de l'iode de propidium (20 μ M, Molecular Probe) ou du

TOPRO-3 (2 μ M, Molecular Probes). Les lamelles sont finalement adhérees sur une lame de microscope avec 15 μ l de milieu de montage (DABCO 2%: glycerol, 1:10). Pour chaque échantillon testé, des contrôles négatifs sont utilisés en omettant l'anticorps primaire durant le protocole. La fluorescence est visualisée à l'aide d'un microscope confocal à balayage LSM510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne) avec un objectif 63x/1.4 Plan-Apochromat Oil DIC utilisé. Des images en série (Z-stack, 200 nm entre les images) sont observées sur toute l'épaisseur des cellules endothéliales (8-10 μ m). Les Z-stacks ont été déconvoluées à l'aide du programme Huygens Professionnal (Scientific Volume Imaging, Alexanderlaan, Pays-Bas). Une analyse semi-quantitative est effectuée en mesurant l'intensité moyenne de la fluorescence totale dans des cellules (HNE) ainsi que dans des fractions cytosoliques et nucléaires (H2AX, ATM, p53, p16, p21, cavéoline-1, PML, TRF1, TRF2, hTERT) de 4-5 champs optiques différents pris de la même lamelle. Le ratio noyau/cytosol est calculé (Logiciel LMS510, Zeiss) et normalisé en fonction du nombre de cellules et les valeurs sont exprimées en unités arbitraires.

3.6.2. Fondements de la microscopie confocale à balayage laser (MCBL)

Une des limitations de la microscopie classique à fluorescence est sa perte de résolution axiale due à la superposition d'informations issues des plans adjacents. L'arrivée de la microscopie confocale a permis de contourner ce problème et s'est récemment imposée comme moyen d'investigation volumique et temporelle de spécimens. Elle est basée sur la microscopie à fluorescence (c'est donc une technique de microscopie optique), mais la lampe à lumière blanche (mercure) est remplacée par

un laser, qui fournit une lumière parfaitement cohérente et monochromatique. Le laser est focalisé sur la préparation et seule la zone de focalisation sera suffisamment excitée pour émettre de la fluorescence, le reste de la préparation, que ce soit sur les côtés ou sur un autre plan de focalisation restent sombres (Pawley 1990; Matsumoto 1993; Stevens J.K. 1994). Une représentation 3D du spécimen est obtenue par construction d'une pile de coupes sériées 2D (Z-Stack), se référant à des sections optiques dans des plans confocaux. Le principe général de cette approche est schématisé sur la Figure 24. Le rayon laser excitateur pénètre dans l'échantillon préalablement marqué par des fluorochromes. Lors de l'impact optique, il y a émission de rayons lumineux provenant de différents plans de la préparation. Grâce à un diaphragme variable (*pinhole*), il est possible de sélectionner les rayons émis par un seul plan de préparation et d'éliminer

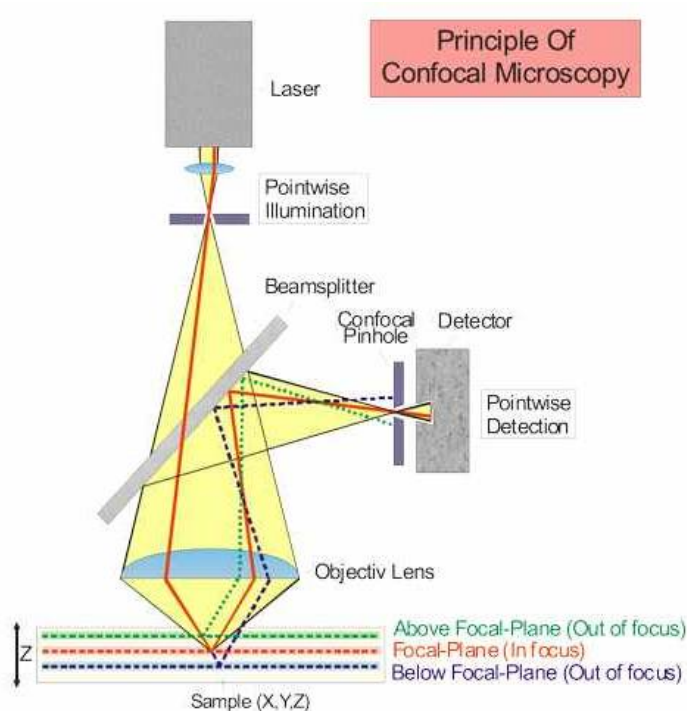


Figure 24 : Principe de la microscopie confocale à balayage laser (Tiré de <http://www.uni-paderborn.de/en>)

le signal provenant d'autres plans. En balayant par le laser tout le plan de focalisation, on obtient une image très nette de ce plan focal, les zones floues n'apparaissant plus. Les rayons réfléchis sont filtrés en fonction de leurs longueurs d'onde puis détectés par des photo-multiplificateurs et le signal reçu est enfin converti en signal numérique.

3.6.3. Ajustement des signaux photoélectriques convertis en signaux numériques par déconvolution

En optique, le terme de « déconvolution » est spécifiquement utilisé pour se référer aux processus qui corrigent les distorsions optiques (diffraction et aberrations des lentilles appelées convolution) liées à l'utilisation des microscopes, des télescopes, et autres instruments optiques. Elle permet ainsi de restaurer la résolution des images acquises et d'approcher la résolution qui serait obtenue en l'absence d'aberrations et de distorsions. La déconvolution permet donc d'obtenir des images plus claires, et plus proches de la réalité (Agard, Hiraoka et al. 1989; Conchello 1998). En prenant une image à chaque pas dans l'axe « Z », on obtient une série d'images parcourant le volume de l'échantillon (Z-stack). Les Z-stacks sont déconvolués par le logiciel Huygens Professionnal (Scientific Volume Imaging, Alexanderlaan, Pays-Bas). Des préparations de microbilles de latex calibrées et enrobées de chromophores (170 nm de diamètre, Invitrogen) sont chacune considérées comme un point source et dont l'image permet d'obtenir la PSF (*Point Spread Function*) correspondant à chaque marqueur fluorescent. Cette PSF est une référence. Le logiciel va redimensionner la PSF pour lui redonner une forme de bille en X-Y-Z et, parallèlement, va appliquer la même opération sur le Z-stack à déconvoluer (Figure 25). Le rapport signal sur bruit est

ensuite quantifié pour chaque marqueur et pour chaque Z-stack. Les images déconvoluées sont par la suite sauvées en images en séries TIF.

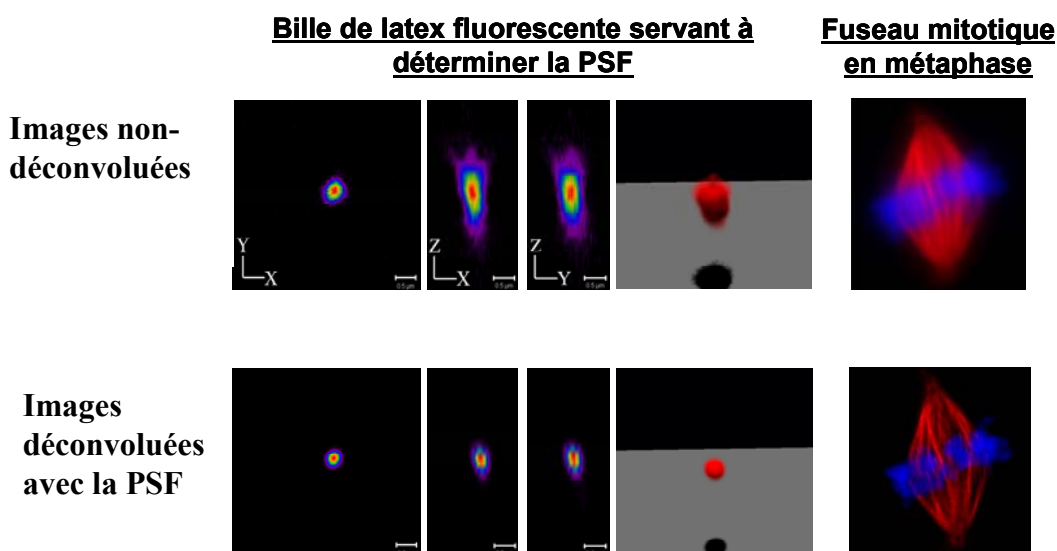


Figure 25 : Exemple d'images non-déconvoluées et déconvoluées par la PSF

3.7. Quantification des protéines cellulaires par immunobuvardage de type Western

Nous avons quantifié l'expression des protéines cytosoliques et nucléaires par une technique d'immunobuvardage de type Western. Cette technique emprunte le même principe que celui décrit précédemment pour l'immunobuvardage de type Southern. Elle utilise l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour séparer, en fonction de leur poids moléculaires, les protéines préalablement dénaturées. Ces protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose et hybridées avec un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt.

3.7.1. Extraction des protéines

Les protéines cytoplasmiques et nucléaires sont extraites séparément à l'aide d'un kit d'extraction (Pierce Biotechnology), en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Pierce Biotechnology). Les cellules endothéliales cultivées dans des boîtes de Pétri de 100 cm² (ou flasques de 75 cm²) sont lavées, grattées et collectées dans du PBS. Après une centrifugation de 5 minutes à 4°C à 4000 tours/minute, le surnageant est enlevé. À cette étape, le culot cellulaire peut être congelé à -80°C. Le jour de l'extraction, le culot de cellules est incubé dans un tube contenant 200 µl de tampon *CER I* en plus de 20 µl du cocktail d'inhibiteurs de protéases (10X). Le tube est vortexé vigoureusement pendant 15 secondes et incubé 10 minutes sur la glace. Onze microlitres de tampon *CER II* sont ensuite ajoutés et le tube est vortexé pendant 5 secondes, incubé sur la glace pendant 1 minute et finalement centrifugé pendant 5 minutes à 13000 tours/minute à 4°C. Le surnageant, qui constitue la fraction de protéines cytosoliques, est ensuite transféré dans un tube « *RNase free* » propre. Au culot restant, sont ajoutés 100 µl de tampon *NER* et 10 µl de cocktail d'inhibiteurs de protéases (10X). Le tube est ensuite vortexé pendant 15 secondes et incubé sur glace pendant 10 minutes. Ce cycle vortex/glace est répété quatre fois et le tube est enfin centrifugé pendant 5 minutes à 13000 tours/minute à 4°C. Le surnageant, qui constitue la fraction de protéines nucléaires, est ensuite transféré dans un tube propre. La quantification protéique est réalisée en se servant de la technique de dosage de Bradford. Trente-cinq microgrammes de protéines pour chacun des échantillons sont mis sur gel, le volume final étant complété par l'utilisation du tampon de lyse (*CER I*).

3.7.2. Description de la méthode d'immunobuvardage de type Western

Les échantillons de protéines (nucléaires ou cytosoliques, 35 µg) de cellules endothéliales en début de culture (passage initial) et à sénescence (passage final) sont déposés dans un gel d'acrylamide SDS-PAGE avec un gradient 10/20% (w/v) (ProteanIXi system, BioRad) avec un marqueur de poids moléculaire (BioRad). Un courant de 45 mA/gel est imposé par un générateur de courant (BioRad) afin de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaires. Par la suite, les échantillons protéiques sont transférés sur une membrane de nitrocellulose (Trans-Blot, BioRad) à 100V, pendant 90 minutes à 4°C, dans un tampon de transfert ayant la composition suivante: 25 mM de Tris base, 192 mM de glycine et 5% de méthanol. Les sites non spécifiques sont ensuite bloqués pendant 2h avec du lait 5% (Carnation) dans : 25 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM de NaCl ainsi que 0.05% de Tween 20 (TBST). Les membranes sont par après incubées pendant 16-18h avec l'anticorps primaire approprié (anti-p53 de souris, 1:200, Upstate; anti-p21 de souris, 1:250, Santa Cruz; anti-TRF1 de souris, 1:200, Sigma; anti-TRF2 de lapin, 1:200, Santa Cruz; anti-GAPDH de souris, 1:100 000, Ambion; anti-nucléoporeine de souris, 1:200, BD Biosciences) dilué dans du lait 5%-TBST pour ensuite être lavées (3x 10 minutes) à la température de la pièce avec du TBST et bloquées une dernière fois pendant 10 minutes dans une solution à base de lait 5%-TBST. Les membranes sont, par la suite, incubées pendant 2h avec leur anticorps secondaire respectif dilué dans du lait 5%-TBST (horseradish peroxidase-conjugated, 1:20 000). Finalement, une dernière série de lavages avec du TBST est effectuée (3x 10 minutes) afin d'enlever l'excès d'anticorps secondaire non

lié. Les bandes sont enfin révélées par chemiluminescence (West Femto, Pierce Biotechnology pour p21; Renaissance Plus, Perkin-Elmer Life Sciences pour p53, TRF1, TRF2, nucléoporine et GAPDH) sur des films Bio-Max (Kodak) selon les instructions du manufacturier. L'expression de chacune des protéines étudiées est normalisée par l'expression de la nucléoporine ou GAPDH qui ne variaient pas avec les différentes conditions expérimentales (sénescence, antioxydant, infection) et quantifiée par un logiciel par densité optique (Quantity One).

3. 8. Quantification de l'expression génique par pcr en temps réel

Afin d'étudier la variation de certains gènes associés à la sénescence et à la fonction endothéliale, nous avons mesuré de façon quantitative l'expression de l'ARN messager des gènes de la cavéoline-1 (Cav-1), d'ATM, p53, et du GAPDH (études #1-4), p21, Cox-1, Cox-2, et de la eNOS (études #1 et 3), de la hTERT et p16 (étude #3), (étude #4) ainsi que le VEGF-A et Angptl2 par une réaction en chaîne de la polymérase en temps réel (*real-time polymerase-chain reaction, qPCR*). L'avantage du qPCR par rapport au PCR semi-quantitatif (point final) repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non uniquement à la fin de la réaction de PCR. Des sondes fluorescentes se fixent sur l'ADN double brin (technologie SYBR). Ces sondes ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN. Un seuil de fluorescence est établi par le programme de la machine qPCR (MxPro3005P, Stratagene). Une fois que la quantité d'ADN amplifiée permet aux sondes fluorescentes

de dépasser ce seuil, on obtient un numéro de cycle PCR appelé "Ct" (*Cycle threshold*) qui constitue le cycle-seuil. C'est cette valeur qui est à la base des calculs pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative.

3.8.1. Isolation de l'ARN total

Toutes les étapes ci-dessous sont effectuées dans un environnement et avec du matériel *RNase free* selon le protocole du manufacturier (RNeasy mini kit, Qiagen). Les cellules confluentes, cultivées dans une boîte de Pétri de 100 mm², sont rincées deux fois avec du PBS stérile. Puis, 600 µl de tampon RLT sont ajoutés dans la boîte et les cellules sont grattées et transférées dans un tube propre et vortexées pendant 10 secondes. Les cellules sont congelées à -80°C jusqu'au jour de l'extraction de l'ARN. Le lysat cellulaire est pipeté dans une colonne *QIAshredder* et centrifugé à 13000 tours/minute pendant 2 minutes. Un volume (\pm 500 µl) d'éthanol 70% est ensuite ajouté mélangé au lysat cellulaire par pipettage. Le mélange est transféré dans une colonne à centrifugation RNeasy placée sur un tube de 2 ml. La colonne est centrifugée à 13000 tours/minute pendant 15 secondes et le filtrat est jeté. Le même cycle de centrifugation est effectué à nouveau en ajoutant 350 µl de tampon RW1 afin de laver la colonne. Le filtrat est jeté. Ensuite, afin d'éliminer toutes traces d'ADN génomique, 10 µl d'une solution de DNase I sont ajoutés à 70 µl de tampon RDD (Qiagen), la solution est mélangée, placée sur la colonne RNeasy et incubée à la température de la pièce pendant 15 minutes. La colonne est centrifugée à 13000 tours/minute pendant 15 secondes et le filtrat est jeté. Par après, 500 µl de tampon RPE sont ajoutés à la colonne et un autre cycle de centrifugation est effectué, le filtrat résultant étant jeté. Une

seconde centrifugation avec 500 μ l de RPE est réalisée mais pendant 2 minutes cette fois afin d'assécher la membrane de la colonne. La colonne est transférée sur un tube collecteur et 30-50 μ l d'eau *RNase free* est ajouté directement sur la membrane de la colonne. Une dernière centrifugation est faite à 13000 tours/minute pendant 1 minute afin d'éluer l'ARN. La concentration d'ARN ainsi extrait est finalement quantifiée par spectrométrie (*Thermo Scientific Nanodrop*, ND1000) à 260 nm et 280 nm.

3.8.2. Production du brin d'ADN complémentaire

Une réaction de transcription déclenchée par l'enzyme MMLV (Invitrogen) sert à obtenir un brin d'ADN complémentaire (ADNc) qui sera amplifié par le qPCR. Pour chaque réaction de transcription inverse, 1 μ g d'ARN total est utilisé auquel sont ajoutés dans un tube *RNase-free*, 1 μ l (100 ng) d'amorces hexamères aléatoires Pd(n)6, 1 μ l de mélange dNTP (10 mM), 1 μ l d'oligo dT dans un volume de 13 μ l. Une réaction de dénaturation est ensuite effectuée à 65°C pendant 5 minutes avant de l'arrêter en incubant les tubes sur la glace pendant 2 minutes. Puis sont ajoutés à la solution 4 μ l de tampon de réaction *first strand* (5X), 2 μ l de dTT et 1 μ l de l'enzyme M-MLV pour un volume final de 20 μ l ce qui donnera un produit de ADNc à une concentration finale de 50ng/ μ l. Le cycle de transcription inverse se fait comme suit : 25°C pendant 10 minutes, 37 °C pendant 50 minutes, 70 °C pendant 15 minutes.

3.8.3. Design des amorces spécifiques

Nous avons utilisé le logiciel *Clone Manager* afin de générer des amorces spécifiques pour les gènes de nos études en prenant bien soin que les amorces de

chaque paire soient situées dans deux exons distincts chevauchant un intron. La spécificité des séquences de chacune des amorces a été vérifiée à l'aide du programme *Blast*, disponible à partir du National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Les séquences des paires d'amorces utilisées pour nos études sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2: Séquences des amorces utilisées

Gènes	(5'- 3') Sens	(5'- 3') Antisens	#Étude
ATMA	<i>GGCAGCTGATATTCGGAGGA</i>	<i>CATCTTGGTCACGACGATAC</i>	#1, 2, 3, 4
Cavéoline-1	<i>GCTGAGCGAGAAGCAAGTGT</i>	<i>TGGTGAAGCTGGCCTTCCAA</i>	#1, 2, 3, 4
p16	<i>CATAGATGCCGCGGAAGGT</i>	<i>TGTAGGACCTTCGGTACTG</i>	#3
p21	<i>GGACCTGTCACTGTCTTGTA</i>	<i>CCTCTTGGAGAAGATCAGCCG</i>	#1, 3
p53	<i>TGAGGTTGGCTCTGACTGTA</i>	<i>TTCTCTCCTCTGTGCGCCG</i>	#1, 2, 3, 4
Cox-1	<i>AAGGCACCAACCTCATGTTTG</i>	<i>CAGGACCCATCTTGCCAGAG</i>	#1, 3
Cox-2	<i>TGGCGCTCAGCCATACAG</i>	<i>GGTACAATCGCACTTATACTGGTCAA</i>	#1, 3
eNOS	<i>GCCAACGCCGTGAAGATCT</i>	<i>CATACAGGATTGTCGCCTTCACT</i>	#1, 3
hTERT	<i>GAGGAGATCCTGGCCAAGTT</i>	<i>TCGTAGTTGAGCACGCTGAA</i>	#3
VEGF-A	<i>GAGGGCAGAATCATCACGAA</i>	<i>AGGAGTCCAACATCACCATG</i>	#4
Angptl-2	<i>GCAATGCGGGTGACTCCTT</i>	<i>TACCAGGACGGAGTCTA</i>	#4
GAPDH	<i>CTGCACCACCAACTGCTTAGC</i>	<i>ACTGTGGTCATGAGTCCTTCCA</i>	#1, 2, 3, 4

La spécificité des paires d'amorces est validée en observant un seul produit d'amplification (amplicon) de la réaction sur un gel d'agarose. La température de dissociation ainsi que le poids moléculaire de l'amplicon doivent correspondre à chacune des paires d'amorces spécifiquement.

3.8.4. Mise au point des courbes standards

Pour chacune des paires d'amorces des gènes, une courbe standard est d'abord effectuée afin de pouvoir comparer chacune des expérimentations entre elles. Pour ce faire, nous avons utilisé de l'ADN complémentaire provenant de cellules endothéliales d'aorte saine humaine (hAoEC) achetées commercialement (Lonza) nous permettant

d'avoir du matériel en quantité suffisante. Ces courbes sont construites à l'aide de huit concentrations croissantes en duplicata d'ADNc allant de 0.156 ng à 20 ng. Les courbes standards élaborées doivent présenter un pourcentage d'efficacité situé entre 90% et 100% et un coefficient de corrélation (r^2) le plus près possible de 1 (Figure 26).

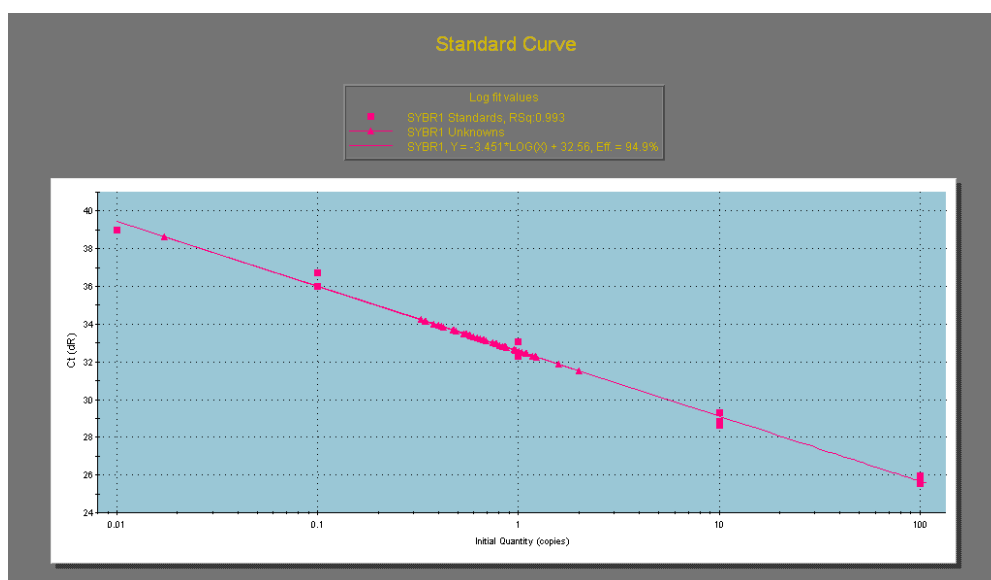


Figure 26 : Exemple de courbe standard pour un gène donné (■ : standard, ▲ : échantillons)

3.8.5. Acquisition des résultats

Pour les quatre études, nous avons effectué les qPCR sur 200 ng d'ADNc de chacun des échantillons à passage initial (début de culture) et à passage final (sénescence). Chaque réaction est réalisée dans un volume final de 25 μ l comprenant 5 μ l de paires d'amorces spécifiques pour chaque gène (sens et antisens, 300 nM final), 5 μ l d'ADNc (200 ng final), 2.5 μ l de ROX (30 nM final) et 12.5 μ l de mélange SYBR Green PCR (2X, Stratagene). En plus d'un contrôle négatif (*No Template Control*, *NTC*) où l'ADNc est remplacé par de l'eau ddH₂O, chaque plaque-expérience possède un échantillon identitique servant de contrôle interne afin de pouvoir comparer toutes

les plaques collectivement. Les réactions sont effectuées à l'aide de l'appareil MxPro3005P (Stratagene) selon les cycles suivants: 10 minutes à 95°C, 40 fois 30 secondes à 95°C et 1 minute à 55°C et 30 secondes à 72°C, 1 minute à 95°C, 30 secondes à 55°C. Les figures 26 et 27 représentent respectivement, un exemple des courbes d'amplification du gène de ATM de différents échantillons ainsi que des courbes de dissociation associées aux amplicons amplifiés.

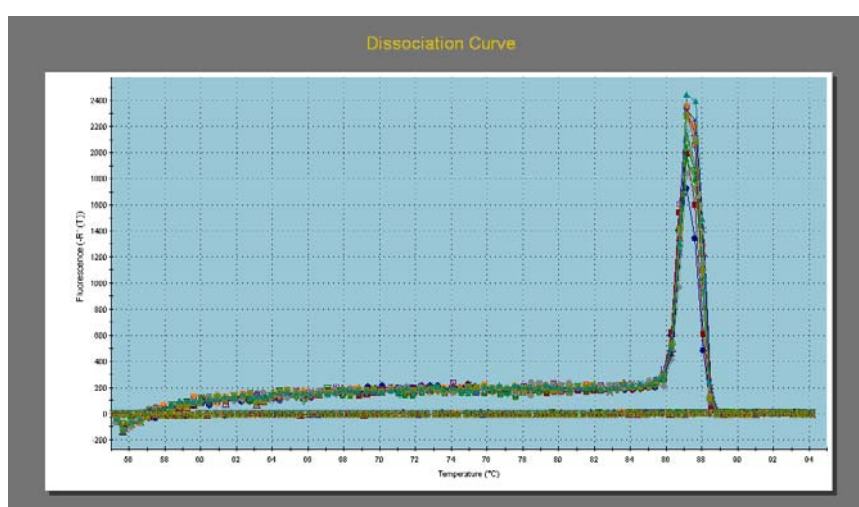


Figure 27 : Exemple de courbes d'amplification pour le gène ATM

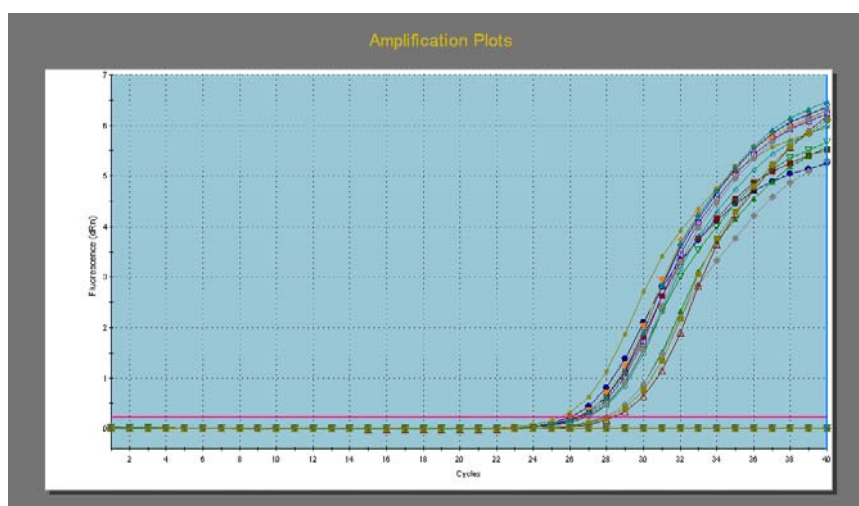


Figure 28 : Exemple de courbes de dissociation de l'amplicon obtenu pour le gène ATM

3.8.6. Analyse et présentation des résultats

Le qPCR a comme but de détecter les légères variations d'expression génique. Comme décrit ci-dessus, l'appareil capte l'intensité de la fluorescence relative qui sera proportionnelle à la quantité d'ADNc amplifié. Nous avons utilisé le logiciel MxPro3005P (Stratagene) afin de comparer nos résultats obtenus entre eux. Pour ce faire, chacune des plaques effectuées contient un échantillon identique qui est considéré comme le calibrateur. Ce calibrateur est un échantillon à passage initial ayant une grande concentration en ARN total, en vue des nombreuses expérimentations à réaliser. Ainsi, l'expression génique de tous les échantillons a été comparée par rapport à ce même calibrateur, permettant ainsi d'avoir ainsi une référence uniforme. Les différences des valeurs Ct (*Cycle threshold*) entre les échantillons et le calibrateur sont exprimées en augmentation ou diminution de changements relativement au calibrateur. Par ailleurs, en plus de quantifier l'expression de l'ARNm des différents gènes, celle du GAPDH a également été faite. Ce gène dit de « ménage » ne varie dans aucune des conditions expérimentales (sénescence, traitement avec le NAC, surexpression de la hTERT). Ainsi, chaque amplification des gènes d'intérêt était normalisée à ce gène de référence afin de relativiser les légères variations d'isolation d'ARN et d'efficacité de réaction de transcriptase inverse inhérentes au protocole. Le programme MxPro calcule les différences de Ct du gène d'intérêt dans les échantillons expérimentaux et le calibrateur, puis relativise ces différences en utilisant l'écart de Ct du gène normalisateur, le GAPDH, dans les échantillons expérimentaux et le calibrateur. Lorsque normalisé avec le gène de référence, le résultat exprimant l'expression du

gène d'intérêt d'un échantillon donné après amplification par rapport au calibrateur peut être calculé selon l'équation suivante :

$$\frac{\text{Échantillon}}{\text{Calibrateur}} \text{ Normalisé} = \frac{(1-E_{\text{gène d'intérêt}})^{-\Delta Ct_{\text{gène d'intérêt}}}}{(1-E_{\text{gène de référence}})^{-\Delta Ct_{\text{gène de référence}}}}$$

Où la variable E correspond au nombre de produits d'amplification lors de chaque cycle (entre 0 et 1), donc à l'efficacité de l'amplification du gène d'intérêt, Ct représente le cycle seuil (*Cycle threshold*). Mathématiquement, cette équation est souvent décrite comme la méthode du $\Delta\Delta Ct$ puisqu'elle peut être simplifiée selon cette formule:

$$\frac{\text{Échantillon}}{\text{Calibrateur}} \text{ Normalisé} = \frac{2^{-\Delta Ct_{\text{gène d'intérêt}}}}{2^{-\Delta Ct_{\text{gène de référence}}}} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

3.9. Quantification de l'activité de la télomérase

Dans les deuxième et troisième études, nous avons quantifié l'activité de la sous-unité de la télomérase par deux variantes d'une même technique appelée *Telomeric Repeat Amplification Product (TRAP)*, le TRAP conventionnel sur gel et le TRAP en temps réel (*real-time TRAP assay*). La télomérase est une ribonucléoprotéine responsable principalement du rallongement des télomères $[5'\text{-TTAGGG-}3']_n$ aux extrémités chromosomiques. Elle est composée d'une sous-unité catalytique (TERT) et d'une sous-unité matricielle d'ARN correspondant à la séquence télomérique (TERC) (Greider and Blackburn 1985; Yu, Bradley et al. 1990). Le TRAP consiste à incuber un extrait protéique à l'aide de deux amorces : l'ACX (5'-GCGCGG[CTTACC]₃CTAACC-3') ainsi qu'une seconde qui mime le rôle de la

matrice d'ARN, la M₂-TS (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'). Le TRAP est réalisé en deux temps: une première incubation consiste à faire allonger les séquences télomériques par la télomérase. Cette dernière utilise ses sous-unités TERT et TERC afin d'ajouter des hexamères télomériques à l'extrémité 3' de l'amorce M₂-TS (Figure 29). Selon son activité, la télomérase synthétisera plus ou moins de fragments télomériques. Lorsque l'élongation est suffisamment longue, l'amorce ACX peut se lier aux fragments produits. Cette amorce est composée à son extrémité 5', de 3 hexamères télomériques mutés et d'une séquence de 6 nucléotides (bras) à son extrémité 3'. Ensemble, ces séquences mutées et le bras lui permettent d'augmenter sa stabilité et sa spécificité de liaison et de se lier uniquement à l'extrémité 3' durant la deuxième étape. Il s'agit d'une réaction de PCR qui utilise la Taq polymérase afin d'amplifier les fragments produits à l'aide des amorces M₂-TS (sens) et ACX (antisens) (Figure 30). Selon le nombre de séquences hexamériques ajoutées par la télomérase, plusieurs produits de différents poids moléculaires seront amplifiés. Plus la télomérase est active, plus longs seront ses produits finaux (Kim, Piatyszek et al. 1994; Broccoli, Young et al. 1995).

Le TRAP conventionnel consiste à prendre les produits de la télomérase amplifiés et à les séparer par gel d'électrophorèse selon leur poids moléculaires (Kim and Wu 1997). L'amorce M₂-TS pouvant être marquée à l'aide d'un isotope radioactif ou bien d'un marqueur chimiluminescent, l'intensité des bandes amplifiées peut être quantifiée par densité optique mais cette méthode se veut plus qualitative que quantitative. Le TRAP en temps réel consiste lui, à prendre les produits de synthèse de la télomérase et à les amplifier selon un protocole de *real-time PCR* (Ohuchida, Mizumoto et al. 2005). Ceci permet de voir l'évolution des amplifications de produits

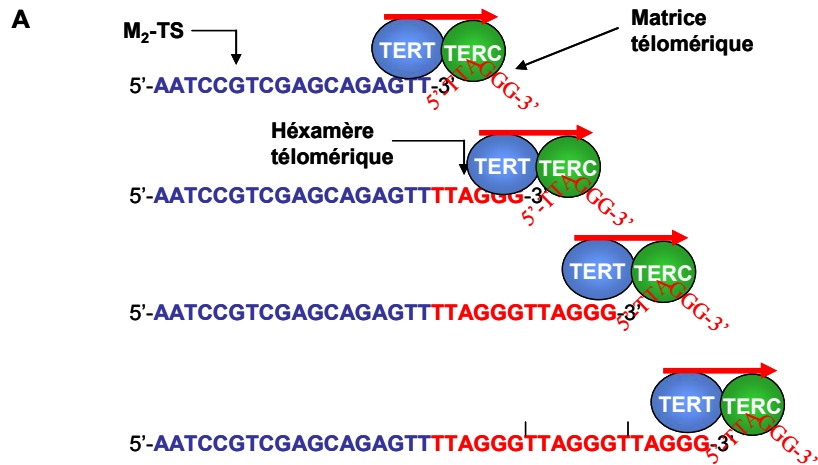


Figure 29. Première étape du TRAP

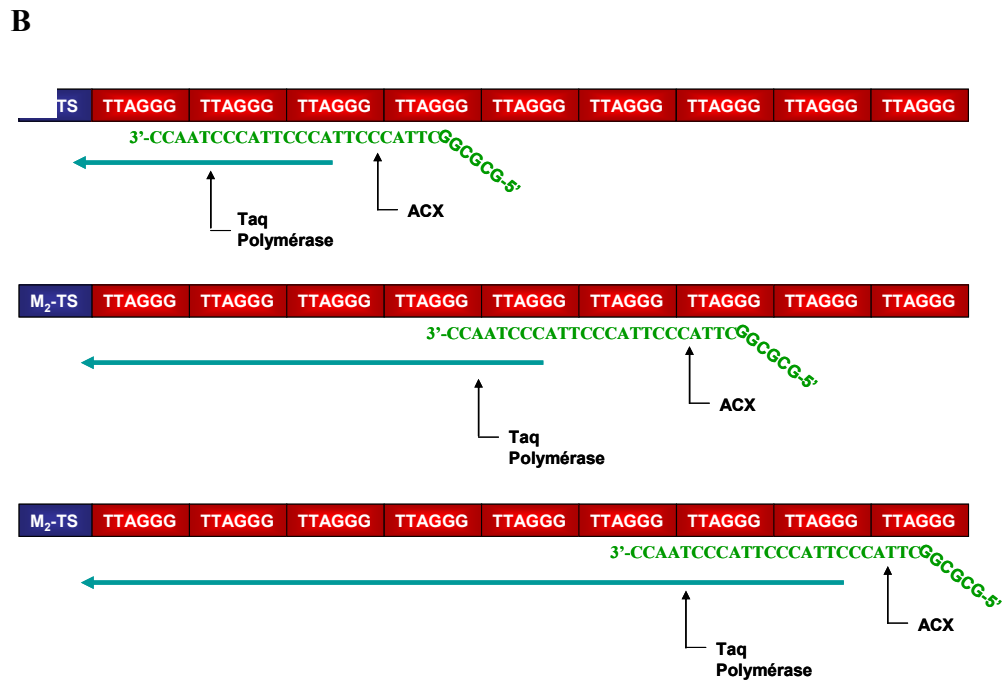


Figure 30. Deuxième étape du TRAP

et de quantifier d'une façon beaucoup plus précise (100x plus sensible que le gel) les subtiles variations d'activités de la télomérase à l'intérieur de cellules endothéliales,

ces dernières étant reconnues pour n'avoir qu'une faible activité de la télomérase (Blasco 2005).

3.9.1. Extraction des protéines

L'extraction des protéines cytosoliques et nucléaires est effectuée comme décrit précédemment. Étant donné que la technique du *TRAP assay* quantifie l'amplification de fragments télomériques à base d'une matrice d'ARN, une attention particulière est appliquée concernant l'environnement et le matériel de laboratoire *RNase free*.

3.9.2. Description de la méthode du TRAP conventionnel sur gel

Le TRAP conventionnel sur gel étant une technique moins sensible, elle a été utilisée uniquement lors de la troisième étude impliquant une surexpression de la télomérase. Dans cette méthode, une première étape consiste à amplifier la matrice télomérique par la télomérase. Les activités cytosolique et nucléaire de la télomérase ont été quantifiées à passage initial (début de culture) et à passage final (sénescence). Initialement, l'amorce sens M₂-TS est marquée avec de [γ -³²P]-ATP en prenant dans un tube 1.1 μ l de l'oligonucléotide M₂-TS (0.6 μ g), 0.6 μ l du tampon de réaction de la kinase polynucléotide (10X), 3 μ l de [γ -³²P]-ATP (30 μ Ci), 1 μ l de la kinase polynucléotide T4 (1 unité) et 0.3 μ l d'eau DEPC pour un volume final de 6 μ l. Ce tube est incubé 1h à 37°C et la réaction est arrêtée pendant 2 minutes à 95°C. Ensuite, 1 μ g de protéines (2 μ l de 0.5 μ g/ μ l) est ajouté dans un tube auquel sont mis 5 μ l de tampon de TRAP 10X (200 mM Tris-HCL pH 8.3, 15 mM MgCl₂, 680 mM KCl, 0.5%

Tween20, 10 mM EGTA), 0.25 μ l de dNTP (10 mM), 0.09 μ l de l'amorce sens M₂-TS marqué avec le [γ -³²P]-ATP, 1.8 μ l de l'amorce antisens ACX (50 ng/ μ l) et 0.4 μ l de Taq polymérase (2 unités) le tout complété à 50 μ l avec de l'eau DEPC. La réaction PCR est effectuée selon les cycles suivants: 30 minutes à 27°C, 2 minutes à 94°C, 30 fois (10 secondes à 94°C, 25 secondes à 50°C, 30 secondes à 72°C), 15 secondes à 94°C, 25 secondes à 50°C et 1 minute à 72°C. Vingt-cinq microlitres de la réaction auxquels nous avons ajouté 2.5 μ l de tampon de chargement (*loading buffer*) contenant du bleu de bromophénol (1X) sont ensuite mis dans les puits d'un gel d'acrylamide 40% (19:1). Les produits d'amplification migrent par électrophorèse en soumettant le gel à un courant de 180V dans du TBE 0.5X (solution 10X = Tris 0.89M, acide borique 0.89M, Na₂EDTA 0,02M pH 8,0 ajusté avec de l'eau pour avoir un volume de 1L final) pendant 45 minutes et 300V pendant 2h jusqu'à ce que le front de migration (bleu de bromophénol) sorte. Le gel est ensuite exposé pendant 45 minutes dans une cassette à autoradiographie (BioRad) puis révélée à l'aide d'un phosphoImager (BioRad). Pour chaque expérience, nous avons utilisé comme contrôles positifs, des dilutions de cellules tumorales HEK293 (2 μ g, 0,2 μ g, 0,02 μ g, Invitrogen) et un échantillon contenant uniquement de l'eau DEPC comme contrôle négatif. De plus, chaque échantillon étudié en duplicata possède également son propre contrôle négatif inactivé 20 minutes à 95°C. Cette expérience se voulant simplement tracer un portrait qualitatif de l'activité de la télomérase, aucune quantification n'a été effectuée.

3.9.3. Description de la méthode du TRAP en temps réel

Le TRAP en temps réel est une technique très sensible et quantitative effectuée selon la méthode du qPCR. La différence par rapport au TRAP sur gel, est une étape initiale supplémentaire servant à activer la télomérase et amplifier la matrice télomérique. Nous avons quantifié l'activité de la télomérase cytosolique et nucléaire à passage initial (début de culture) et à passage final (sénescence) à l'aide du TRAP en temps réel dans la deuxième, troisième et quatrième études. Dans une plaque à 96 puits (Stratagene), 2 ng de protéines (1 ng/ μ l) ont été déposés par puit dans lesquels sont ajoutés 5 pmol de l'amorce sens M₂-TS, 1.25 pmol de l'amorce antisens ACX, 300 nM ROX, le tout ajusté à 12.5 μ l avec de l'eau DEPC. Ensuite, sont ajoutés 12.5 μ l de mélange SYBR Green PCR (2X, Stratagene). La réaction PCR est effectuée selon les cycles suivants: 30 minutes à 27°C, 10 minutes à 95°C, 40x (30 secondes à 95°C, 1 minute à 50°C, 30 secondes à 72°C), 1 minute à 95°C. Pour chaque expérience, une courbe standard est réalisée en utilisant des cellules tumorales HEK293 (50 pg, 100 pg, 1 ng, 10 ng, 100 ng, 1 μ g, 2 μ g et 5 μ g, Invitrogen). Tous les échantillons sont étudiés en triplicata avec leur propre contrôle négatif inactivé 20 minutes à 95°C. L'activité enzymatique de la télomérase est exprimée en unité arbitraire où une unité correspond à l'activité de 1ng de cellules HEK293. La limite de détection de l'activité endogène de la télomérase est établie comme étant la valeur obtenue dans des échantillons contenant 2 μ l de tampon de lyse protéique (*No Template Control, NTC*) remplaçant les protéines.

3.10. Quantification du stress oxydant et de la capacité antioxydante

Afin de quantifier la présence de stress oxydant dans les cellules endothéliales, les niveaux de 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) ont été mesurés par immunofluorescence comme décrit ci-dessus. Les HNE sont un produit de la peroxydation des lipides membranaires dérivé d'acides gras ω -6 polyinsaturés oxydés tels que l'acide arachidonique (Pryor and Porter 1990; Esterbauer, Schaur et al. 1991). La quantification des HNE constitue un bon indicateur de l'exposition cellulaire au stress oxydant et nous l'avons donc utilisé dans nos quatre études. Nous avons également utilisé la sonde 5-(and -6) – chloromethyl - 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H₂DCFDA, Molecular Probe), un marqueur non-spécifique des radicaux libres. En présence d'estérases intracellulaires, la sonde CM-H₂DCFDA est hydrolysée pour former du DCFH à l'intérieur de la cellule. En présence de stress oxydant, ce dérivé est oxydé pour former le DCF, un produit très fluorescent (Keston and Brandt 1965). La fluorescence de la sonde induite par le stress oxydant est quantifiée par fluorimétrie à l'aide d'un microscope confocal. De plus, dans la troisième et quatrième étude, nous avons utilisé le CM-H₂DCFDA afin de quantifier indirectement la capacité antioxydante endogène de nos cellules. L'intensité de la fluorescence est quantifiée à l'état basal et en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

3.10.1. Quantification du stress oxydant

À différents niveaux de sénescence, les cellules endothéliales sont trypsinisées, resuspendues, déposées dans une boîte de Pétri dont le fond est une lamelle (Mattec) et incubées à 37°C (95% air atmosphérique/5% CO₂) jusqu'à ce qu'elles adhèrent et prolifèrent. La mesure du stress oxydant par DCFDA se fait sur des cellules vivantes. Les cellules sont lavées trois fois avec du PBS afin de retirer l'excédent de milieu de culture, le phénol rouge inclus pouvant altérer les données fluorescentes acquises par microscopie confocale. Les cellules sont ensuite incubées 30 minutes à 37°C avec 5 µM de CM-DCFDA dilué dans un DMEM dépourvu de phénol rouge (Invitrogen), lavées et incubées une autre fois 15 minutes à 37°C pour équilibration dans du DMEM sans couleur. La fluorescence basale est observée au microscope confocal à une longueur d'onde de 488 nm (LSM 510 Zeiss). Comme contrôle négatif, des cellules non-traitées avec le CM-DCFDA sont utilisées afin d'observer le niveau d'autofluorescence. Les mêmes paramètres ont été utilisés pour toutes les quantifications de stress oxydant dans les différentes cellules étudiées (objectif 63x 1.4 plan-Apochromat oil, laser Argon 488 nm, 0.1% transmission; miroir dichroïque HFT 488 avec filtre LP505, taille d'ouverture 1.7 Airy units). La résolution des images est de 512x300 pixels. L'intensité de fluorescence est un indice du stress oxydant.

3.10.2. Quantification de la capacité antioxydante endogène

Les cellules endothéliales isolées à partir d'artères mammaires internes humaines provenant de patients athérosclérotiques présentent un niveau basal instable de fluorescence, niveau qui augmente significativement avec le temps (Figure 31A,B).

Afin de contourner ce problème, qui n'est pas observé dans des cellules endothéliales saines, nous avons modifié le protocole consistant normalement à mesurer l'intensité de la fluorescence induite par le stress oxydant: les cellules sont exposées au rayon laser jusqu'à ce que le signal sature (fluorescence maximale, Figure 31A-C). Ensuite, des cellules du même échantillon mais dans un autre champ, sont exposées à 100 μM de H_2O_2 exogène de manière à atteindre le niveau maximal d'activité oxydative, le signal ainsi obtenu est enregistré jusqu'à saturation (Figure 31A,C). Les mêmes paramètres sont utilisés pour toutes les quantifications de stress oxydant dans les différentes cellules étudiées. À partir des deux profils de saturation de fluorescence obtenus avec le logiciel LSM 510 software (Zeiss LSM 510 microscope confocal), le temps et l'intensité de fluorescence nécessaires pour atteindre 50% de saturation dans les cellules contrôles et stimulées au H_2O_2 sont calculés. Le $\Delta\text{temps}_{50\%(\text{contrôle}-\text{H}_2\text{O}_2)}$, est un indicateur de défense antioxydante intrinsèque: plus le Δtemps est court, plus la capacité antioxydante des cellules est faible.

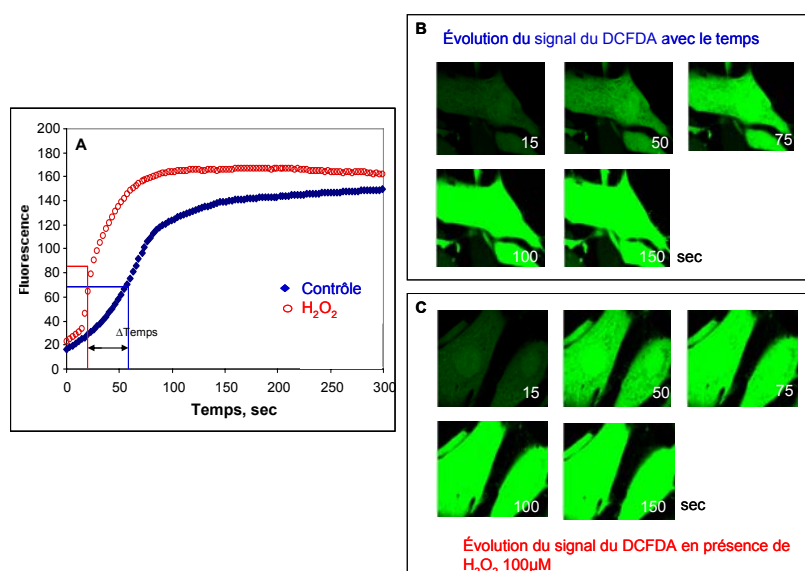


Figure 31: Quantification de la capacité antioxydante endogène

3.11. Infection lentivirale

Les vecteurs viraux sont aujourd'hui un outil très utilisé en biologie moléculaire. Bien que ces vecteurs soient créés à partir de virus pathogéniques, ils sont modifiés de manière à minimiser les risques de manipulation en détruisant une partie de leur génome viral. Ils ont été développés comme alternative aux méthodes conventionnelles de transfection en thérapie génique ou en clonage moléculaire (eg. liposomes). Les vecteurs viraux ont l'avantage de pouvoir infecter près de 100% des cellules sans altérer leur viabilité, et d'intégrer de manière stable leur matériel génétique. Il existe différents types de vecteurs dont les rétrovirus, les adénovirus, et les lentivirus. Ces derniers sont une sous-classe de rétrovirus. Leur principal avantage est de pouvoir intégrer leur génome autant dans des cellules prolifératives que celles ne se divisant pas (quiescentes, sénescences). Leur génome viral est sous forme d'ARN et est reverse transcrit lorsque le virus pénètre la cellule-hôte (*target cell*) pour produire de l'ADN. Pour des raisons de sécurité, les vecteurs lentiviraux ne possèdent pas les gènes requis pour leur propre division (Goldsby RA 2000). Des cellules d'empaquetage (*packaging cells*) sont habituellement utilisées dans lesquelles sont transfectés, en plus du plasmide d'intérêt, différents plasmides codant pour des protéines virales nécessaires à la capsidation, l'enveloppe et à la transcriptase inverse (Figure 32).

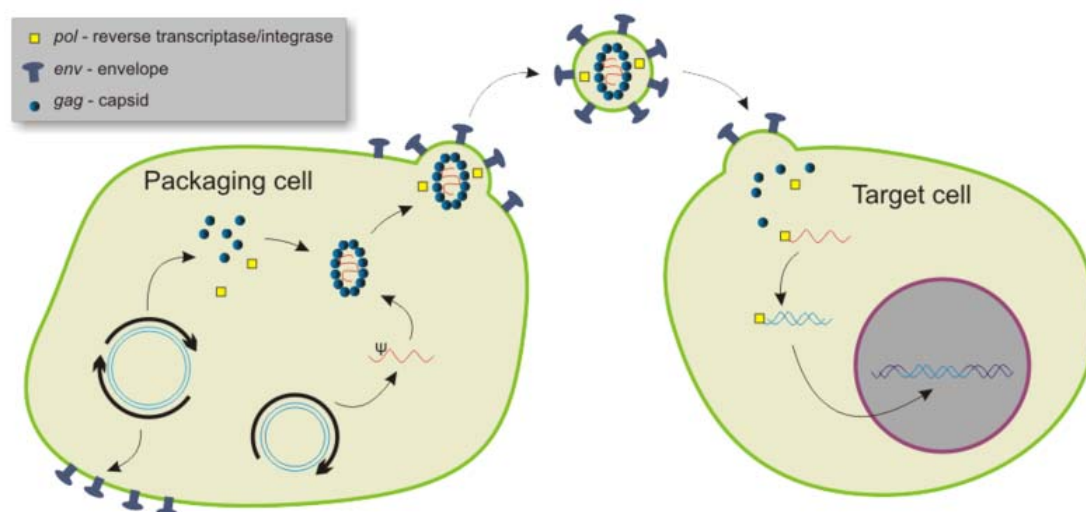


Figure 32: Infection par des lentivirus (Tiré de Goldsby *et al.*, 2000)

3.11.1. Description de la méthode

Le vecteur lentivirus FG12-CMV, un dérivé de FG12 (Qin, An *et al.* 2003), est une gracieuseté du Dr. Maria S. Soengas (University of Michigan, Ann Arbor, USA) et le gène d'intérêt inséré dans le vecteur rétroviral pBabe-PURO-hTERT provient du laboratoire du Dr Gerardo Ferbeyre (Université de Montréal). Dans un premier temps, les plasmides sont digérés à l'aide des enzymes de restriction *EcoR I* et *Xho I*, ce qui permet d'extraire le gène d'intérêt hTERT du vecteur pBabe afin de l'insérer par ligation dans le vecteur FG12-CMV. La préparation des lentivirus s'effectue par une transfection au phosphate de calcium de cellules d'emballage HEK293. Ces cellules sont cultivées dans du milieu de culture DMEM (10% FBS, 1% pénicilline/streptomycine). Trois boîtes de Pétri de 150 mm² (8×10⁶ cellules/boîte) de cellules HEK sont utilisées pour infecter une culture (100 mm²) de cellules

endothéliales d'artères mammaires. Le mélange de plasmides lentiviraux (Gag-Pol 34.5 µg, Rev 3.6 µg, Tat 3.6 µg et VSV-G 3.6 µg) contenant le vecteur lentiviral (28 µg du vecteur vide FG12-CMV ou possédant le gène d'intérêt FG12-CMV-hTERT) est introduit dans une solution de 1.5 ml de CaCl₂ 250 mM. Cette solution est déposée goutte à goutte dans un tube contenant 1.5 ml de *Hank Buffer Saline* (HBS 2X, Gibco) en vortexant vigoureusement. Cinq minutes plus tard, le mélange HBS-CaCl₂-plasmides est déposé à une hauteur de ± 5-6 cm, goutte à goutte sur les cellules HEK. Six heures après, le milieu de culture est remplacé par du milieu frais (DMEM, 10% FBS, 1% pénicilline G/streptomycine). Les cellules sont incubées pendant 24h à 37°C dans un environnement comprenant 95% d'air atmosphérique et 5% de gaz carbonique (CO₂). Vingt-quatre heures post-infection, 10 mM de Na-butyrates sont ajoutés au milieu de culture ce qui augmente l'expression virale. Le milieu de culture est remplacé après 24h. Les cellules d'empaquetage libérant les virus produits, le surnageant est collecté 44h post-transfection, remplacé par du milieu de culture frais, filtré (0.45 µm) et centrifugé pendant 2h à 4°C à 87 000g (rotor SW 28, Beckman). Deux autres collectes sont effectuées à 52h et 60h post-transfection. Après décantation, les virus collectés sont resuspendus dans 200 µl de PBS stérile pendant 2h à 4°C. Les virus prélevés lors des trois collectes sont mélangés ensemble et trois infections (0h, 3h et 7h) sont réalisées en utilisant environ 750 µl/boîte (100mm² de cellules endothéliales d'artères mammaires) de mélange viral additionné de 4 µg/ml de polybrène (Sigma), un composé qui augmente l'efficacité de l'infection. Pour un même patient, les cellules endothéliales ont été infectées avec le vecteur lentiviral vide (FG12-CMV) ou avec le vecteur possédant le gène d'intérêt de la sous-unité catalytique de la télomérase (FG12-

CMV-hTERT) et traitées ou non avec NAC (Figure 20). Vingt-quatre heures post-infection, le milieu de culture des cellules endothéliales est remplacé par du frais (DMEM, 10% sérum foetal bovin, 10% de sérum de veau, 1% pénicilline/streptomycine, 90 µg/ml sels de sodium héparine (Sigma), 60 µg/ml suppléments de croissance pour cellules endothéliales (Beckton Dickinson), et 100 U/ml fungizone (Gibco)).

3.12. Analyses statistiques

Les résultats pour les variables continues sont présentés dans les études sous forme de moyennes±SEM. Des tests Student-t non-pairés et chi-carré ont été utilisés pour étudier les profils cliniques des patients. À l'intérieur même d'une seule population de cellules, les comparaisons des paramètres ont été effectuées à l'aide de tests Student-t pairés (exemple: longueur des télomères à passages initiaux *versus* finaux). Les comparaisons entre échantillons cellulaires de patients différents ont été quant à eux, analysés à l'aide de tests Student-t non-pairés (exemple: comparaison de la longueur des télomères à passage initial de différents patients). La relation existant entre les différents paramètres a été étudiée par une régression linéaire simple. Des tests d'analyse de variance (*one-way* ANOVA) avec des comparaisons *post-hoc* de type Fisher ont servi afin d'analyser les catégories nominales (exemple: type de réponse au NAC; retardée ou non affectée). Dans la première étude, des corrélations de Pearson ont été calculées afin d'étudier l'impact des facteurs de risque cardiovasculaire continus (âge, IMC, durée exposition à la maladie, niveaux de glucose, % fraction d'éjection ventriculaire) tandis que des tests non-pairés ont été utilisés pour l'analyse

de catégories (sexe, dyslipidémie, hypertension, diabète, histoire familiale de maladies cardiovasculaires, tabagisme, insuffisance rénale). Les analyses multivariées ont été calculées à partir des résultats obtenus dans les analyses univariées. Pour chaque paramètre, des modèles de régressions linéaires multiples ont été ajustés et seulement les variables présentant une valeur de « p » < 0.3 dans les analyses univariées ont été insérées dans les modèles multiples. Le choix des variables significatives dans le modèle final a été effectué par des sélections du type "stepwise" ou "backward" et le niveau de significativité a été fixé à 0.05 et 0.1 pour les tendances.

Une description détaillée des tests statistiques propres à chaque étude est expliquée dans chacun des manuscrits.

4. Articles

Étude #1

Apport original et contribution des co-auteurs:

La contribution du premier auteur, Guillaume Voghel, est majeure et partagée puisqu'il a participé à toutes les expérimentations et à la rédaction du manuscrit. L'ampleur du travail a requis la collaboration du Dr Nathalie Trescases-Thorin pour plusieurs expériences et elle a participé à la culture cellulaire et à la rédaction/révision du manuscrit. Nada Farhat a effectué certaines expériences de PCR et Albert Nguyen, stagiaire au moment de l'étude, a effectué immunobuvardage de type Western. Monsieur Louis Villeneuve a participé à l'acquisition des images d'immuno-fluorescence par microscopie confocale, Mme Maya A. Mamarbachi a offert son expertise en biologie moléculaire et Mme Annick Fortier a effectué les analyses biostatistiques. Les Dr Michel Carrier et Louis P. Perrault, chirurgiens, ont fourni les prélèvements d'artères provenant des patients. Finalement, le Dr Éric Thorin a supervisé l'étude et contribué à la rédaction/révision du manuscrit.

PERMISSION DE L'ÉDITEUR

1. Identification de la revue ou du livre

Mechanism of Ageing and Development

6277 Sea Harbor Drive

Orlando, FL 32887-4800 USA

9 Juillet 2008

2. Identification de l'éditeur ou des éditeurs

V.A. Bohr

3. Identification de l'article

Guillaume Voghel, Nathalie Thorin-Trescases, Nada Farhat, Albert Nguyen, Louis Villeneuve, Aida M. Mamarbachi, Annik Fortier, Louis P. Perrault, Michel Carrier and Eric Thorin

Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors

Mechanisms of Ageing and Development, 2007, Volume 128: 662-671

L'étudiant, Guillaume Voghel, est autorisé à inclure l'article ci-dessus dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : « Vieillesse vasculaire chez des patients athérosclérotiques : sénescence prématurée des cellules endothéliales? »

Éditeur Signature Date

Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors

Guillaume Voghel¹, Nathalie Thorin-Trescases¹, Nada Farhat, Albert Nguyen,
Louis Villeneuve, Aida M. Mamarbachi, Annik Fortier ‡,
Louis P. Perrault, Michel Carrier, Eric Thorin².

Department of Surgery, Research Center and ‡ Montreal Heart Institute Coordinating Center Biostatistical department, Montreal Heart Institute, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Running head: Accelerated endothelial cell senescence in CAD

¹ These authors equally contributed to this work.

² To whom correspondence should be addressed: Montreal Heart Institute, Research Center, 5000 rue Bélanger Est, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330; Fax.: (514) 376-1355; Email: eric.thorin@umontreal.ca

Abstract

Risk factors for cardiovascular diseases (CVD) increase oxidative stress, and they are proposed to hasten endothelial cell (EC) damage and dysfunction. Our objective was to elucidate the impact of chronic exposure to risk factors for CVD on senescence of EC isolated and cultured from internal mammary arterial segments of patients with severe coronary artery disease. Senescence induced by serial passages resulted in progressive telomere shortening, and short initial telomeres predicted early appearance of senescence in culture. Neither time course of senescence nor telomere length was age-dependent, suggesting that biological age, rather than chronological age, determined the dynamics. Senescence appeared earlier in patients with longer history of risk factor for CVD, and multivariate analysis suggested that hypertension hastened the onset of senescence. Risk factors for CVD override the effects of chronological aging likely by generating stress-dependent damage: senescent EC exhibited oxidative stress (increase in lipid peroxidation and caveolin-1 gene expression) and cell damage markers (loss of eNOS expression and increase in Cox2 mRNA, lower TRF1 protein level). Thus, cell senescence was triggered both by telomere-dependent and -independent pathways. In conclusion, chronic exposure to risk factors for CVD accelerated the development of endothelial senescence that could contribute to the pathogenesis of CVD.

Key words: Endothelium, cellular senescence, telomere, oxidative stress, caveolin-1.

Introduction

Vascular aging is associated with a decrease in endothelial dilatory and antithrombotic functions (Cooper et al., 1994; Lakatta, 2002; Donato et al., 2007). This typical endothelial dysfunction, however, is also present in younger patients with cardiovascular diseases (CVD) (Cohen et al., 1994). At the cellular level, aging of healthy vascular endothelial cells (EC) leads to senescence, a state of permanent growth arrest in which cells remain alive and metabolically active for months but refractory to mitogenic stimuli (Ben-Porath and Weinberg, 2005; Chen and Goligorsky, 2006). Senescence can be triggered by cell divisions, leading to cumulative telomere attrition down to a threshold length at which cells enter the so-called replicative senescence (Allsopp et al., 1995). In healthy humans, telomere shortening is age-dependent (Slagboom et al., 1994; Chang et al., 1995; Brouillette et al., 2007) and likely the consequence of life-long reparative cell divisions. Telomere length has been proposed to contribute and to be a predictor of mortality in many aged-related diseases (Cawthon et al., 2003). Cellular senescence can occur prematurely, independently of replicative age, following exposure to multiple types of stress (stress-induced senescence), such as oxidative stress (Toussaint et al., 2000), DNA damage and mitogenic stress (Ben-Porath and Weinberg, 2005).

Senescence is characterized by specific changes in cell morphology and gene expression, which reduce EC function (Benetos et al., 2001; Wagner et al., 2001) and thus are proposed to be pro-atherogenic (Cohen, 1995; Serrano and Andres, 2004; Edo and Andres, 2005). Although mitotically inactive, senescent cells are not physiologically inert: they secrete degradative enzymes, inflammatory cytokines and growth factors (Chen and Goligorsky, 2006) and this could promote or contribute to

the pathogenesis of human atherosclerosis (Minamino and Komuro, 2007). While the concept of senescence of EC is established, its origin is debated. Life-long cell repairs likely promotes instability and one consequence is an imbalance in the regulation of the redox environment towards pro-oxidation, a process accelerated by risk factors for CVD (Csiszar et al., 2002). The ensuing oxidative stress induces cellular damage (Lorenz et al., 2001; von Zglinicki, 2005) and further accelerates reparative cell division, promoting telomere instability (Kurz et al., 2005). Excessive telomere shortening in circulating white blood cells has been reported from patients with hypertension (Jeanclos et al., 2000), coronary atherosclerosis (Samani et al., 2001; Fitzpatrick et al., 2006; Brouillette et al., 2007), premature myocardial infarction (Brouillette et al., 2003), heart disease (Starr et al., 2007) and diabetes (Jeanclos et al., 1998). There is therefore a strong rationale for the hypothesis that risk factors for CVD accelerate the normal aging process as recently proposed by Chen and Goligorsky (2006). It is not known, however, if the association of short telomere length with the risk of coronary heart disease applies to other cell types, especially vascular tissue. The telomere-independent caveolin/p53 pathway has been reported to be activated by oxidative stress and lead to senescence (Galbiati et al., 2001; Volonte et al., 2002). In replicative senescence, however, telomere attrition following activation of ATM/p53-p21 pathway has been observed (Pandita 2002; Herbig et al., 2004; Herbig et al., 2006).

The objective of the present study was therefore to elucidate the impact of chronic exposure to risk factors for CVD on the senescence of EC isolated and cultured from patients with severe coronary artery disease (CAD) and to find the pathway of choice leading to senescence. We demonstrate that the duration of exposure to risk factors for

CVD, especially hypertension, positively correlates with the propensity of EC senescence, independently of the age of the donor. Thus, stress associated cell damages accelerated replicative senescence.

Experimental procedures

Clinical profile of the donors. Segments of human distal (close to the bifurcation) internal mammary artery (IMA, Table 1) discarded during primary CABG were harvested with low electrocautery energy and excised with cold scissors. The protocol has been approved by our institutional ethical committee.

Isolation and culture of EC. Endothelial cells were isolated by an explant technique (Shi et al., 2000; Thorin et al., 1997). Briefly, six to eight 1-mm² segments of mammary artery were seeded in 35-mm² culture dishes to obtain 5 to 8 segments anchored on Matrigel after 24 hrs. Cells were incubated in Dubelcco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum, 10% calf serum, 1% penicillin-streptomycin, 90 µg/ml sodium heparin salt (Sigma-Aldrich), 60 µg/ml EC growth supplement (Becton Dickinson), and 100 U/ml fungizone (Gibco), at 37°C in a 95% air/5% CO₂ incubator. The first cell outgrowing from the segments was detected 8±1 days after seeding. They were passaged (P#1) and counted after 32±5 days in 60-mm² culture dishes: the calculated PDL at the end of P#1 was 2.9±0.1. Cells were then seeded (P#2) in 100-mm² culture dishes. The experiments started at this point with therefore a history of PDL <3. Starting at passage 2, cells were serially passaged until senescence was reached; at each passage, cells were collected for senescence-associated β galactosidase (SA-beta-Gal) and cell viability quantification (exclusion of trypan blue). Cells were also harvested for DNA (Southern blotting), RNA (real-time RT-PCR) and protein (Western blotting) quantification and some cells were plated on

coverslips for immunostaining. Before replating, cells were counted using a hemocytometer and population doubling levels (PDL) were calculated.

EC characterization. The endothelial origin of the cells was confirmed by double immunostaining for von Willebrand factor (1:25, Sigma-Aldrich) and platelet-endothelial cell adhesion molecule (CD31; 1:50, Santa Cruz) (Thorin et al., 1997). Images were captured with a confocal microscope (Carl Zeiss LSM 510) (Fig. 1A-D). The specificity of all antibodies was confirmed by the absence of non-specific background staining (data not shown).

Senescence-associated β -galactosidase staining. Senescence-associated β -galactosidase SA-beta-Gal was used as a marker of senescence (Dimri et al., 2005). The percentage of blue SA-beta-Gal positive cells was determined by counting, in 4 different fields, at least 200 cells (inverted microscope Nikon TMS). Representative fields were digitized (Fig. 1E-F).

DNA synthesis. [^3H]-thymidine incorporation (1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ for 4hrs) was used as a marker of DNA synthesis in low (proliferative) and highly senescent EC as previously described (Thorin-Trescases et al., 2000).

Immunofluorescence. Immunostaining was used to assess the expression and sub-cellular localization of 4-hydroxy-nonenal (HNE) (rabbit polyclonal anti-HNE, 1:200, Alpha Diagnostics), p53 (mouse monoclonal anti-p53, 1:200, Upstate), TRF1 (mouse

anti-TRF1, 1: 200, Sigma) and TRF2 (rabbit anti-TRF2, 1: 200, Santa Cruz) at different levels of senescence. DNA counterstaining was performed by incubating EC with propidium iodide (20 μ M; Molecular Probe) or TOPRO-3 (2 μ M; Molecular Probe). Negative controls were performed by omitting the primary antibodies during the protocol. Cells were visualized using a confocal microscope. Semi-quantitative analysis was performed by measuring the fluorescence intensity in the nucleus, the cytosol and the whole cell from 4-5 different pictures from the same coverslip; the average values are presented in Figures 3B. Values are expressed in arbitrary units (a.u.) of fluorescence.

Telomere length measurement. Endothelial cells were grown in 75 cm² flasks at early and subsequent passages until replicative senescence was reached. DNA was extracted from EC with a phenol/chloroform/isoamyl alcohol technique, precipitated using ethanol 95% and dissolved in Tris-HCl (10 mM, pH 8.6). Restriction fragments length (RFL) were quantified using a Southern blot technique (Zhang et al., 2000, Figure 2A). In our hands, the intravariability and the intervariability were \pm 116bp and \pm 728bp, respectively.

Western blotting. Nuclear and cytosolic protein were extracted separately using a nuclear and cytoplasmic extraction kit (Pierce Biotechnology) in the presence of 10x protease inhibitor cocktail (Pierce Biotechnology). Twenty five μ g of proteins were denaturated, separated on a SDS-polyacrylamide gel (ProteanIIXi system, BioRad). Primary antibodies were mouse anti-p53 (1:200, Upstate), mouse anti-TRF1 (1: 200, Sigma), rabbit anti-TRF2 (1:200, Santa Cruz) and mouse anti-GAPDH (1:100 000,

Ambion). Protein expression was reported as the ratio protein/GAPDH and expressed as arbitrary units.

Real-time RT-PCR. Total RNA was isolated using a RNeasy kit (Qiagen) at early and subsequent passages until senescence was reached. Real-time PCR was carried out on diluted RT products using the DNA-binding dye SYBR Green I for the detection of PCR products (Mx3005P system, Stratagene) according to the manufacturer's instruction. Serial dilutions (100 ng to 1pg) of human aortic EC (hAoEC) (Cambrex) total RNA were used as standard. The following primers designed by primer express (Version 2.0) were used in order to quantify gene expression of:

<i>Primer</i>	<i>(5'- 3') Forward</i>	<i>(5'- 3') Reverse</i>
caveolin	GCTGAGCGAGAAGCAAGTGT	TGGTGAAGCTGGCCTTCCAA
p53	TGAGGTTGGCTCTGACTGTA	TTCTCTTCCTCTGTGCGCCG
p21	GGACCTGTCACTGTCTTGTA	CCTCTTGGAGAAGATCAGCCG
ATM	GGCAGCTGATATTCGGAGGA	CATCTTGGTCACGACGATAC
eNOS	GCCAACGCCGTGAAGATCT	CATACAGGATTGTCGCCTTCACT
Cox1	AAGGCACCAACCTCATGTTTG	CAGGACCCATCTTGCCAGAG
Cox 2	TGGCGCTCAGCCATACAG	GGTACAATCGCACTTATACTGGTCAA
GAPDH	TGAAGGTCGGAGTCAACGGA	CATTGATGACAAGCTTCCCG

mRNA levels in each sample were calculated relative to GAPDH which level of expression did not vary with senescence.

Statistical analysis of the data. Data are presented as mean±sem for continuous variables, with *n* indicating the number of patients. Statistical analysis were performed using SAS release 9.1 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

The relationship between senescence in EC (Days to reach 50% of SA-beta-Gal cells) and various cellular parameters was investigated using simple linear regression (Fig. 1G, 2B, 3 and 4). The impact of clinical parameters such as age and duration of exposure to risk factor for CVD on EC markers were evaluated with Pearson correlation (Fig. 2C and D).

To determine the impact of individual cardiovascular risk factors on the different continuous parameters of cell senescence and proliferation measured, univariate analyses were performed. Pearson correlations were calculated to study continuous risk factor (age, BMI, time exposure to the disease, glucose levels, % of LVEF) while unpaired t-test were done to analyse categorial factors (sex, dyslipidemia, hypertension, diabetes, history of family CAD, renal failure, smoking). Multivariate analyses were then performed based on the results obtained in the univariate analyses. For each parameter, multiple linear regression model was adjusted and only variables with p value <0.3 in univariate analysis were inserted in the multiple model process. The selection of significant variables in the final model was performed by "stepwise" or "backward" selection type and the significance level was fixed to 0.05 and to 0.1 to see the trends.

Results

Senescence in endothelial cells from patients with coronary artery disease.

Cell cultures were characterized by immunostaining for the von Willebrand factor and CD31. Senescence was induced *in vitro* by serial passage, and cells were positive for the specific endothelial markers whether or not they were senescent (Fig. 1A, B, C and D). Senescent EC exhibited phenotypic changes: cytoplasmic size was increased up to 20 times, associated with the inclusion of vacuoles and positive staining for senescence-associated β -galactosidase at pH 6 (Fig. 1E and F).

SA-beta-Gal staining was used as a marker of senescence at each passage. Although IMA is considered as a healthy conduit, some level of cell senescence (Beta-Gal_{initial} = 5.0±0.8%, [0.05-32.0%]) was observed early in culture (passage 2, corresponding to cumulative (Σ) PDL of 4.5±0.2, [1.7-8.6]). We observed that this initial level of cell senescence determined the replicative potential of the cells later in culture: high beta-Gal_{initial} predicted low replicative potential ($p=0.0424$, $r^2=0.073$, $n=56$). Above passage 2, cell senescence then developed exponentially with time (days) and with the number of cell divisions (Σ PDL). For each patient, a time course of senescence was constructed [(% of SA-beta-Gal = f (days in culture or Σ PDL))]. From the 58 exponential curve equations the following parameters were calculated:

- the time (days) needed to reach 50% of senescence (Days_{beta-Gal 50%}), an index of the propensity to develop senescence;
- the value of Σ PDL when senescence is 50% (PDL_{beta-Gal 50%}), an index of the replicative potential of the cells at a given level of senescence;

These 2 parameters, which characterize a senescence profile for a given cell culture, allow comparisons between patients. Days_{beta-Gal 50%} ranged from 53 to 174 days (101 ± 4 days) and PDL_{beta-Gal 50%} varied from 6.0 to 25.2 (11.3 ± 0.6) in the 58 patients tested, showing high heterogeneity in the different time courses of senescence.

Early senescence (low values of Days_{beta-Gal 50%}) was associated with lower Σ PDL (Fig. 1G), with a low degree of cell viability revealed by trypan blue ($p < 0.0001$, data not shown) and a lower rate of thymidine incorporation ($p < 0.05$, data not shown), a DNA synthesis marker. All these results confirmed that senescence is characterized by a low EC growth potential.

Telomere length in EC. Telomeres are known to shorten at each cell division leading to cell senescence (Allsopp et al., 1995). Serial passages resulted in progressive telomere attrition: on average, telomere restriction fragment length (RFL) decreased from 9.1 ± 0.2 kbp (range of [6.6-12.8] kbp) at the initial EC passage to 8.6 ± 0.2 kbp (range of [6.3-11.6] kbp) at replicative senescence (paired t-test, $p < 0.0001$). Despite high heterogeneity between a) the senescence profile of the donors and b) RFL measured initially in culture, there was a positive correlation between both parameters (Fig. 2B): a short initial telomere RFL strongly predicted the early appearance of senescence in EC later in culture.

Relation between EC markers and clinical data: impact of age and duration of exposure to risk factors for CVD. Figure 2C shows that the time course of senescence was not correlated with the age of the patients. Similar results were observed with

initial ($p=0.6416$, $n=58$) and final ($p=0.5119$) telomere RFL. The lack of relationship between the age of the patients and the parameters quantified suggests that biological age and exposure to the disease, rather than chronological age of the donor, determine the dynamics. For this reason, the impact of time exposure to risk factors for CVD on cell senescence was investigated. Senescence appeared earlier in EC isolated from arterial segments of patients with longer history of risk factors for CVD (Fig. 2D). For this analysis, the oldest documented risk factor (*i.e.* dyslipidemia, high BMI, hypertension, and/or diabetes, etc.) was taken into account and not arbitrarily chosen. With time, however, risk factors for CVD accumulated since most patients had at least 3 risk factors (Table 1). This suggests that risk factors for CVD override the effect of chronological aging on the onset of cell senescence, likely by generating stress-dependent cell damage, reparative proliferation and accelerated telomere erosion.

Cellular damage associated with EC senescence. To determine if oxidative stress was present in EC isolated from atherosclerotic patients, we quantified 4-hydroxynonenal (HNE) expression, a marker of lipid peroxidation. Initially, at passage 2, some degree of lipid peroxidation was measured (5.71 ± 0.63 a.u., [2.24-14.17]). We observed that this initial level of HNE was directly associated with the propensity to develop senescence: high initial HNE expression predicted early development of senescence later in culture ($p=0.0475$, $r^2=0.311$, $n=12$). Furthermore, initial HNE level was not associated with neither initial nor final RFL ($p=0.7537$ and $p=0.1756$, respectively). With the development of senescence, the level of HNE expression increased by 8 fold: high HNE expression was positively correlated with an increase in

cell senescence (Fig. 3A, B). Caveolin-1 mRNA expression, which overexpression is known to promote oxidative stress induced-senescence (Volonte et al., 2002), was strongly positively correlated with initial HNE levels (Fig 3C). Accordingly, high initial caveolin-1 mRNA expression was associated with early development of senescence later in culture (Fig. 4A). Initial expression of caveolin-1 was not significantly correlated with replicative potential or telomere length ($p>0.05$, data not shown).

Initial ATM mRNA expression was positively correlated with initial mRNA expression of p53 ($p=0.055$, data not shown) and of p21 ($p=0.001$, data not shown). This is in accordance with the fact that ATM acts via the p53-p21 pathway. In contrast to initial caveolin-1 levels, initial ATM mRNA expression was neither related to HNE levels (Fig. 3D), nor to the propensity to develop senescence (Fig. 4B), suggesting that oxidative stress induced-senescence overlaps ATM-mediated senescence.

Semi-quantitative immunostaining and Western Blot analysis showed that the nuclear expression of the tumour suppressor protein p53 - known to restrict abnormal cells by induction of growth arrest in an oxidative environment (Martinet et al., 2002) - and the nuclear expression of the telomeric-binding protein TRF2 - associated with DNA damage (Klapper et al., 2003) – were non significantly increased with the development of senescence while their cytosolic expression significantly decreased with age (data not shown). In contrast, the nuclear expression of TRF1 protein, a telomeric-repeat binding factor known to protect telomere integrity (van Steelsen and de Lange, 1997) significantly decreased in senescent EC (data not shown). These

results suggest that telomeres and proteins of the telomeric complex participate in the process of senescence.

Gene expression associated with senescence. Replicative senescence is associated with changes in gene expression (Narita et al., 2003; Shelton et al., 1999). We assessed the impact of senescence on mRNA expression of 3 genes associated with normal endothelial function, eNOS, and the two isoforms of the cyclooxygenase (Cox-1 and Cox-2) (Table 2). The results show that initial eNOS mRNA expression in hIMA EC was extremely low, 20 000 fold lower when compared to commercially available healthy human aortic EC from young donors (hAoEC) and not affected by the severity of senescence. Initial Cox-1 mRNA was 20 fold lower in hIMA EC when compared to hAoEC and further decreased with senescence, while initial Cox-2 mRNA expression was slightly higher in EC from hIMA than hAoEC and further increased with senescence. The initial level of Cox-2 gene expression was negatively associated with the replicative potential of the cells ($p=0.0178$, $r^2=0.191$, $n=28$), suggesting that Cox-2 is also a marker of cell damage.

Relation between EC markers and clinical data: impact of the risk factors for CVD on cell senescence, telomere shortening rate and proliferation. Since we observed that high initial levels of senescence, HNE expression, Cox-2 gene expression and telomere length could predict the future culture-induced senescence profile, simple linear regression between these initial parameters and the clinical data of the patients were performed. The duration of exposure to risk factors for CVD is positively correlated with the initial level of senescence ($p=0.0022$, $r^2=0.176$, $n=46$) but not with the others

parameters such as the age of the donor, BMI, glucose level and LVEF. The age of the donor only influenced initial Cox-2 gene expression ($p=0.033$, $r^2=0.117$, $n=38$), the younger the diseased patient, the higher the level of Cox-2 mRNA. Finally, patients with high BMI had low levels of initial HNE ($p=0.0035$, $r^2=0.369$, $n=20$). Thus, the clinical status of the patients influences the initial parameters of EC in culture.

Concerning the cellular parameters quantified during the development of senescence, sex, diabetes, dyslipidemia, the presence of family CAD and renal failure had no significant impact on any of the parameters measured. According to the multivariate analysis, the following models were significant:

(a)
$$\text{Time to reach Beta-Gal 50\% (days)} = 106.87 + 1.66 * (\text{BMI}) - 0.81 * (\% \text{LVEF}) - 18.71 * (\text{hypertension})$$

This model indicates that senescence is delayed (by 1.66 x BMI days) in obese patients ($p=0.0345$) but accelerated by hypertension (by 18.71 days, $p=0.0268$) and LVEF (by 0.81 x LVEF, $p=0.0206$).

(b)
$$\Delta \text{RFL} / \Sigma \text{PDL (bp/cell division)} = -39.61 - 33.97 * (\text{hypertension})$$

This model indicates that RFL shortening rate tends to be higher (by 34 bp/cell division) in hypertensive patients ($p=0.0528$).

(c)
$$\Sigma \text{PDL} = 11.51 + 0.33 * (\text{BMI}) - 0.198 * (\text{duration exposure to CVD}) - 0.156 * (\% \text{LVEF}) - 2.63 * (\text{hypertension}) + 3.62 * (\text{smoking})$$

This model indicates that the proliferative potential is lowered by the duration of exposure to CVD ($p=0.0321$), hypertension ($p=0.0792$) and LVEF ($p=0.0308$) but increased in obese ($p=0.0154$) and smokers ($p=0.0164$).

In summary, hypertension and long exposure to CVD hasten senescence and limit proliferation, while obesity and smoking appears to promote cell proliferation.

Discussion

The literature suggests that risk factors for CVD accelerate the normal aging process of the endothelium (Cooper et al., 1994; Cohen 1995; Lakatta 2002; Edo and Andres, 2005; Chen and Goligorsky, 2006). Our study shows that senescence of EC from atherosclerotic patients is characterized by low EC growth potential, specific changes in cell phenotype, gene and protein expression and telomere shortening independently of the age of the donor. The duration of exposure to risk factors for CVD, particularly to hypertension, was associated with an early onset of senescence, suggesting an acceleration of the biological ageing process. This could contribute to endothelial dysfunction and early development of CAD.

Several studies have shown that senescence can be triggered either by telomeric DNA instability resulting from telomere erosion (replicative senescence) or following exposure to multiple types of stress (stress-induced senescence), such as oxidative stress (Toussaint et al., 2000), DNA damage and mitogenic stress (Ben-Porath and Weinberg, 2005). Senescent EC used in this study showed markers of both pathways. First, replicative senescence pathway was assessed by measuring telomere integrity. While telomeres shortened at each cell division, short initial telomere length predicted an early onset of senescence (Fig 2). We also observed that senescence was associated with lower levels of TRF-1, a telomeric-repeat binding factor known to protect telomere integrity. In addition, we found that the genic expression of the DNA damage signal transducer ATM correlated with p53, the mediator of DNA damage response and with p21, a cyclin-dependent kinase inhibitor. ATM and telomeres act as controllers of

cellular responses to DNA damage (Pandita, 2002; Herbig et al., 2004). Altogether, these data strongly suggest that the pathway of replicative senescence is involved.

However, senescence-associated growth arrest was observed for an average final telomere length of 8.6 kbp, which is much higher than the 4 kbp RFL measured in cultured hematopoietic cells isolated from healthy donors (Wang et al., 2005). This suggests that EC from patients with a heavy burden of risk factors for CVD enter senescence before telomeres shortened to their threshold length. Similarly, telomere length, the biological clock of most somatic cells, was age-independent in EC from the patients tested in our study, contrasting with data reported in healthy donors (Slagboom et al., 1994; Chang and Harley, 1995). These data altogether establish that EC isolated from patients with CVD are biologically older than their chronological age. It is thus likely that senescence in EC from patients with CAD is also dependent on excessive damage induced by the pathological condition of the donor.

Since risk factors for cardiovascular diseases are associated with an increase in oxidative stress (Donato et al., 2007), we investigated the role of stress-induced senescence in our model by measuring different markers of oxidative stress. The results showed that senescence was strongly associated with an increase in lipid peroxidation levels (Fig 3). In addition, lipid peroxidation and the onset of cellular senescence were positively correlated with levels of caveolin-1. Yet, we used caveolin-1 expression as a surrogate marker of oxidative stress. Caveolin proteins are the principal component of caveolae, invaginations enriched in cholesterol within the plasma membrane. Caveolin gene family consists of caveolin-1, -2 and -3. Caveolin-1 and -2 are co-expressed and exist in many cell types, with particularly high levels in adipocytes and EC (for review, Parton and Simons 2007). Cellular levels of cholesterol

increase with aging, and this is associated with an upregulation of caveolin-1 (for review, Cho and Park, 2005), showing a reciprocal interaction between cellular cholesterol levels and caveolae. Caveolin-1 also functions as a tumor suppressor protein and could therefore play a key role in cellular senescence (Galbiati et al., 2001; Cho et al., 2003). Oxidative stress (induced experimentally by subtoxic concentrations of H₂O₂) induces an upregulation of caveolin-1 in fibroblasts and it has been reported that caveolin-1 overexpression promotes oxidative stress-induced premature senescence (Volonte et al., 2002). Our data therefore agree with the concept that caveolin-1 expression is a marker of oxidative stress and stress-induced premature senescence, distinct from the telomere-dependent pathways. Finally, we quantified mRNA expression of Cox-2, an inflammatory marker known to increase in presence of oxidative stress (Feng et al., 1995) and our results showed that Cox-2 gene expression increased with senescence. Thus, altogether, these markers confirmed the implication of the stress-induced senescence pathway in EC from patients with CAD. When we looked at the relation existing between markers of stress-induced and replicative senescence, we found that neither HNE nor caveolin-1 levels were associated with telomere length or ATM levels. These dissociations confirmed that in EC isolated from patients exposed to risk factors for CVD, senescence is clearly characterized by both pathways. Because the expression of HNE-caveolin-1 pathway, but not ATM-p53-p21 pathway, was related to the propensity to develop senescence (Fig. 4), our data suggest that senescence of EC isolated and cultured from patients with CAD is only partly replicative and that stress-induced senescence overrides ATM-mediated senescence.

While considered as a healthy arterial graft free of atherosclerotic plaques, the hIMA has been nonetheless exposed chronically for months to decades to risk factors

for CVD. Therefore, early in culture (passage 2), some levels of senescence and lipid peroxidation, as well as telomere shortening were observed. Similarly, eNOS gene expression was barely detectable, Cox-1 low and Cox-2 high, before passage-induced senescence. These data suggest that, early in culture, what should be the most representative of what occurred *in vivo*, EC isolated from patients with CVD display signs of endothelial dysfunction independently of the cell culture. In other words, our data suggest that EC senescence occurred *in vivo*. Our results show heterogeneous profiles of EC senescence, the time course of senescence being correlated with the duration of exposure to risk factors for CVD (Fig. 2). Therefore, risk factors for CVD seem critical in triggering senescence, which is confirmed by the dissociation observed between chronological age and senescence (Fig. 2C) and by some initial parameters predicting the onset of senescence (Fig. 2B, 3B, 4A). Similarly, shorter telomeres were measured in circulating leukocytes freshly isolated from patients with hypertension (Jeanclos et al., 2000), coronary atherosclerosis (Samani et al., 2001), premature myocardial infarction (Brouillette et al., 2003) and diabetes (Jeanclos et al., 1998). Thus, *in vivo* exposition to risk factors for CVD seems to promote the appearance of a premature replicative senescence. We observed that the only parameter influenced by the age of the donor was the initial level of Cox-2 gene expression: higher levels of this inflammatory marker were found in younger patients. As oxidative stress is known to increase gene and protein expression of Cox-2 (Feng et al., 1995), we can speculate that this inflammatory state reflects a pro-oxidative environment that could trigger the apparition of a premature stress-induced senescence.

To our knowledge, this is the first demonstration that risk factors for CVD accelerate the onset of senescence of human vascular EC by activating both pathways.

The number of patients included in the study was limited (n=58) and all had an average of three independent risk factors for CVD. It is therefore difficult to relate our *in vitro* data to a specific risk factor. Multivariate statistical analysis revealed nonetheless that hypertension accelerates the rate of senescence [equation (a)] and limits the replication potential [equation (c)]. Hypertension also accelerates the loss of base pairs per cell division [equation (b)]. Thus, hypertension is a great burden on EC, confirming data from Aviv's group on the relationship between hypertension and telomere length in white blood cells (Benetos et al., 2004). This analysis also reveals that smoking and obesity (high BMI) increase the replication potential of the EC [equation (c)], while obesity delays EC senescence [equation (a)]. Adipocyte-derived hormones are oversecreted in obesity and may be a potential cellular pathway in the pathogenesis of vascular disease. Adipokines exert deleterious effects combined with some beneficial endothelial effects (for review see Kougias et al., 2005), but it is not clear how they directly or indirectly influence EC function. Leptin possesses oxidative, pro-inflammatory and proliferative effects (Kougias et al., 2005). Resistin promotes angiogenesis of human endothelial cells *via* the upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors (Mu et al., 2006). Adiponectin, which synthesis decreases with obesity, protects against EC inflammation through inhibition of interleukin-8 synthesis (Kobashi et al., 2005; Kougias et al., 2005). Thus, in our study, leptin and resistin could play a role in the observed increase replication potential of EC from obese atherosclerotic patients. Furthermore, the potential beneficial effect of adiponectin on oxidative stress and inflammatory status could participate in the delay of EC senescence. The particular role of adipokines in the regulation of EC senescence deserves further investigation, but one should not forget that EC used in this study

come from patients with multiple risk factors, including obesity, and that they all interact. Concerning the effect of cigarette smoking, it is known that tobacco smoke contains pro-oxidant substances, mutagens and carcinogens. The higher replicative potential of EC from smokers predicted by the statistical model [equation (c)] could therefore be the result of a higher cell turnover induced by higher reparative endothelial processes. Pulmonary emphysema in smokers has been associated with an increased cell turnover of epithelial and endothelial cells (Tsuji et al., 2004; Yokohori et al., 2004). Nicotine and hypoxia are strong inducer of VEGF, and this could also participate in the higher replicative potential of EC from smokers. The fact that cells from obese and smoker patients have a higher cell replication potential is not necessarily a positive sign, as smokers in our study were 11 years younger than non smokers (56 ± 2 versus 67 ± 2 years old, $p=0.0018$), but still in need of a bypass graft surgery, and thus highly susceptible to CAD. The combined impact of all risk factors on EC function *in vitro* is therefore complex but reflects the clinical reality of the aging atherosclerotic population.

In conclusion, our data strongly suggest that in human EC exposed for years to risk factors for CVD, there is a significant interplay between replicative senescence — the result of progressive telomere shortening — and oxidative stress-induced senescence due to a state of cumulative cell damages. Risk factors for CVD, and in particular hypertension, accelerate EC biological aging, leading to the apparition of a premature stress-induced senescence, which could play a role in endothelial dysfunction and contribute to the pathogenesis of CVD.

Acknowledgements

This work has been supported in part by the Foundation of the Montreal Heart Institute, the Heart and Stroke Foundation of Quebec, and the Canadian Institute for Health Research (MOP 14496). E. Thorin is a senior scholar of the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec*. Louis P. Perrault is a junior 2 scholar of the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec*. Guillaume Voghel is a fellow of the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec*. We thank Guy Charron (Montreal Heart Institute) for fruitful discussions and technical advises, and the biological tissue bank (RETEB) of the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec* for technical support.

References:

- Allsopp, R.C., Chang, E., Kashefi-Aazam, M., Rogaev, E.I., Piatyszczek, E.A., Shay, J.W., Harley, C.B. 1995. Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 220, 194-220.
- Ben-Porath, I., Weinberg, R.A. 2005. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 961-976.
- Benetos, A., Okuda, K., Lajem, M., Kimura, M., Thomas, F., Skurnick, J., Labat, C., Bean, K., Aviv, A. 2001. Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension* 37, 381-385.
- Benetos, A., Gardner, J.P., Zureik, M., Labat, C., Xiaobin, L., Adamopoulos, C., Temmar, M., Bean, K.E., Thomas, F., Aviv, A. 2004. Short telomeres are associated with increased carotid atherosclerosis in hypertensive patients. *Hypertension* 43, 182-185.
- Brouillette, S., Singh, R.K., Thompson, J.R., Goodall, A.H., Samani, N.J. 2003. White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 842-846.
- Brouillette, S.W., Moore, J., McMahon, A.D., Thompson, J.R., Ford, I., Sheperd, J., Packard, C., Samani, N. 2007. Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland primary prevention study: a nested case-control study. *Lancet* 369, 107-114.
- Cawthon, R., Smith, K.R., O'Brien, E., Sivatchenko, A., Kerber, R.A. 2003. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* 361, 393-395.
- Chang, E., Harley, C.B. 1995. Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 11190-11194.
- Chen, J., Goligorsky, M.S. 2006. Premature senescence of endothelial cells: Methusaleh's dilemma. *Am J Physiol* 290, H1729-H1739.
- Cho, K.A., Ryu, S.J., Park, J.S., Jang, I.S., Ahn, J.S., Kim, K.T., Park, S.C. 2003. Senescent phenotype can be reversed by reduction of caveolin status. *J Biol Chem* 278, 27789-27795.
- Cho, K.A., Park, S.C. 2004. Caveolin-1 as a prime modulator of aging: a new modality for phenotypic restoration? *Mech Ageing and Dev* 126, 105-110.
- Cohen, R.A. 1995. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 38, 105-128.

- Cooper, L.T., Cooke, J.P., Dzau, V.J. 1994. The vasculopathy of ageing *J Gerontol* 49, B191-B196.
- Csiszar, A., Ungvari, Z., Edwards, J.G., Kaminski, P., Wolin, M.S., Koller, A., Kaley, G. 2002. Ageing-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res* 90, 1159-1166.
- Donato, A.J., Eskurza, I., Silver, A.E., Levy, A.S., Pierce, G.L., Gates, P.E., Seals, D.R. 2007. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans. Relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kB. *Circ Res* 100, 1659-1666.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacock, M., Campisi, J. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 9363-9367.
- Edo, M.D., Andres, V. 2005. Aging, telomeres, and atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 66, 213-221.
- Feng, L., Yia, Y., Garcia, G.E., Hwang, D., Wilson, C.B. 1995. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor- α , and lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 95, 1669-1675.
- Fitzpatrick, A., Kronmal, R.A., Gardner, J.P., Psaty, B.M., Jenny, N.S., Tracy, R.P., Walston, J., Kimura, M., Aviv, A. 2006. Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study. *Am J Epidemiol* 165, 14-21.
- Galbiati, F., Volonte, D., Liu, J., Capozza, F., Frank, P.G., Zhu, L., Pestell, R.G., Lisanti, M.P. 2001. Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G₀/G₁ arrest via p53/p21^{WAF/Cip1}-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 12, 2229-44.
- Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P.C., Chen, D.J., Sedivy, J.M. 2004. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53 and p21^{CIP1}, but not p16^{INK4a}. *Mol Cell* 14, 501-513.
- Herbig, U., Sedivy, J.M. 2006. Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story. *Mech Ageing Dev* 127, 16-24.
- Jeanclous, E., Krolewski, A., Skurnick, J., Kimura, M., Aviv, H., Warram, J.H., Aviv, A. 1998. Shortened telomere length in white blood cells of patients with IDDM. *Diabetes* 47, 482-486.

- Jeanclous, E., Schork, N.J., Kyvik, K.O., Kimura, M., Skurnick, J.H., Aviv, A. 2000. Telomere length inversely correlates with pulse pressure and is highly familial. *Hypertension* 36, 195-200.
- Klapper, W., Oian, W., Schulte, C., Parwaresch, R. 2003. DNA damage transiently increases TRF2 mRNA expression and telomerase activity *Leukemia* 17, 2007-2015.
- Kobashi, C., Urakaze, M., Kishida, M., Kibayashi, E., Kobayashi, H., Kihara, S., Funahashi, T., Takata, M., Temaru, R., Sato, A., Yamazaki, K., Nakamura, N., Kobayashi, M. 2005. Adiponectin inhibits endothelial synthesis of interleukin-8. *Circ Res* 97, 1245-1252.
- Kougias, P., Chai, H., Lin, P., Yao, Q., Lumsden, A., Chen, C. 2005. Effects of adipocyte-derived cytokines on endothelial functions: implication of vascular disease. *J Surg Res* 126, 121-129.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., Trivier, E., Akhmedov, A., Erusalimsky, J.D. 2004. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci* 117, 2417-2426.
- Lakatta, E.G. 2002. Age-associated cardiovascular changes in health: impact on cardiovascular disease in older persons. *Heart Fail Rev* 7, 29-49.
- Lorenz, M., Saretzki, G., Sitte, N., Metzkow, S., von Zglinicki, T. 2001. BJ fibroblasts display high antioxidant capacity and slow telomere shortening independent of hTERT transfection. *Free Radic Biol Med* 31, 824-831.
- Martinet, W., Knaapen, M.W., de Meyer, G.R., Herman, A.G., Kockx, M.M. 2002. Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 106, 927-932.
- Minamino, T., Komuro, I. Vascular senescence. Contribution to atherosclerosis. 2007. *Circ Res* 100, 15-26.
- Mu, H., Ohashi, R., Yan, S., Chai, H., Yang, H., Lin, P., Yao, Q., Chen, C. 2006. Adipokine resistin promotes in vitro angiogenesis of human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 70, 146-157.
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.L., Lowe, S.W. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703-716.
- Pandita, T.K. 2002. ATM function and telomere stability. *Oncogene* 21, 611-618.
- Parton, R.G., Simons, K. 2007. The multiple faces of caveolae. *Nat rev mol cell Biol* 8, 185-194.

- Samani, N.J., Boulby, R., Butler, R., Thompson, J.R., Goodall, A.J. 2001. Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet* 358, 472-473.
- Serrano, A.L., Andres, V. 2004. Telomeres and cardiovascular disease: does size matter? *Circ Res* 94, 575-584.
- Shelton, D.N., Chang, E., Whittier, D., Choi, D., Funk, W.D. 1999. Microarray analysis of replicative senescence *Curr Biol* 9, 939-945.
- Shi, W., Haberland, M.E., Jien, M.L., Shih, D.M., Lusis, A.J. 2000. Endothelial responses to oxidized lipoproteins determine genetic susceptibility to atherosclerosis in mice. *Circulation* 102, 75-81.
- Slagboom, P.E., Droog, S., Boomsma, D.I. 1994. Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *Am J Hum Genet* 55, 876-882.
- Starr, J.M., McGurn, B., Harris, S.E., Whalley, L.J., Deary, I.J., Shiels, P.G. 2007. Association between telomere length and heart disease in a narrow age cohort of older people. *Exp Gerontol* 42, 571-573.
- Thorin, E., Shatos, M.A., Shreeve, S.M., Walters, C.L., Bevan, J.A. 1997. Human vascular endothelium heterogeneity. A comparative study of cerebral and peripheral cultured vascular endothelial cells. *Stroke* 28, 375-381.
- Thorin-Trescases, N., Ono, Y., Tremblay, J., Hamet, P., Orlov, S.N. 2000. Dual effect of adenosine on vascular smooth muscle [³H]-thymidine DNA labeling: receptor-mediated modulation of DNA synthesis and inhibition of thymidine uptake. *J Vasc Res* 37, 477-484.
- Toussaint, O., Medrano, E.E., von Zglinicki, T. 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* 35, 927-945.
- Tsuji, T., Aoshiba, K., Nagai, A. 2004. Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31, 643-649.
- van Steelsen, B., de Lange, T. 1997. Control of telomere length by the human telomeric binding protein TRF1. *Nature* 385, 740-743.
- Volonte, D., Zhang, K., Lisanti, M.P., Galbiati, F. 2002. Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. Stress-induced premature senescence upregulates the expression of endogenous caveolin-1. *Mol Biol Cell* 13, 2502-2517.

von Zglinicki, T., Saretzki, G., Ladhoff, J., d'Adda di Fagagna, F., Jackson, S.P. 2005. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev* 126, 111-117.

Wagner, M., Hampel, B., Bernhard, D., Hala, M., Zwerschke, W., Jansen-Durr, P. 2001. Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest, polyploidization and senescence-associated apoptosis. *Exp Gerontol* 36, 1327-1347.

Wang, J.C., Warner, J.K., Erdmann, N., Lansdorp, P.M., Harrington, L., Dick, J.E. 2005. Dissociation of telomerase activity and telomere length maintenance in primitive human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 14398-14403.

Yokohori, N., Aoshiba, K., Nagai, A. 2004. Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 125, 626-632.

Zhang, L., Aviv, H., Gardner, J.P., Okuda, K., Patel, S., Kimura, M., Bardeguet, A., Aviv, A. 2000. Loss of chromosome 13 in cultured human vascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 260, 357-364.

Figure legends

Figure 1

Characterization of hIMA EC progressing in senescence. Confocal images of positive immunostaining for the endothelial markers von Willebrand factor (A, B) and CD31 (C, D) in cultured EC isolated from hIMA at early (A, C, E) and late (B, D, F) passage. Contrast phase photographs typical of a senescence-associated β -galactosidase staining (SA-beta-Gal, in blue) in non senescent (E) and senescent (F) EC (x 400 magnification). (G) Positive correlation between the total replication potential (Σ PDL) and the calculated time (days) to reach 50% of senescence ($p < 0.0001$, $r^2 = 0.397$, $n = 57$).

Figure 2

Age-independent relationship between EC telomere length and the onset of senescence. (A) Telomere restriction fragment lengths (RFL, bp, $n = 58$) were measured at the initial (i) passage and at senescence (final passage, f): serial passages resulted in telomere attrition (*: $p < 0.0001$, paired t test). A typical Southern blot is shown. (B) Short initial telomere restriction fragment length (initial RFL, bp), measured at the earliest passage, is a predictor for the early development of senescence (time to reach 50% of positive beta-Gal cells, $p = 0.0008$; $r^2 = 0.183$, $n = 58$). (C) The age of the donor was not correlated with the time course of the senescence ($p = 0.9315$, $n = 58$) but (D) there is a negative impact of the duration of exposure to risk factors for CVD (disease history, years) on the development of senescence ($p = 0.0383$; $r^2 = 0.094$, $n = 46$).

Figure 3

Cellular markers of oxidative stress: lipid peroxidation and caveolin-1. (A) Confocal images of positive immunostaining for the lipid peroxidation marker 4-hydroxynonenal (HNE) in cultured EC isolated from hIMA at early and late passages. (B) Positive correlation between the intensity of senescence (%) and the level of total-HNE fluorescence ($p=0.008$; $r^2 = 0.281$, $n=24$). (C) Positive correlation between the level of total-HNE fluorescence and initial caveolin-1 mRNA expression ($p=0.0015$; $r^2 = 0.738$, $n=10$). (D) Dissociation between the level of total-HNE fluorescence and initial ATM mRNA expression ($p=0.4684$; $r^2 = 0.06$, $n=11$).

Figure 4

Caveolin-1 but not ATM predicts the onset of cellular senescence. (A) Negative correlation between the initial caveolin-1 mRNA expression and the time needed to reach 50% of senescent EC ($p=0.0211$; $r^2 = 0.464$, $n=11$). (B) Dissociation between the initial ATM mRNA expression and the time needed to reach 50% of senescent EC ($p=0.5732$; $r^2 = 0.037$, $n=11$).

Table 1. Clinical profile of patients undergoing CABG

	Men (n=44)	Women (n=14)
Age (years)	61±2	66±3
Age range (years)	[39-80]	[48-79]
Family history of CAD, %	89 (24/28)	86 (6/7)
History of disease (years)	7±1	8±2
History of disease range (years)	[0.1-27]	[0.1-29]
BMI (kg/m ²)	29±1	26±1
Dyslipidemia, %	91 (40/44)	64 (9/14)
Hypertension, %	68 (30/44)	64 (9/14)
Diabetes, %	25 (11/44)	14 (2/14)
Nicotine use, % (active or recent ex-smokers)	52 (23/44)	43 (6/14)
Left ventricular ejection fraction (%)	52±2%	54±3%
Renal failure, %	16 (7/44)	14 (2/14)
Number of grafts	3±0	3±0

Patients were treated with similar medications including aspirin, angiotensin-converting enzyme inhibitors, β -blockers, calcium channel blockers, statins and nitrates.

No significant differences in the clinical profile of the patients undergoing CABG were observed (unpaired t-tests and chi-square tests).

Table 2. mRNA expression (ratio gene/GAPDH) of 3 endothelial genes in hIMA EC at low, intermediate and high levels of senescence compared to intermediate senescence in control hAoEC.

Cell type	hIMA	hIMA	hIMA	hAoEC
Senescence	Low	Intermediate	High	Intermediate
Cox-1 (n=5)	0.057±0.021	0.032±0.009	0.026±0.010	0.621±0.043 †
Cox-2 (n=5)	0.123±0.017	0.452±0.075 *	1.208±0.010 *	0.187±0.031 †
eNOS (n=5)	2.6x10 ⁻⁴	9.0x10 ⁻⁵	1.6x10 ⁻⁴	1.640
	±1.1 x10 ⁻⁴	±5.2x10 ⁻⁵	±7.3 x10 ⁻⁵	±0.530 †

*: p<0.05 compared to Low (hIMA) (one-way repeated measures ANOVAs); †:

p<0.05 compared to intermediate hIMA (unpaired t-test).

Figure 1

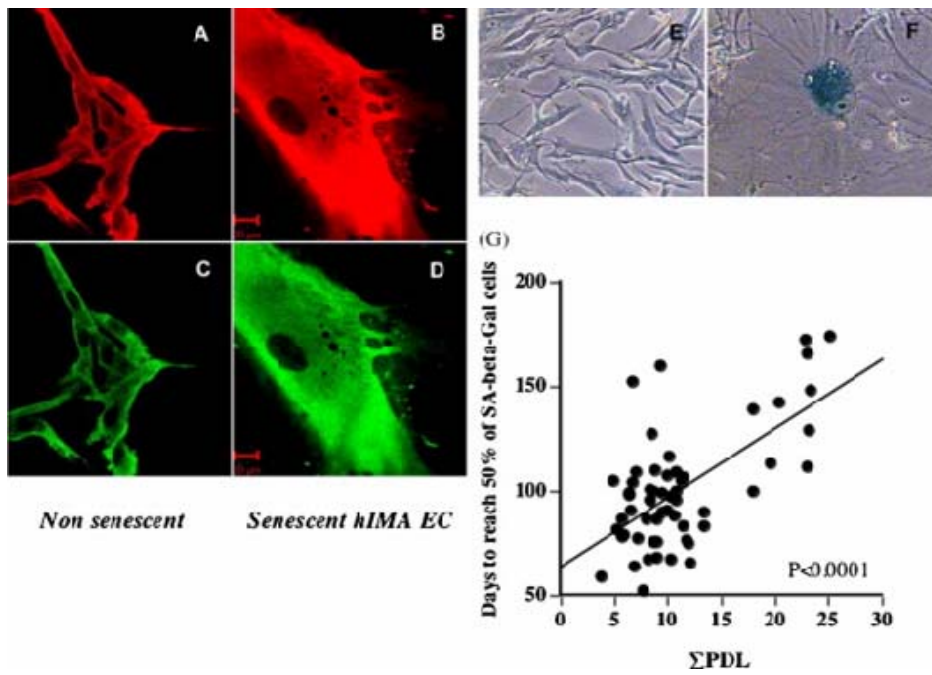


Figure 2

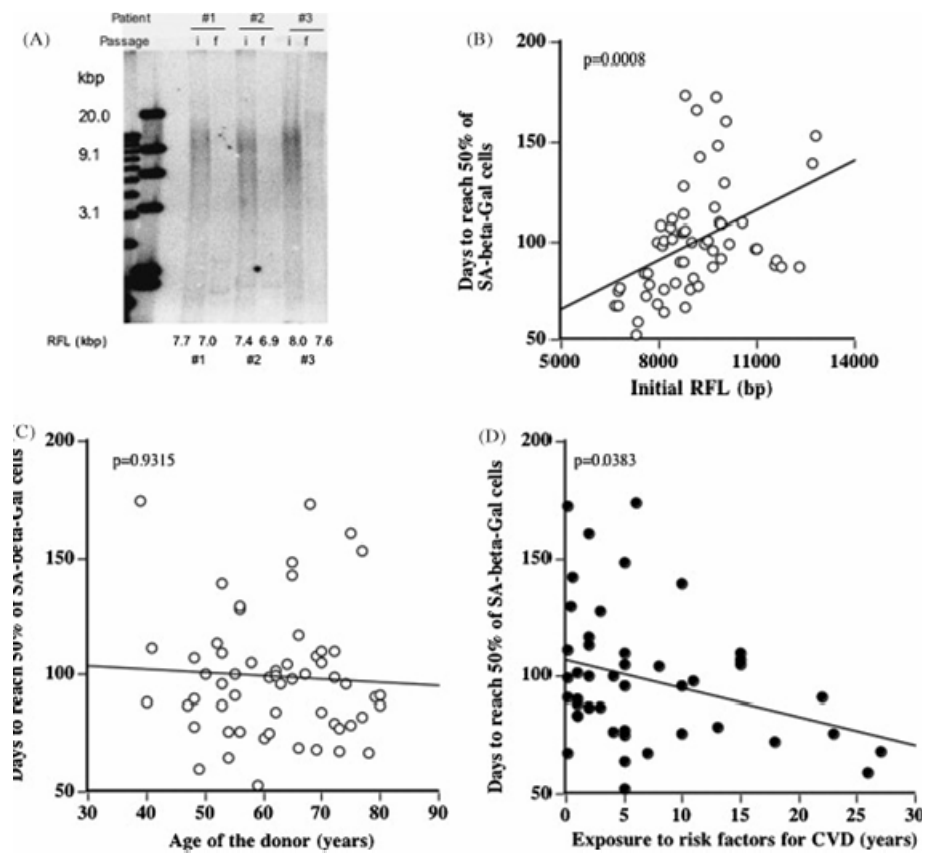


Figure 3

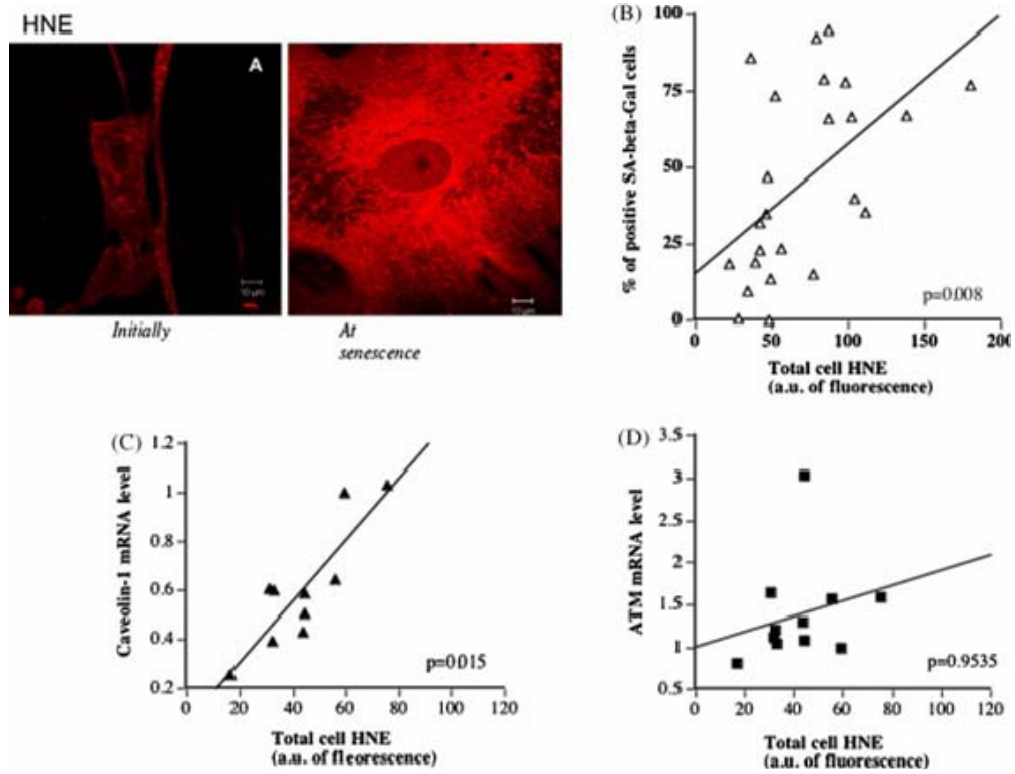
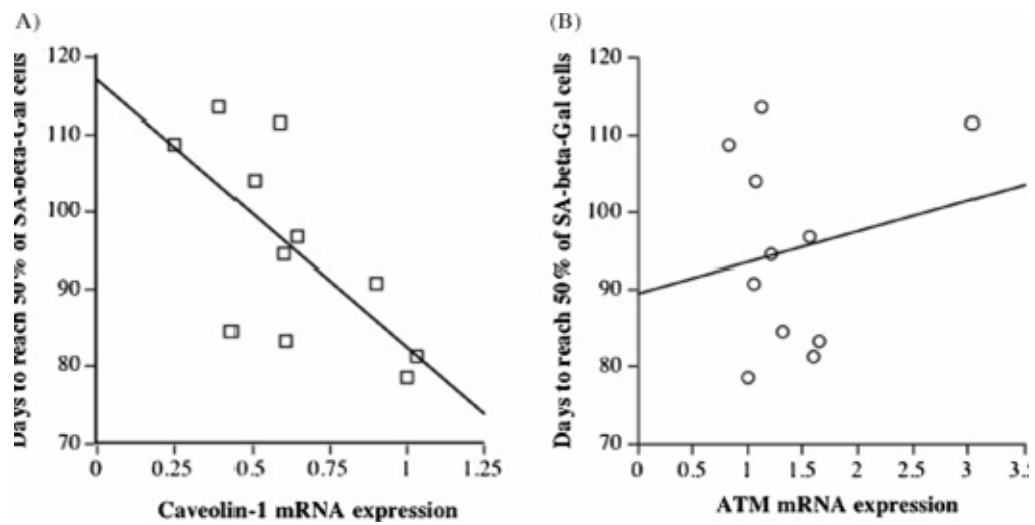


Figure 4



Étude #2

Apport original et contribution des co-auteurs:

La contribution du premier auteur, Guillaume Voghel, est majeure et partagée puisqu'il a participé à toutes les expérimentations et à la rédaction du manuscrit. L'ampleur du travail a requis la collaboration du Dr Nathalie Trescases-Thorin pour plusieurs expériences et elle a participé à la culture cellulaire et à la rédaction/révision du manuscrit. Nada Farhat a effectué certaines expériences de PCR et Monsieur Louis Villeneuve a participé à l'acquisition des images d'immunofluorescence par microscopie confocale. Mme Annick Fortier a effectué les analyses biostatistiques. Les Drs Michel Carrier et Louis P. Perrault, chirurgiens, ont fourni les prélèvements d'artères provenant des patients. Finalement, le Dr Éric Thorin a supervisé l'étude et contribué à la rédaction/révision du manuscrit.

PERMISSION DE L'ÉDITEUR

1. Identification de la revue ou du livre

Mechanism of Ageing and Development

6277 Sea Harbor Drive

Orlando, FL 32887-4800 USA

9 Juillet 2008

2. Identification de l'éditeur ou des éditeurs

V.A. Bohr

3. Identification de l'article

Guillaume Voghel, Nathalie Thorin-Trescases, Nada Farhat, Aida M. Mamarbachi,

Louis Villeneuve, Annik Fortier, Louis P. Perrault, Michel Carrier and Eric Thorin

Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors

Mechanisms of Ageing and Development, 2008, Volume 129: 261-270.

L'étudiant, Guillaume Voghel, est autorisé à inclure l'article ci-dessus dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : « Vieillesse vasculaire chez des patients athérosclérotiques : sénescence prématurée des cellules endothéliales? »

Éditeur Signature Date

Chronic treatment with *N*-acetyl-cystein delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients.

Guillaume Voghel¹, Nathalie Thorin-Trescases¹, Nada Farhat, Aida M. Mamarbachi, Louis Villeneuve, Annik Fortier ‡, Louis P. Perrault, Michel Carrier, Eric Thorin².

Department of Surgery, Research Center and ‡ Montreal Heart Institute Coordinating Center Biostatistical Department, Montreal Heart Institute, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Running head: Dual effect of antioxidant on endothelial cell senescence.

¹ These authors equally contributed to this work.

² To whom correspondence should be addressed: Montreal Heart Institute, Research Center, 5000, rue Bélanger, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330; Fax.: (514) 376-1355; Email: eric.thorin@umontreal.ca

Abstract

Endothelial senescence may contribute to the pathogenesis of age-related vascular disorders. Furthermore, chronic exposure to risk factors for cardiovascular disease (CVD) accelerates the effects of chronological aging by generating stress-dependent damages, including oxidative stress, therefore promoting stress-induced premature senescence. Our objective was to determine whether a chronic treatment with an antioxidant (*N*-acetyl-cystein, NAC) could delay senescence of endothelial cells (EC) isolated and cultured from arterial segments of patients with severe coronary artery disease. If EC were considered as one population (n=26), chronic NAC treatment slightly shortened telomere attrition rate associated with senescence but did not significantly delay the onset of endothelial senescence. However, in a subgroup of NAC-treated EC (n=15) cellular senescence was significantly delayed, NAC decreased lipid peroxidation (HNE), activated the catalytic subunit of telomerase (hTERT) and inhibited telomere attrition. In contrast, in another subgroup of EC (n=11) characterized by initial short telomeres, no effect of NAC on HNE and high levels of DNA damages, the antioxidant was not beneficial on senescence, suggesting an irreversible stress-dependent damage. In conclusion, chronic exposure to NAC can delay senescence of diseased EC *via* hTERT activation and transient telomere stabilization, unless oxidative stress-associated cell damage has become irreversible.

Key words: Endothelium, cardiovascular disease, oxidative stress, antioxidant, cellular senescence.

Introduction

The free radical theory of aging hypothesizes that the accumulation of oxidative damage is a central mediator of the aging process and age-related disorders (Harman, 1956; Humphries et al., 2006; Donato et al., 2007). At the cellular level, aging of healthy vascular endothelial cells (EC) leads to replicative senescence, a state of permanent growth arrest due to cumulative telomere attrition (Ben-Porath and Weinberg, 2005; Chen and Goligorsky 2006). Oxidative stress associated with aging and risk factors for cardiovascular diseases (CVD) (Csiszar et al., 2002) may induce DNA damage (Lorenz et al., 2001; von Zglinicki 2002), accelerate reparative cell division, promote telomere instability and lead to premature stress-induced senescence (SIS) (Kurz et al., 2004; Voghel et al., 2007). Excessive telomere shortening has been reported in circulating white blood cells from patients with various CVD (Jeanclos et al., 1998; Jeanclos et al., 2000; Samani et al., 2001; Brouillette et al., 2003). Evidences for the potential impact of vascular cellular senescence on aging and age-related disorders are emerging: endothelial dysfunction and senescence measured *in vivo* in the animal model of metabolic syndrome/type 2 diabetes could be prevented by ebselen, a peroxynitrite scavenger (Brodsky et al., 2004). Furthermore, *in vitro* studies in healthy human umbilical vein EC and fibroblasts in culture showed that cellular senescence could be prevented when oxidative stress is controlled (Furumoto et al., 1998; Haendeler et al., 2003; Wang et al., 2003; Bode-Böger et al., 2005). It is not known however, if such manipulations can delay stress-induced senescence of EC isolated from patients exposed to risk factors for CVD (Voghel et al., 2007). EC from atherosclerotic patients are most likely damaged, and thus expected to respond differently from EC isolated from healthy donors.

The objective of the present study was to elucidate whether a chronic antioxidant treatment could reverse premature stress-induced senescence in EC isolated from patients with severe coronary artery disease (CAD). We demonstrate that chronic antioxidant treatment can only delay the appearance of EC senescence — *via* lessening of stress-induced senescence and telomerase-induced telomere stabilization — unless EC have undergone an irreversible ROS-associated damage. This contrasts with previous reports showing that antioxidant significantly delays senescence in healthy cells exposed to an exogenous stress.

Experimental procedures

Clinical profile of the donors. Segments of human distal (close to the bifurcation) internal mammary artery (IMA, n=26, Table 1) harvested with low electrocautery energy and excised with cold scissors, discarded during primary CABG were used in this study. This study was approved by our institutional ethical committee.

Isolation and culture of EC. Endothelial cells were isolated and cultured by an explant technique from segments of human IMA, as previously described (Voghel et al., 2007). Cells were incubated in Dubelcco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum, 10% calf serum, 1% penicillin-streptomycin, 90 µg/ml sodium heparin salt (Sigma-Aldrich), 60 µg/ml EC growth supplement (Becton Dickinson), and 100 U/ml fungizone (Gibco), at 37°C in a 95% air/5% CO₂ incubator. Starting at passage 2, primary cells isolated from the same donor were divided in two lots and grown throughout the duration of the culture, in the presence or absence of the antioxidant NAC (10 µM) (Sigma). NAC was replaced every two days. At each passage, cells were collected for senescence-associated β galactosidase (SA-β-Gal), DNA (Southern blotting), RNA (real-time RT-PCR) and protein (Western blotting) extraction and some cells were plated on coverslips for immunostaining. Before replating, cells were counted using a hemocytometer and population doubling levels (PDL) were calculated.

Senescence-associated β-galactosidase staining. SA-β-Gal was used as a marker of senescence (Dimri et al., 1995; Voghel et al., 2007).

Telomere length measurement. Endothelial cells were grown in 75 cm² flasks at early and subsequent passages until senescence was reached, in the presence or absence of NAC. DNA was extracted from EC with a phenol/chloroform/isoamyl alcohol technique, and restriction fragments lengths (RFL) were quantified using a Southern blot technique (Zhang et al., 2000; Voghel et al., 2007).

Immunofluorescence. Immunostaining was used to assess the expression and sub-cellular localization of 4-hydroxy-nonenal (HNE) (rabbit polyclonal anti-HNE, 1:200, Alpha Diagnostics), p53 (mouse monoclonal anti-p53, 1:200, Upstate), phospho H2AX (mouse monoclonal anti-H2AX, 1:200, Upstate), ATM (rabbit polyclonal anti-ATM, 1:100, Santa Cruz), promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies (generous gift of Dr G. Ferbeyre, University of Montreal, Canada) and hTERT (mouse monoclonal anti-hTERT, 1:200, Abcam) at different levels of senescence, in the presence or absence of NAC. DNA counterstaining was performed by incubating EC with propidium iodide (20 µM; Molecular Probe) or TOPRO-3 (2µM, Molecular Probes). Negative controls consisted in omitting the primary antibodies during the protocol. Cells were visualized using a confocal microscope (Zeiss LSM 510). Semi-quantitative analysis (LSM-510, Zeiss) was performed by measuring the HNE-fluorescence intensity in whole cells from 4-5 different pictures from the same coverslip. Quantification of the nuclear and cytosolic fluorescent signals obtained with H2AX, ATM, p53, PML was also performed. The ratio nucleus/cytosol was calculated and normalized by the number of cells. Values are expressed in arbitrary units of fluorescence (a.u.).

Telomerase activity. Real time-TRAPassay was used to measure hTERT activity in hIMA EC (Ohuchida et al., 2005). Serial dilutions (0.1 ng to 1000 pg) of HEK293 (Invitrogen) were used as standard curve. Real time-TRAPassay was performed using 5 pmol of M₂-TS forward primer (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'), 1.25 pmol of ACX reverse primer (5'-GCGCGG(CTTACC)₃CTAACC-3') and EC nuclear or cytosolic proteins (20 ng) or serially diluted HEK293 proteins. Nuclear and cytosolic proteins were extracted using a nuclear and cytoplasmic extraction kit (Pierce Biotechnology) in the presence of 10x protease inhibitor cocktail (Pierce Biotechnology). All samples were run in triplicate and either lysis buffer or heat-inactivated samples were used as a negative control. Enzymatic activity was reported using arbitrary units: 1 unit is equivalent to the activity of 1 ng of HEK293. Telomerase activity was quantified at low senescence in the presence or absence of NAC, and the average values are presented (Fig 7). The detection limit of endogenous hTERT activity was estimated to be the background value of hTERT activity in samples with only lysis buffer.

Real-time RT-PCR. Total RNA was isolated using a RNeasy kit (Qiagen) at early and subsequent passages until senescence was reached, in the presence and absence of NAC. Real-time PCR was carried out on diluted RT products using the DNA-binding dye SYBR Green I for the detection of PCR products (Mx3005P system, Stratagene) according to the manufacturer's instruction. Serial dilutions (100 ng to 1pg) of human aortic EC (hAoEC) (Cambrex) total RNA were used as standard. The following

primers designed by primer express (Version 2.0) were used in order to quantify gene expression of Caveolin-1 and ATM:

<i>Primer</i>	<i>(5'- 3') Forward</i>	<i>(5'- 3') Reverse</i>
GAPDH	TGAAGGTCGGAGTCAACGGA	CATTGATGACAAGCTTCCCG
Caveolin-1	GCTGAGCGAGAAGCAAGTGT	TGGTGAAGCTGGCCTTCCAA
ATM	GGCAGCTGATATTCGGAGGA	CATCTTGGTCACGACGATAC

mRNA levels in each sample were calculated relative to GAPDH which did not vary with senescence or NAC treatment.

Statistical analysis of the data. Data are presented as mean±sem for continuous variables, with *n* indicating the number of patients. Unpaired t-tests and chi-square tests were used to study the clinical profile of EC donors (Table 1 and table 2).

Two-tailed paired t-tests were used to compare NAC treated and matched-control untreated cells. Unpaired t-tests were used to compare data in EC responding positively or not to the antioxidant treatment. The significance level was fixed to $p < 0.05$. EC were considered as positive responders if the time to reach 50% of senescence was greater than in matched-control untreated cells. In order to predict whether risk factors for CVD could have an impact on the response to NAC (dependent dichotomic variable), we used logistic regression models. Only univariate analyses could be performed because of the small *n* (26 patients: 11 with negative response and 15 with positive).

Results

Effect of a chronic treatment with an antioxidant on cell senescence.

While cells were serially passaged, in the presence or absence of NAC, the first parameter routinely available was the level of senescence. Thus, it rapidly appeared that EC from different donors responded differently to the chronic treatment with the antioxidant.

When all EC are considered, NAC did not significantly affect the onset of senescence: the number of days needed to reach 50% of positive β -Gal cells was similar in NAC-treated cells (124 \pm 9 days) and in their matched control cells (115 \pm 6 days) (n=26, p=0.0789, paired t-test). NAC also did not improve the replication potential of the cells (cumulative PDL in NAC-treated cells 13.7 \pm 1.3 *versus* 13.4 \pm 1.2 in untreated cells, p=0.6686). Similarly, final telomere length only tended to be higher in NAC-treated cells (9.4 \pm 0.2 kpb) compared to their control cells (9.1 \pm 0.2 kbp, p=0.1090), while initial telomere length was not different between NAC-treated (9.4 \pm 0.2 kbp) and untreated cells (9.7 \pm 0.2, p=0.0951). Globally, however, NAC lowered telomere attrition observed in control untreated EC; NAC significantly reduced the telomere (RFL) shortening rate (Δ RFL by replication) associated with senescence, decreasing from -56.6 \pm 14.0 bp/PDL in untreated EC to +3.3 \pm 19.7 bp/PDL in NAC-treated cells (p=0.0277).

Because NAC had clearly opposite effects on cell senescence depending on the donor, *i.e* either had no effect (n=11) or in contrast delayed significantly (n=15) EC senescence, cells were split in two categories and analysed separately. The parameter used to categorise the cells was the number of days to reach 50% of senescence, as it

characterizes the senescence profile of a given cell culture and allows comparisons between the different donors (Voghel et al., 2007). For a given donor, if the number of days to reach 50% of senescence was higher in EC treated with NAC than in paired untreated EC, cells were considered in the “delayed senescence” group (Fig. 1B). In contrast, if NAC-treated EC reached 50% of senescence slightly faster or at a similar rate than their control, cells were classified in the “unaffected senescence” group (Fig. 1A). In the category where NAC did not affect senescence, the time to reach 50% of senescent EC slightly decreased from 115 ± 9 to 107 ± 7 days ($p=0.0132$, $n=11$), cell replication potential was not improved (Fig. 1A) and senescence-associated changes in cell morphology were not restored (Fig. 1B). In contrast, in the group where NAC postponed the appearance of senescence, the time to reach 50% of senescence increased from 116 ± 8 to 148 ± 17 days ($p=0.0063$, $n=15$) (Fig. 1C) while cells underwent more cell divisions (increase in PDL at 50% of senescent EC; $p=0.0334$) and normal EC morphology was partially restored (Fig. 1D).

Effect of a chronic treatment with an antioxidant on telomere length.

In untreated EC, RFL significantly decreased with senescence (Fig. 2). Most importantly, our results show that when NAC did not affect senescence, EC tended to have shorter ($p=0.0552$) initial telomere length (8.9 ± 0.3 kbp, $n=11$) than EC in which NAC postponed senescence (9.8 ± 0.3 kbp, $n=15$) (Fig. 2A). This strongly suggests that a critical telomere length may exist, beneath which NAC no longer provides benefit, possibly reflecting an irreversible advanced state of cell damage. In EC where NAC delayed senescence, chronic antioxidant treatment prevented RFL shortening

associated with cellular senescence (from 9.8 ± 0.3 to 9.8 ± 0.5 kpb, $p=0.9437$, $n=15$) (Fig 2B). In EC where NAC delayed senescence, in 7 out of 15 donors, NAC even increased telomere length, but the final average RFL of control and NAC-treated cells were not significantly different ($p=0.0881$) (Fig. 2B). This can be explained by the large heterogeneity of telomere shortening/lengthening rate in the NAC-treated EC (-155 to $+171$ bp/PDL) and by the fact that we have taken into account only the initial and final RFL but not the intermediate telomere RFL. Our results therefore, cannot describe the complex telomeric dynamic in the presence of NAC but only provide a picture of the final consequence of NAC on telomere shortening.

When the distribution of long and short fragments of RFL are analyzed, it appears that in EC where NAC delayed senescence, the percentage of RFL with long fragments increased. The opposite was observed in NAC-unaffected EC or untreated EC (Figure 2 C, D, E).

Effect of a chronic treatment with an antioxidant on oxidative stress and DNA damage markers. In cells in which NAC delayed senescence, the antioxidant significantly decreased the levels of lipid peroxidation, *i.e.* HNE expression (Fig. 3A and B), an index of oxidative stress, compared to their matched-control cells and to NAC-treated EC in the unaffected category.

Oxidative damages engender double-strand breaks, activate ATM and activated ATM is one of the mediators of histone H2AX phosphorylation (Tanaka et al., 2006a and 2006b). Semi-quantitative analysis shows that, at senescence, NAC-unaffected EC displayed significant higher levels of both markers of DNA damage (Figure 4). In

addition, activated ATM and phosphorylated H2AX strongly positively correlate (Figure 5).

Following cell stress, it has been reported that p53-dependent senescence is associated with a DNA damage/repair process in which PML bodies intervene (Moiseeva et al., 2006). Our results show that p53 strongly positively correlate with PML expression and that NAC significantly decreased nuclear expression of both PML and p53 (Figure 6A-C).

Western blot and immunohistochemical staining of p53 and TRF2 revealed higher average levels of nuclear p53 and TRF2 protein expression in untreated cells in the category where NAC had no effect on senescence (data not shown). Although p53 and TRF2 are not direct markers of DNA damage, their accumulation reflects global cumulative cell damage and telomere instability.

Effect of a chronic treatment with an antioxidant on molecular senescence markers.

We previously reported that in EC isolated from human IMA from patients with severe CAD, caveolin-1 gene expression positively correlates with the lipid peroxidation index HNE and that caveolin-1 gene expression predicts the onset of stress-induced senescence (Voghel et al., 2007). In contrast, ATM gene expression is a marker of DNA damage and rather reflects replicative senescence (Voghel et al., 2007). In EC treated chronically with the antioxidant, NAC abrogated the expression of caveolin-1 (mRNA level under the detection limit, n=12) compared with untreated control EC (1.411 ± 0.416 , $p=0.0281$, n=26). In contrast, the average expression of ATM increased from 0.530 ± 0.045 (n=26) in untreated EC to 3.341 ± 0.969 (n=12) in EC treated

chronically with NAC ($p=0.0001$). These changes in gene expression were observed whether or not EC responded positively or not to NAC. These data suggest that in EC from coronary patients, senescence is mainly triggered by oxidative stress and can be partly delayed by an antioxidant treatment. However, because cells are not immortalized by NAC, DNA and cell damages still occur, leading eventually to senescence.

Effect of NAC on telomerase. Since NAC prevented telomere attrition in EC in which senescence was delayed, the effect of the antioxidant on hTERT activity and its subcellular localization were assessed. NAC triggered some hTERT translocation from the cytosol to the nucleus when senescence was delayed but not when senescence was unaffected (Fig. 7A, B). Telomerase activity in normal EC is extremely low and was therefore detected with the very sensitive real time-TRAP assay. Figure 7C shows that, in EC partially rescued from senescence, NAC increased nuclear hTERT activity by ~95% (from 16.4 ± 2.7 arbitrary units in control cells to 31.9 ± 4.6 arbitrary units in NAC-treated cells, $p=0.0401$, $n=5$). Such increase in hTERT activity was not found in EC showing unaffected senescence (Figure 7C, 16.0 ± 2.3 versus 17.9 ± 2.7 arbitrary units, $p=0.6573$, $n=5$). Hence, the tendency for telomere elongation observed in EC in which NAC delayed senescence could be at least partly due to telomerase translocation and activation.

Discussion

An abundant literature suggests that risk factors for CVD accelerate the normal aging process of the endothelium (Cooper et al., 1994; Cohen 1995; Lakatta 2002; Serrano and Andres 2004; Chen and Goligorsky, 2006). We previously reported that in EC isolated and cultured from segments of IMA from atherosclerotic patients, the duration of exposure to risk factors for CVD is predictive of time to senescence in culture, independently of the age of the donor, and that in this context of high endogenous oxidative stress, senescence was stress-induced rather than replicative (Voghel et al., 2007). In the present study, we demonstrate that a chronic treatment with an antioxidant could only delay the onset of senescence in a subgroup of diseased EC.

In 58% (15/26) of EC chronically treated with NAC, the lipid peroxidation marker HNE decreased, DNA and cellular damage markers decreased, telomere length was maintained (and elongated in 7/15 patients), and thus senescence was significantly delayed. NAC is a source of sulfhydryl groups and is physiologically converted to metabolites that will stimulate glutathione synthesis, an important source of endogenous antioxidant. Thus, NAC is an indirect antioxidant agent by increasing intracellular glutathione, but it is also known as a direct scavenger of ROS (Zafarullah et al., 2003). Chronic treatment with NAC activated and led to some translocation of the catalytic subunit of the telomerase from the cytosol to the nucleus. This effect might be responsible for the lack of telomere shortening and thus, delayed senescence. The role of this NAC-induced hTERT activation in the delay of senescence is in accordance with data collected in healthy human umbilical vein EC exposed to

exogenous H₂O₂ (Haendeler et al., 2003). Although the response to NAC cannot be linked with the clinical history of the patient, due to the low number, this is the first demonstration that human EC exposed for years to risk factors for CVD, a condition with no equivalent experimental model, can be partially rescued from senescence by an antioxidant. The beneficial effect remains modest, and restricted to a particular subgroup of patients, in contrast to what was previously reported in healthy EC exposed to an exogenous oxidative stress (Furumoto et al., 1998; Haendeler et al., 2003; Bode-Böger et al., 2005).

We found indeed that hIMA EC from another subset of patients (11/26) did not benefit from a chronic NAC treatment: oxidative stress (HNE) was not reduced, DNA and cell damage markers accumulated, hTERT was neither translocated to the nucleus nor activated, telomeres did not elongate and senescence was not affected. This may suggest that the beneficial effect of NAC on senescence was hTERT-dependent, but the level of NAC-induced hTERT activation remains low compared to HEK tumoral cells (data not shown), and NAC-treated cells eventually entered in senescence. Thus, it is unlikely that such modest increase in hTERT activity *per se* is sufficient to bypass EC damage and prolong cell survival. Indeed, EC that did not benefit from NAC treatment had shorter initial telomere and higher accumulation of DNA and cell damage markers such H2AX, ATM, PML, p53 and TRF2. This suggests that the beneficial effect of NAC on senescence of EC that have been exposed to risk factors for CVD *in vivo* is primarily dependent on a reduction of oxidative stress that will subsequently favor some hTERT activity. These changes should limit further cellular damage, reduce telomere attrition and delay temporarily the onset of senescence. One hypothesis for the lack of effect of NAC on HNE levels in unaffected-treated cells is

that in these particularly damaged EC, endogenous antioxidant capacities are extremely limited and that glutathione synthesis is not stimulated. Consequently, HNE levels are not decreased and senescence not delayed.

Telomerase enzymatic activity can be regulated at multiple levels, including hTERT transcription, alternative splicing, chaperon-mediated folding, phosphorylation and nuclear translocation. The major control mechanism of hTERT activity, however, seems to be the regulation of hTERT expression. Indeed, the hTERT promoter contains a binding site for transcription factors such as SP-1 and c-Myc, both activators of hTERT transcription and for Mad-1, an inhibitor of hTERT expression (Cong et al., 1999). Recent studies revealed that HNE can repress directly hTERT expression. Indeed, Pizzimenti *et al.* showed that HNE is able to inhibit c-Myc binding complex and induce Mad-1 in human leukemic cell lines (Pizzimenti et al., 2006). Furthermore, HNE is also able to repress cyclin D₂, a cell cycle regulatory protein (Pizzimenti et al., 1999). This could explain why EC unaffected by NAC and presenting higher levels of HNE exhibit no increase in hTERT activity. Another explanation for HNE-induced hTERT repression could be mediated by p53; HNE enhances p53 expression and this protein has the ability to inhibit the binding of SP-1 to the proximal promoter of hTERT and thus, repress hTERT activity (Stampfer et al., 2003; Shats et al., 2004). In addition, Shats *et al.* found an atypical E2F site responsible for the repression of hTERT as well as other cell cycle molecules such as cdc2 (Shats et al., 2004; Taylor et al., 2001). This transcription factor can be activated *via* the p53-p21-pRb pathway and repress the endogenous expression of hTERT. As EC unaffected by NAC presented higher levels of p53 and HNE levels were unchanged by NAC, this could explain, at least in part, why NAC-unaffected EC did not exhibit an increase in hTERT activity. In

contrast, in the delayed group, NAC decreased both HNE and p53 proteins levels, in accordance with the increase in nuclear hTERT activity.

Since senescence can be triggered either by telomere instability (replicative senescence, ATM/p53-p21 pathway) or by multiple types of stresses including oxidative stress (SIS, caveolin/p53 pathway) (Voghel et al., 2007), we assessed which pathways were modified by the antioxidant by quantifying the genic expression of caveolin-1 and ATM. Caveolin-1, which is one of the principal protein of caveolae, invaginations enriched in cholesterol within the plasma membrane, is also known to increase in the presence of oxidative stress and to trigger senescence (Galbiati et al., 2001; Voghel et al., 2007). Our results show that caveolin-1 gene expression was abrogated in NAC-treated EC whether or not NAC delayed the onset of senescence. This strongly suggests that stress-induced senescence was lowered by the antioxidant. In contrast we observed that the level of ATM gene expression, a protein acting as a controller of cellular responses to DNA damage (Pandita, 2002; Herbig et al., 2004), increased in EC treated with NAC in all cells compared to their matched untreated EC. This suggests that even in the presence of NAC, DNA and cellular damage accumulate and trigger some replicative senescence (a schematic representation of the different pathways of senescence is summarized on fig. 8).

In order to predict statistically the positive (delayed senescence) or negative (unaffected senescence) response of EC treated with NAC, we used logistic regression model. The only risk factor for CVD that significantly predicted the response to NAC is sex (Table 2): negative response to NAC was never observed in EC from female donors ($p=0.0331$). However, it could only reflect the larger proportion of male donors

(n=21) compared to female (n=5). Neither age (p=0.1842), BMI (p=0.8448), duration of exposure to CVD (p=0.2807), dyslipidemia (p=0.4142), hypertension (p=0.8611), diabetes (p=0.3812), smoking (p=0.3938), nor LVEF (p=0.6812) could predict the response of EC to NAC treatment, clearly demonstrating the multifactorial origin of CAD. We previously showed, however, that in these EC isolated from coronary patients, long exposure to CVD and particularly to hypertension, lead to precocious senescence and low proliferation (Voghel et al., 2007).

In conclusion, our results show that chronic antioxidant treatment can delay stress-induced senescence of cultured EC isolated from patients with extensive CAD, partially by decreasing cellular and genic oxidative stress markers, by maintaining telomere length and by activating hTERT. There is no beneficial effect of NAC however, in EC that appear to have undergone an insurmountable damage possibly due to uncontrolled free radical production and lower endogenous antioxidant capacities.

Acknowledgements

This work has been supported in part by the Foundation of the Montreal Heart Institute, the Heart and Stroke Foundation of Quebec, and the Canadian Institute for Health Research (MOP 14496). Guillaume Voghel is a fellow of the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec*. We thank Guy Charron (Montreal Heart Institute) for fruitful discussions and technical advises, and the biological tissue bank (RETEB) of the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec* for technical support.

References

- Ben-Porath I., Weinberg, R.A. 2005. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 961-976.
- Bode-Böger S.M., Martens-Lobenhoffer, J., Täger, M., Schröder, H., Scalera, F. 2005. Aspirin reduces endothelial senescence. *Biochem Biophys Res Commun* 334, 1226-1232.
- Brodsky S.V., Gealekman, O., Chen, J., Zhang, F., Togashi, N., Crabtree, M., Gross, S.S., Nasjletti, A., Goligorsky, M.S. 2004. Prevention and reversal of premature endothelial cell senescence and vasculopathy in obesity-induced diabetes by ebselen. *Cir Res* 94, 377-384.
- Brouillette S., Singh, R.K., Thompson, J.R., Goodall, A.H., Samani, N.J. 2003. White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 842-846.
- Chen J., Goligorsky, M.S. 2006. Premature senescence of endothelial cells: Methusaleh's dilemma. *Am J Physiol* 290, H1729–H1739.
- Cohen R.A. 1995. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 38, 105-128.
- Cong Y.S., Wen J., Bacchetti S. 1999. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet* 8, 137-142.
- Cooper L.T., Cooke, J.P., Dzau, V.J. 1994. The vasculopathy of ageing. *J Gerontol* 49, B191-B196.
- Csiszar A., Ungvari, Z., Edwards, J.G., Kaminski, P., Wolin, M.S., Koller, A., Kaley, G. 2002. Ageing-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res* 90, 1159-1166.
- Dimri G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacock, M., Campisi, J. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 9363-9367.
- Donato, A.J., Eskurza, I., Silver, A.E., Levy, A.S., Pierce, G.L., Gates, P.E., Seals, D.R. 2007. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans. Relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kB. *Circ Res* 100, 1659-1666.

- Furumoto K., Inoue, E., Nagao, N., Hiyama, E., Miwa, N. 1998. Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress. *Life Sci* 63, 935-948.
- Galbiati F., Volonte, D., Liu, J., Capozza, F., Frank, P.G., Zhu, L., Pestell, R.G., Lisanti, M.P. 2001. Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G0/G1 arrest via p53/p21^{WAF/Cip1}-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 12, 2229-2244.
- Haendeler J., Hoffmann, J., Diehl, J.F., Vasa, M., Spyridopoulos, I., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. 2003. Antioxidant inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells. *Circ Res* 94, 768-775.
- Haendeler J., Hoffmann, J., Brandes, R.D., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. 2003. Hydrogen peroxide triggers nuclear export of telomerase reverse transcriptase via Src kinase family-dependent phosphorylation of tyrosine 707. *Mol Cell Biol* 23, 4598-4610.
- Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298-300.
- Herbig U., Jobling, W.A., Chen, B.P.C., Chen, D.J., Sedivy, J.M. 2004. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53 and p21^{CIP1}, but not p16^{INK4a}. *Mol Cell* 14, 501-513.
- Humphries K.M., Sweda, P.A., Sweda, L.I. 2006. Ageing: a shift from redox regulation to oxidative damage. *Free Rad Res* 40, 1239-1243.
- Jeanclous E., Krolewski, A., Skurnick, J., Kimura, M., Aviv, H., Warram, J.H., Aviv, A. 1998. Shortened telomere length in white blood cells of patients with IDDM. *Diabetes* 47, 482-486.
- Jeanclous E., Schork, N.J., Kyvik, K.O., Kimura, M., Skurnick, J.H., Aviv, A. 2000. Telomere length inversely correlates with pulse pressure and is highly familial. *Hypertension* 36, 195-200.
- Kurz D.J., Decary, S., Hong, Y., Trivier, E., Akhmedov, A., Erusalimsky, J.D. 2004. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci* 117, 2417-2426.
- Lakatta E.G. 2002. Age-associated cardiovascular changes in health: impact on cardiovascular disease in older persons. *Heart Fail Rev* 7, 29-49.

Lorenz M., Saretzki, G., Sitte, N., Metzkw, S., von Zglinicki, T. 2001. BJ fibroblasts display high antioxidant capacity and slow telomere shortening independent of hTERT transfection. *Free Radic Biol Med* 31, 824-831.

Moiseeva O., Mallette FA., Mukhopadhyay UK., Moores A., Ferbeyre G. 2006. DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged beta-interferon stimulation. *Mol Biol Cell* 17. 1583-92.

Ohuchida K., Mizumoto, K., Ogura, Y., Ishikawa, N., Nagai, E., Yamaguchi, K., Tanaka, M. 2005. Quantitative assessment of telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase messenger RNA levels in pancreatic juice samples for the diagnosis of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 11, 2285-2292.

Pandita T.K. 2002. ATM function and telomere stability. *Oncogene* 21, 611-618.

Pizzimenti S., Barrera G., Dianzani M.U., Brusselbach S. 1999. Inhibition of D1, D2 and A-cyclin expression in HL-60 cells by the lipid peroxydation product 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* 26, 1578-1586.

Pizzimenti S., Briatore, F., Laurora, S., Toaldo, C., Maggio, M., De Grandi, M., Meaglia, L., Menegatti, E., Giglioni, B., Dianzani. M.U., Barrera, G. 2006. 4-Hydroxynonenal inhibits telomerase activity and hTERT expression in human leukemic cell lines. *Free Radic Biol Med* 409, 1578-1591.

Samani N.J., Boulby, R., Butler, R., Thompson, J.R., Goodall, A.J. 2001. Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet* 358, 472-473.

Serrano A.L., Andres, V. 2004. Telomeres and cardiovascular disease: does size matter? *Circ Res* 94, 575-584.

Shats I., Milyavsky M., Tang X., Stambolsky P., Erez N., Brosh R., Kogan I., Braunstein I., Tzukerman M., Ginsberg D., Rotter V. 2004. p53-dependent down-regulation of telomerase is mediated by p21^{waf1}. *J Biol Chem* 279, 50976-50985.

Stampfer M.R., Garbe, J., Nijjar, T., Wigington, K., Swisshelm, K., Yaswen, P. 2003. Loss of p53 function accelerates acquisition of telomerase activity in indefinite lifespan human mammary epithelial cell lines. *Oncogene* 22, 5238-5251.

Tanaka T., Kurose A., Huang X., Dai W., Darzynkiewicz Z. 2006a. ATM activation and histone H2AX phosphorylation as indicators of DNA damage by DNA topoisomerase I inhibitor topotecan and during apoptosis. *Cell Prolif* 39, 49-60.

- Tanaka T., Halicka HD., Huang X., Traganos F., Darzynkiewicz Z. 2006b. Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation, the reporters of DNA damage by endogenous oxidants. *Cell Cycle* 5, 1940-1945.
- Taylor W.R., Schonthal A.H., Galante J., Stark G.R. 2001. p130/E2F4 binds to and represses the cdc2 promoter in response to p53. *J Biol Chem* 276, 1998-2006.
- Voghel G., Thorin-Trescases, N., Farhat, N., Nguyen, A., Villeneuve, L., Mamarbachi, A. M., Fortier, A., Perrault, L.P., Carrier, M., Thorin, E. 2007. Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by stress associated with cardiovascular risk factors. *Mech Ageing Dev*, in press.
- von Zglinicki T. 2002. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 27, 339-344.
- Wang P., Zhang, Z., Ma, X., Huang, Y., Liu, X., Tu, P., Tong, T. 2003. HDTIC-1 and HDTIC-2, two compounds extracted from Astragali Radix, delay replicative senescence of human diploid fibroblasts. *Mech Ageing Dev* 124, 1025-1034.
- Zafarullah M., Li, W.Q., Sylvester, J., Ahmad, M. 2003. Molecular mechanisms of N-acetylcystein actions. *Cell Mol Life Sci* 60: 6-20.
- Zhang L., Aviv, H., Gardner, J.P., Okuda, K., Patel, S., Kimura, M., Bardeguet, A., Aviv, A. 2000. Loss of chromosome 13 in cultured human vascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 260, 357-364.

Figure legends

Figure 1

Dual effect of chronic treatment with N-Acetyl-Cystein on the time course of senescence

Two populations of EC were isolated according to their response to NAC (10 μ M) on senescence: time course of senescence was either unaffected (n=11) (Fig 1A, B) or delayed (n=15) (Fig 1C, D). Unaffected senescence was evidenced by a slightly shorter time needed to reach 50% of senescence (SA- β -Gal positive cells) (*: p<0.05 compared to control untreated cells) with no change in the replication potential (Fig 1A) or cell morphology (Fig 1B). Delayed senescence was demonstrated by a longer time needed to reach 50% of β -Gal positive cells (p<0.05) and an increased replication potential (Fig 1C) (*: p<0.05 compared to control untreated cells) as well as an improvement in cell morphology (Fig 1D).

Figure 2

Dual effect of chronic treatment with N-Acetyl-Cystein on telomere length

Telomere length (RFL, bp) was measured by Southern blot in control and NAC-treated cells, initially (initial passage) and when cells reached senescence (final passage). (A) In NAC-unaffected EC, RFL were not affected by the antioxidant. (B) In cells where NAC delayed senescence, telomere shortening was prevented by NAC. Representative Southern blot and the distribution (%) of short (5-10kb), intermediate (10-15kb) and

long (15-20kb) telomeric fragments length are shown in control non-treated EC (C), NAC-treated unaffected EC (D) and NAC-delayed EC (E).

*: $p < 0.05$ final passage *versus* initial passage in control cells.

Figure 3

Modulation of oxidative stress by NAC

(A) Typical paired measurement (Control/NAC) of lipid peroxidation in fixed EC by HNE immunostaining in control and NAC-treated cells. (B) Average levels of HNE (intensity of fluorescence detected by immunofluorescent staining, arbitrary units) in control (n=7-9) and NAC-treated (n=11) EC.

*: $p < 0.05$ compared to untreated cells in the “delayed senescence” group.

†: $p < 0.05$ compared to NAC-treated cells in "unaffected senescence" group.

Figure 4

Modulation of DNA damage makers by NAC

Immunostaining of H2AX (A, B and C) and ATM (A, B and D) in NAC-treated EC, at low passage (P4) and at senescence (final P), in cells in which senescence was either unaffected or delayed by the chronic antioxidant treatment. Bar graphs of H2AX (C) and ATM (D) staining of EC in the “delayed” group (n=10) and in the “unaffected” group (n=11). Data represent the ratio of nuclear/cytosolic fluorescent signal corrected by the number of cells. Bars = 20 μ m.

*: $p < 0.05$ compared to EC at passage 4, in the “unaffected” or “delayed” category.

†: $p < 0.05$ compared to EC in the “unaffected” category.

Figure 5*Positive correlation between ATM and H2AX.*

Immunostaining of H2AX (red), ATM (green) and TOPRO-3 (nuclear staining in blue) in NAC-treated EC, at senescence (final P), in cells in which senescence was either unaffected or delayed by the chronic antioxidant treatment. H2AX and ATM positively correlate (n=11). Data represent the ratio of nuclear/cytosolic fluorescent signal corrected by the number of cells. Bars = 20 μ m.

Figure 6*Modulation cellular damage makers by NAC*

Immunostaining of PML bodies (red), p53 (green) and TOPRO-3 (nuclear staining in blue) (A) in control senescent EC and in NAC-treated EC in which senescence was delayed by the chronic antioxidant treatment. (B) Bar graphs of PML and p53 staining of EC (n=14). (C) p53 and PML positively correlate. Data represent the ratio of nuclear/cytosolic fluorescent signal corrected by the number of cells. Bars = 20 μ m.

*: $p < 0.05$ compared to control EC.

Figure 7*Modulation of hTERT by NAC*

Confocal images of hTERT-immunostained cells in control and NAC-treated EC. Translocation of the enzyme from the cytosol to the nucleus was observed if the antioxidant delayed the appearance of senescence (B) but not if NAC did not affect the time course of senescence (A). Cytosolic and nuclear hTERT activity (arbitrary units)

detected by real time-TRAP assay, in control and NAC-treated cells (C) not affected (n=5) or positively affected (n=5) by NAC. The bar scale represents 10 μ m.

*: $p < 0.05$ compared to control cells. †: $p < 0.05$ compared to nuclear hTERT activity in NAC-treated cells from the "unaffected senescence" group.

Figure 8: *Schematic representation of molecular pathways of senescence*

In control untreated EC, p53-dependent stress-induced senescence (SIS) can be triggered either by ROS-dependent caveolin-1 activation, or by ROS-dependent accumulation of DNA damage. Replicative senescence is mainly triggered by excessive telomere shortening which is recognized as DNA damage as reflected by markers such as ATM/H2AX. When treated chronically with NAC, caveolin-1 expression was abolished in both the unaffected and the delayed senescence group. We showed however, that when the levels of HNE and p53, both suppressors of hTERT activity, are too high, hTERT is not activated, telomere shortening is not prevented, DNA damage accumulates and senescence is unaffected. In contrast, when HNE and p53 levels are lowered, NAC activated hTERT and this was associated with a delay in the onset of senescence. These EC however, still accumulate DNA damages associated with a loss of endogenous DNA repair mechanism and thus, finally, reach senescence.

Figure 1

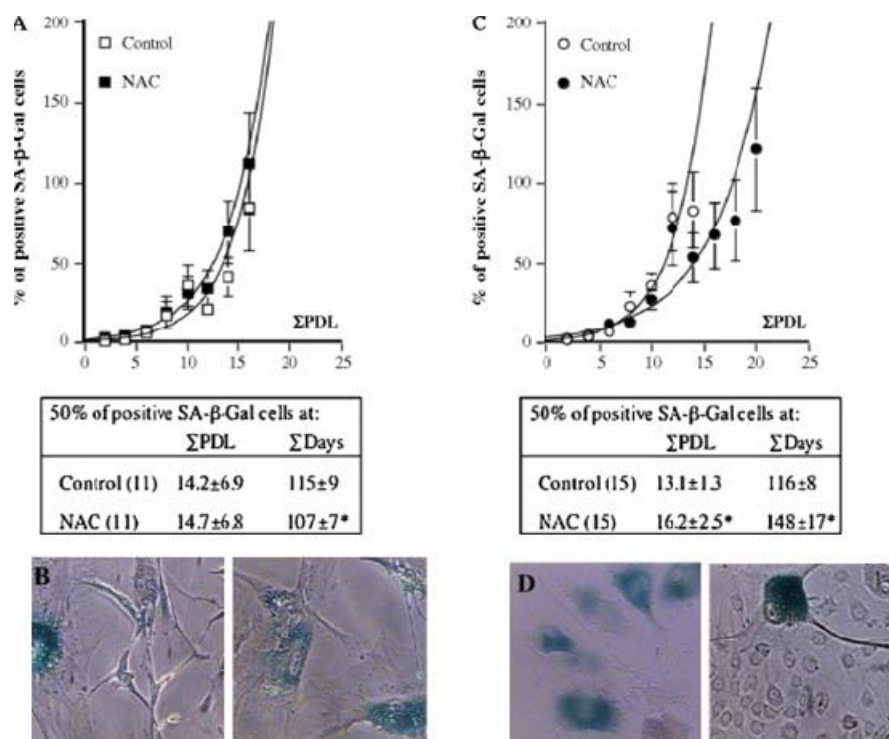


Figure 2

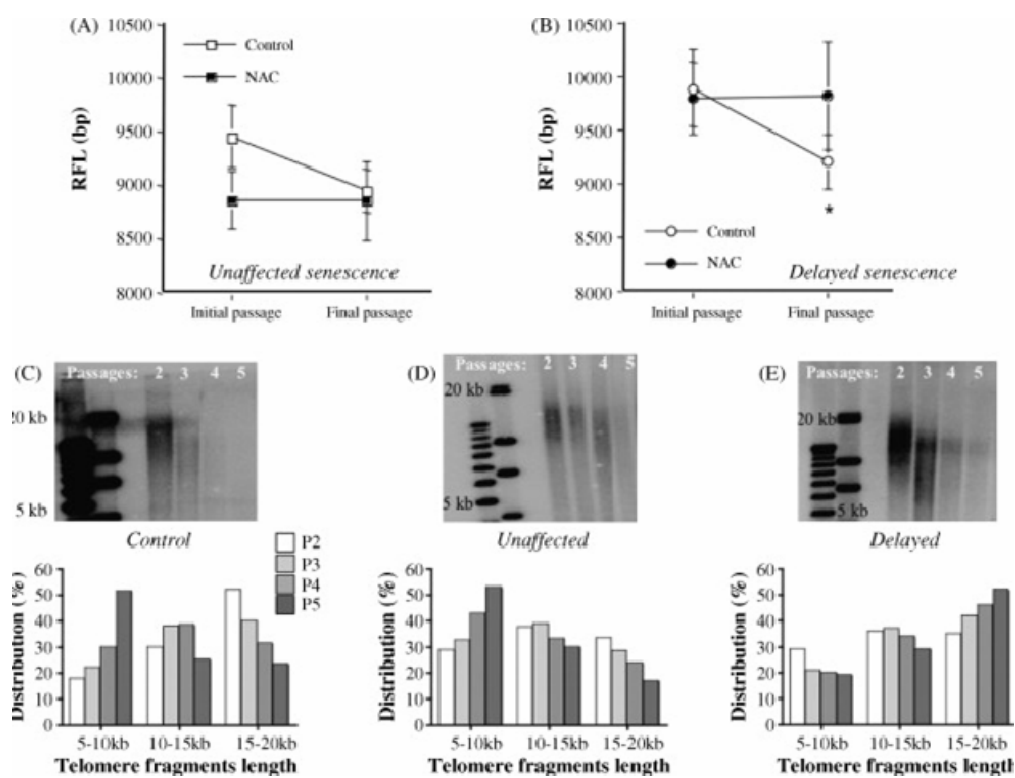


Figure 3

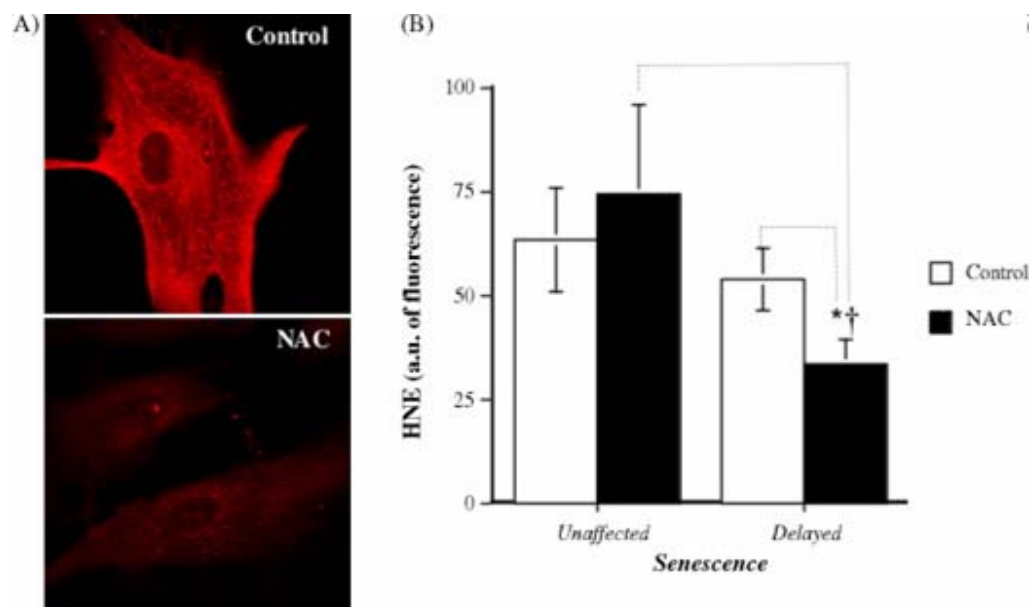


Figure 4

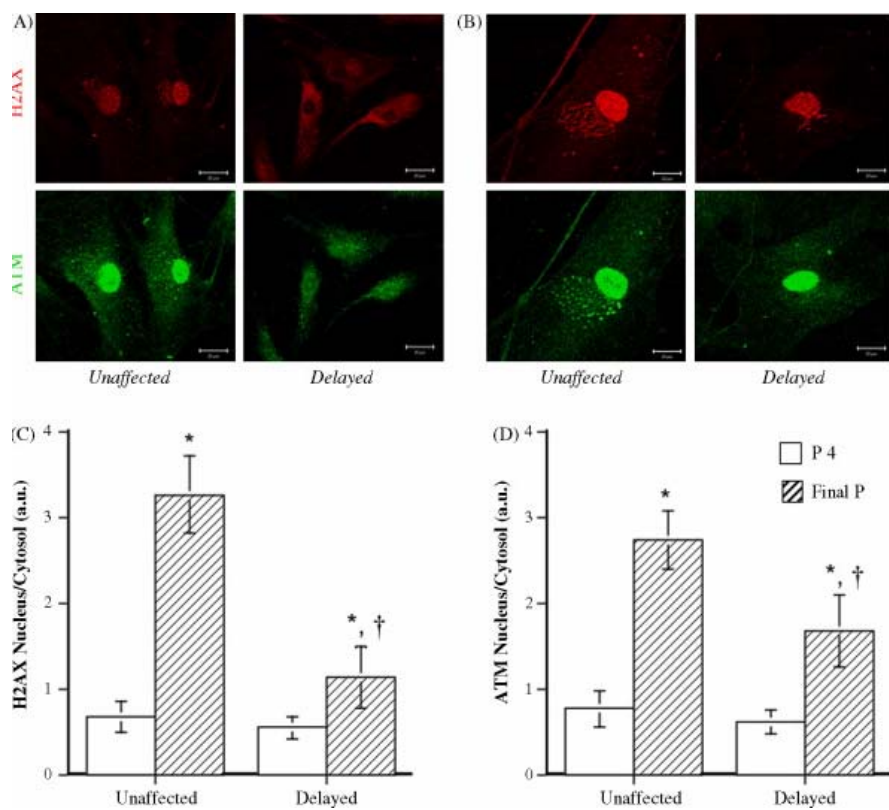


Figure 5

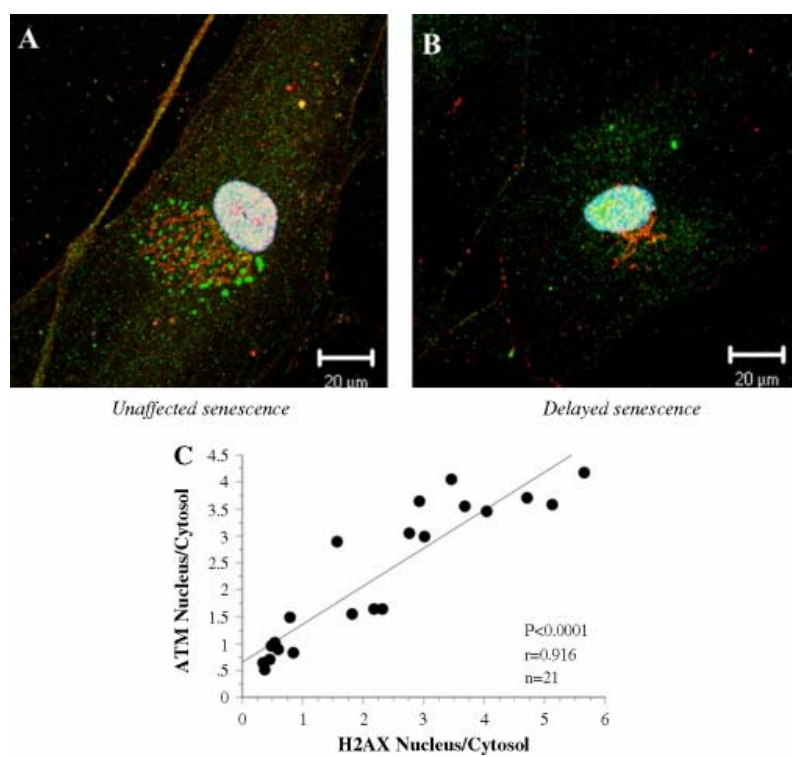


Figure 6

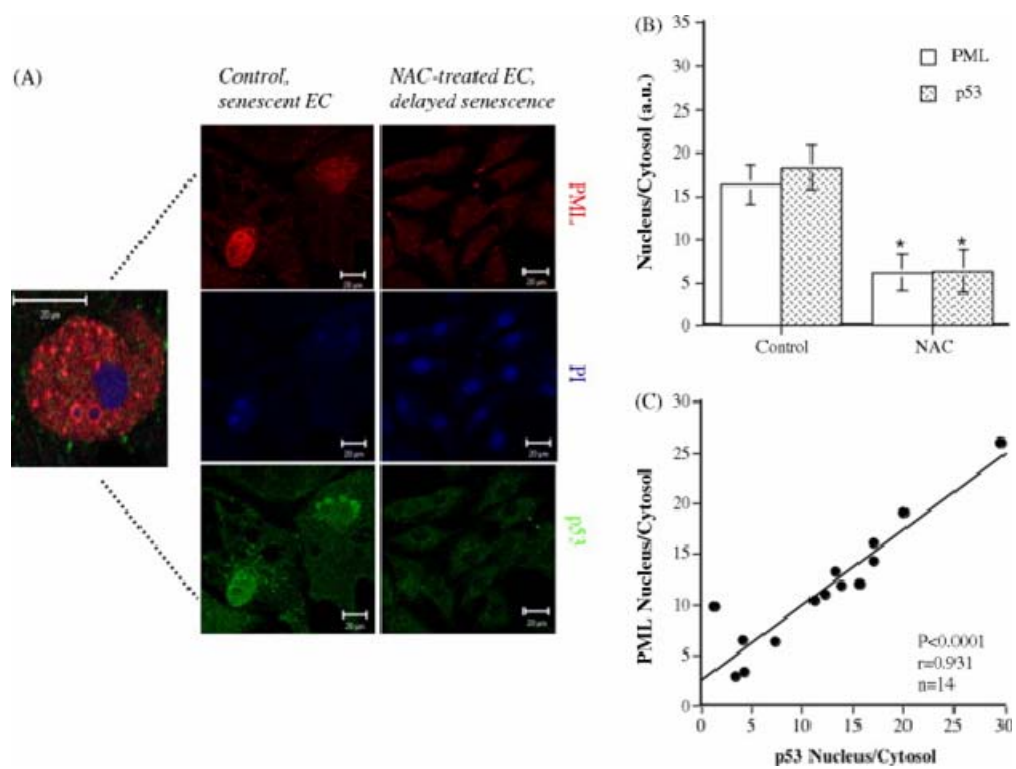


Figure 7

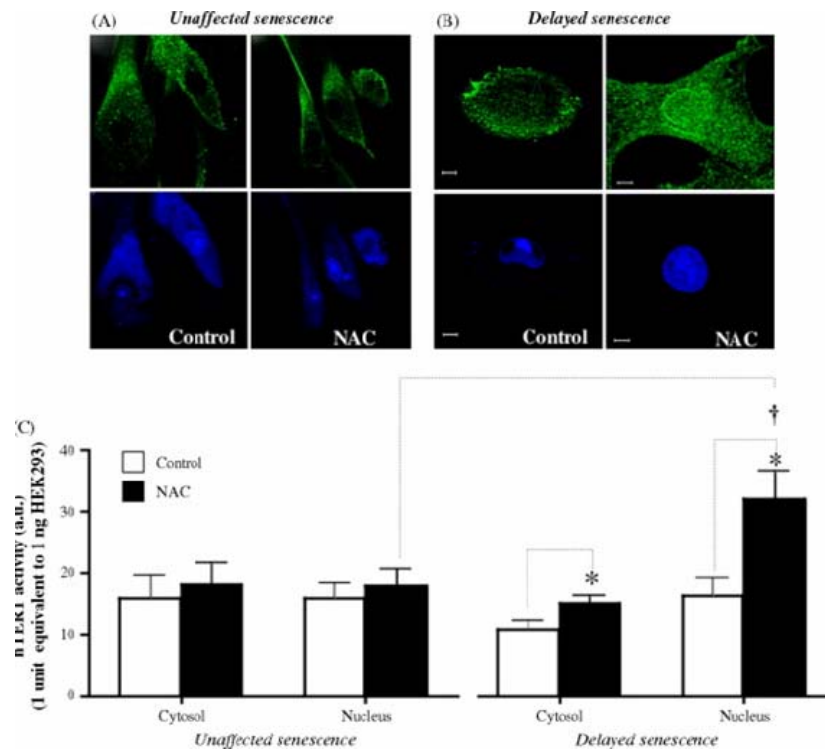
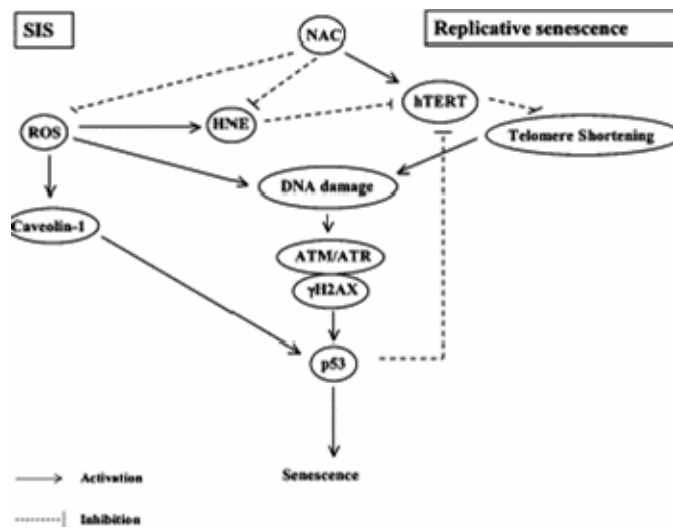


Figure 8



Étude #3

Apport original et contribution des co-auteurs:

La contribution du premier auteur, Guillaume Voghel, est majeure et partagée puisqu'il a participé à toutes les expérimentations et à la rédaction du manuscrit. L'ampleur du travail a requis la collaboration du Dr Nathalie Trescases-Thorin pour plusieurs expériences et elle a participé à la culture cellulaire et à la rédaction/révision du manuscrit. Monsieur Louis Villeneuve a participé à l'acquisition des images d'immunofluorescence par microscopie confocale et Mme Maya A. Mamarbachi a offert son expertise en biologie moléculaire. Frederick A. Malette et Gerardo Ferbeyre ont contribué à mettre au point le protocole des infections lentivirales dans nos cellules et à la révision de l'article. Les Dr Michel Carrier et Louis P. Perrault, chirurgiens, ont fourni les prélèvements d'artères provenant des patients. Finalement, le Dr Éric Thorin a supervisé l'étude et contribué à la rédaction/révision du manuscrit.

PERMISSION DE L'ÉDITEUR

1. Identification de la revue ou du livre

Journal of Cellular and Molecular Medicine

Commerce Place, 350 Main Street,

Malden, MA02148, USA

2. Identification de l'éditeur ou des éditeurs

Prof. L M Popescu

3. Identification de l'article

Guillaume Voghel, Nathalie Thorin-Trescases, Aida M. Mamarbachi, Louis Villeneuve, Frederick A. Mallette, Gerardo Ferbeyre, Louis P. Perrault, Michel Carrier, Eric Thorin. Oxidative stress prevents telomerase-dependent immortalization of human endothelial cells.

Journal of Cellular and Molecular Medicine, Soumis, 7 janvier 2009

L'étudiant, Guillaume Voghel, est autorisé à inclure l'article ci-dessus dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : « Vieillesse vasculaire chez des patients athérosclérotiques : sénescence prématurée des cellules endothéliales? »

Éditeur Signature Date

Oxidative stress prevents telomerase-dependent immortalization of human endothelial cells

Guillaume Voghel¹, Nathalie Thorin-Trescases¹, Aida M. Mamarbachi, Louis Villeneuve, Frederic A. Mallette², Gerardo Ferbeyre², Louis P. Perrault, Michel Carrier, Eric Thorin^{*}.

Department of Surgery, Research Center, Montreal Heart Institute and department of Biochemistry², Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

¹ These authors equally contributed to this work.

^{*} To whom correspondence should be addressed: Montreal Heart Institute, Research Center, 5000, rue Bélanger, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330; Fax: (514) 376-1355; Email: eric.thorin@umontreal.ca

Abstract

Background: Vascular endothelial cell (EC) senescence can be triggered either by telomere shortening or by different sub-lethal stresses such as oxidative stress. Our aim was to investigate whether an antioxidant treatment combined with telomerase (hTERT) overexpression would prevent senescence of EC isolated from patients with severe coronary artery disease (CAD). **Methodology/Principal Findings:** Cells were isolated from internal mammary arteries (n=11 donors), cultured until senescence with or without the antioxidant N-acetylcystein (NAC, 10 μ M) and infected, or not, with a lentivirus overexpressing hTERT. Compared to control EC, hTERT-NAC cells had increased telomerase activity, longer telomeres and underwent more cell divisions ($p<0.05$). According to the donor, entry into senescence was delayed (n=5) or not (n=6) by NAC, delayed (n=5) or cells were immortalized (n=4) by NAC-hTERT. Lack of effect of NAC on cellular senescence prevented cell immortalization by NAC-hTERT in paired EC (Chi square test, $p=0.0079$). In addition, low intrinsic antioxidant defense prevented EC immortalization by NAC-hTERT ($p<0.05$). Finally, lower initial endogenous expression of sirtuin-1 - a longevity gene - prior infection, predicted no immortalization of EC by NAC-hTERT. In EC where hTERT-NAC only delayed senescence, p53, p21 and p16 expression increased with senescence ($p<0.05$), while this was abolished in immortalized EC ($p>0.05$). ROS-dependent rise in caveolin-1 expression and DNA damage associated with senescence were not prevented by hTERT-NAC in non-immortalized EC ($p<0.05$). **Conclusion:** Our data suggest that irreversible oxidative stress-dependent damage limits hTERT-dependent immortalization of EC from patients with severe CAD.

Key words: Telomerase, endothelium, oxidative stress, cellular senescence, coronary artery disease

Introduction

Cellular senescence is a state of permanent growth arrest in which cells remain alive and metabolically active for months, but refractory to mitogenic stimuli [1,2]. Telomere attrition provided the first molecular explanation for the growth arrest observed in most of somatic cells cultured *in vitro* [3,4]. Due to the *end-replication problem*, telomeres shorten at each cell division down to a threshold where it is recognized as DNA damage, and thus, initiates the so-called replicative senescence *via* p53-p21 activation [5-7]. Telomerase, however, a ribonucleoprotein present mainly in germinal and most tumor cells, is responsible for telomere maintenance and thus, the unlimited replicative capacity of these cells, while its activity is minimal in somatic cells [5,8]. On the other hand, senescence is referred to stress-induced senescence (SIS) when it is triggered prematurely by different sub-lethal stresses such as DNA damage (UV, γ -irradiation) [9,10] and oxidative stress (H_2O_2 , hyperoxia, chronic smoking) [9-13].

We recently reported that hypertension accelerates the biological aging of vascular endothelial cells (EC) isolated from patients with severe CAD exposed for years to various risk factors [14]. We observed a significant interplay between replicative senescence and SIS. Chronic NAC treatment of EC isolated from CAD patients, temporarily delayed senescence by limiting SIS and by reducing telomere shortening *via* telomerase activation, unless EC have undergone unsurmountable oxidative stress-induced cellular and molecular damages [15]. In contrast, immortalization has been reported after ectopic expression of the catalytic sub-unit of telomerase (hTERT) of healthy human skin fibroblasts [16-18], adrenocortical cells [19], retinal pigment epithelial cells [20] and endothelial cells [21]. On the other hand, addition of

exogenous H₂O₂ has been reported to induce senescence of fibroblasts despite hTERT overexpression [17,22]. The impact of hTERT overexpression in cells endogenously exposed to oxidative stress is, however, unknown.

The objective of the present study was therefore to investigate whether ectopic hTERT overexpression, combined with an antioxidant, could limit both replicative and stress-induced senescence of EC isolated from patients exposed to oxidative stress associated with risk factors for CVD and established atherosclerosis. Our results demonstrate that in a subgroup of donors, hTERT overexpression combined with an antioxidant stabilizes telomere length and bypasses SIS, resulting in EC immortalization. In another subgroup of donors, however, EC eventually reach SIS, likely because of their inability to fully overcome the irreversible damages triggered by oxidative stress. It is therefore the extent of the stress-dependent damage that determines EC survival.

Experimental procedures

Isolation and culture of EC. Segments of human distal internal mammary artery (n=11, Table 1) discarded during primary CABG were harvested. Endothelial cells were isolated and cultured by an explant technique as previously described [14]. The Ethical committee for clinical research of the Montreal Heart Institute approved the study protocol. At passage 2, EC from each donor were chronically cultured in the presence or absence of the antioxidant NAC (10 μ M). At passage 3 (\approx 60% confluence), EC from each donor were divided in six groups: cells were non-infected (control), infected with the empty lentivirus FG12-CMV or infected with the lentivirus expressing the catalytic subunit of telomerase FG12-CMV-hTERT, in the absence or presence of NAC. Then, cells were serially passaged until senescence.

Lentiviral infection of EC with hTERT. The EcoRI/Sall hTERT gene obtained from pBabe-hTERT was inserted into the EcoRI/XhoI sites of the lentiviral vector FG12-CMV (kindly provided by Dr. Maria S. Soengas, University of Michigan, Ann Arbor, USA).

Virus stocks were prepared using transfected 293FT cells with 28 μ g of FG12-CMV or FG12-CMV-hTERT with the packaging plasmids expressing Gag-Pol (34.5 μ g), Rev (3.6 μ g), Tat (3.6 μ g) and VSV-G (3.6 μ g). Culture supernatant containing viruses produced by packaging 293FT cells were collected, filtered (0.45 μ m) and centrifuged at 87 000g for 2h using a SW 28 rotor (Beckman) at 44h, 52h and 60h post-transfection. After decantation, viruses harvested were resuspended in 200 μ l of PBS for 2h at 4°C. Viruses collected were pooled together and 3 infections of human

EC (0h, 3h and 7h) were performed using 750 μ l of viruses/infection supplemented with 4 μ g/ml polybrene.

Telomerase activity. Conventional TRAP assay was performed to quantify nuclear activity of telomerase as previously described [8], with minor modifications. Briefly, for each sample, a PCR amplification of telomerase extension products was performed using 2 ng of nuclear EC protein, 1x TRAP buffer (Tris HCl 200 mM pH 8.3, MgCl₂ 15 mM, KCl 680 mM, Tween 20 0.5%, EGTA 10 mM), dNTP 50 μ M, [P³²]-labelled M₂-TS forward primer [5'- AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'] 1.8 ng/ μ l, ACX reverse primer [5'-GCGCGG(CTTACC)₃CTAACC-3'] 1.8 ng/ μ l and Taq polymerase 2U. The extension mixture was then loaded and run onto a 10% acrylamide/0.5x TBE gel. Gel was finally fixed 1h in 5% acetic acid/5% methanol/10% glycerol and exposed on an autoradiogram film. All samples were run in duplicate and either lysis buffer or heat-inactivated samples were used as a negative control. We also used the sensitive real-time PCR-TRAP assay to measure low nuclear hTERT activity in EC, as previously described [15]. Telomerase activity was quantified at the beginning of the cell culture (initial passage) and at final passage (senescence or when cell culture was stopped in immortalized cells) in control non-infected EC, CMV and hTERT infected cells, in the presence or absence of NAC.

Telomere length measurement. Endothelial cells were grown in 75 cm² flasks at early and subsequent passages until senescence. DNA was extracted from EC and restriction fragments lengths (RFL) were quantified using a Southern blot technique [14,23].

Senescence-associated β -galactosidase staining. Senescence-associated β -galactosidase SA- β -Gal was used as a marker of senescence [14,24].

Immunofluorescence. Immunostaining was used to assess on fixed EC the expression and sub-cellular localization of a marker of lipid peroxidation 4-hydroxy-nonenal (HNE, [15]) (rabbit anti-HNE, 1:200, Alpha Diagnostics), of a marker of SIS caveolin-1 (mouse anti-caveolin-1, 1:400, BD Transduction Laboratories), of markers of DNA damage ATM (rabbit anti-ATM, 1:100, Santa Cruz) and phospho-histone γ H₂AX (Ser 139) (mouse anti- γ H₂AX, 1:200, Millipore), of cyclin-dependent kinase inhibitors p16 (rabbit anti-p16, 1:50, Santa Cruz), p21 (mouse anti-p21, 1:25, Santa Cruz), and p53 (mouse anti-p53, 1:200, Upstate) at different levels of senescence. DNA counterstaining was performed by incubating EC with TOPRO-3 (2 μ M; Molecular Probe, Burlington, ON Canada). Negative controls were performed by omission of primary antibodies during the protocol. Cells were visualized using a confocal microscope. Values of semi-quantitative analysis are expressed as nuclear or cytosolic fluorescence (a.u.) corrected by the number of the cells.

Estimation of intrinsic antioxidant capacities of EC. The fluorescent dye 5-(and -6) – chloromethyl - 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H₂DCFDA, Molecular Probes) was used as a non-specific marker of ROS and indirectly as an index of total intrinsic antioxidant capacities. At passage 2, prior infection and NAC treatment, control living cells were loaded with 5 μ M of CM-H₂DCFDA in DMEM without phenol red, for 30 min at 37°C, washed and let to

recover for 10-15 min at 37°C. The fluorescence was then observed at 488 nm under a confocal microscope (LSM 510 Zeiss microscope). Negative control consisted in unstained cells (autofluorescence). Although used at an early passage, EC used in this study displayed an unusual unstable basal level of fluorescence that significantly increased over time, suggesting that human EC from coronary patients displayed abnormal high levels of ROS. EC were exposed to the pro-oxidative laser light until the fluorescent signal saturated (Figure 4A, B), and the basal and maximal fluorescence were estimated. The time course of each saturation profile was divided in 3 phases: the initiation, the linear and the termination phase (Figure 4B and D), and the lag time (delay before signal starts to climb), the time needed to obtain 50% of maximal signal (T50) and the termination time (when signal plateaued) were respectively calculated. These parameters were used as an index of the endogenous antioxidant defenses, the shorter the time, the lower the antioxidant capacities. Identical parameters were used for all measurements of ROS in the different EC (n=11 donors) (objective 63x1.4 plan-Apochromat oil, laser Argon 488 nm, 0.1% transmission; dichroic mirror HFT 488 with filter LP505, pinhole size 1.7 Airy units). The frame size of the images was 512x300 pixels and the scan speed was 2.56 μ sec/pixel.

Real-time RT-PCR. Total RNA was isolated using a RNeasy kit (Qiagen) at early and subsequent passages until senescence. Real-time PCR was carried out on diluted RT products using the DNA-binding dye SYBR Green I for the detection of PCR products (Mx3005P system, Stratagene) according to the manufacturer's instruction. Serial dilutions (100 ng to 1 pg) of human aortic EC (Cambrex) total RNA were used as

standard. The following primers designed by primer express (Version 2.0) were used in order to quantify gene expression of Caveolin-1, p16, p21, p53 and Sirtuin-1:

Primer	(5'- 3') Forward	(5'- 3') Reverse
<i>Caveolin-1</i>	GCTGAGCGAGAAGCAAGTGT	TGGTGAAGCTGGCCTTCCAA
<i>p16</i>	CATAGATGCCGCGGAAGGT	TGTAGGACCTTCGGTACTG
<i>p21</i>	GGACCTGTCACTGTCTTGTA	<i>CCTCTTGGAGAAGATCAGCCG</i>
<i>p53</i>	TGAGGTTGGCTCTGACTGTA	TTCTCTTCCTCTGTGCGCCG
<i>Sirtuin-1</i>	GAACAGGTTGCGGGAATCCA	CCTGATTAATAATATCTCCTCGTA
<i>GAPDH</i>	CTGCACCACCAACTGCTTAGC	ACTGTGGTCATGAGTCCTTCCA

RNA levels in each sample were calculated relative to GAPDH. Values are expressed as $2^{\Delta\Delta Ct}$ where $\Delta\Delta Ct$ is the difference between the ΔCt (sample-calibrator) for a specified gene and the correspondent ΔCt (sample-calibrator) for GAPDH (arbitrary units, a.u.).

Statistical analysis of the data. Data are presented as mean \pm sem for continuous variables, with “n” indicating the number of patients. Paired t-tests were used to compare data obtained in EC early in culture (initial passage) and at senescence (final passage) and to compared data obtained in control, EC-CMV and EC-hTERT, treated or not with NAC.

Results

Lack of effect of NAC on cellular senescence prevents cell immortalization by hTERT overexpression in the presence of the antioxidant. For each donor and for each condition, a time course of senescence was constructed (% of SA- β -Gal = f(replication potential, Σ PDL)), and the number of days needed to reach 50% of senescent EC ($\text{Days}_{\beta\text{-Gal } 50\%}$) was evaluated in order to measure the propensity to develop senescence. NAC, according to the donor, displayed a dichotomic response, *i.e.* EC onset of senescence was either 1) non-affected or 2) slightly delayed. Similarly, Figure 1 shows that the combination of hTERT and NAC either delayed (n=5) or prevented (n=4) EC senescence leading to immortalization. The response to NAC was directly related to the response to hTERT overexpression combined with NAC (Chi square test, $p=0.0079$): in EC where NAC had no effect (similar $\text{Days}_{\beta\text{-Gal } 50\%}$ in control and NAC-treated EC, 93 ± 5 and 90 ± 3 days, respectively, $p>0.05$), a concomitant hTERT overexpression only delayed senescence in matched EC ($\text{Days}_{\beta\text{-Gal } 50\%} = 116\pm 11$ days, $p=0.048$, n=5) (Figure 1A-B). In contrast, in EC where NAC alone delayed senescence (longer $\text{Days}_{\beta\text{-Gal } 50\%}$ in control *versus* NAC-treated EC, 119 ± 10 vs 91 ± 3 days, $p=0.0131$), the combination hTERT-NAC immortalized the cells (Figure 1C-D). In these latter cells, culture was deliberately stopped after \approx one year, as senescence-associated β -galactosidase was very low.

On the other hand, compared to control non-infected EC, infection with hTERT alone delayed the onset of senescence in all EC cultures (longer $\text{Days}_{\beta\text{-Gal } 50\%} = 124\pm 16$ vs 96 ± 4 days, $p=0.045$, n=11), independently of the response to NAC (data not shown).

Time courses of senescence of EC infected with the empty lentiviral vector FG12-CMV were superimposable to those of non-infected EC (data not shown).

Ectopic expression of the catalytic subunit of telomerase increased significantly the replication potential (Σ PDL) of the cells by 35% (Σ PDL: 21 ± 2 vs 28 ± 4 , Control vs hTERT, $p < 0.05$) and by 150% in hTERT-NAC cells (Σ PDL: 21 ± 2 vs 51 ± 8 , Control vs hTERT-NAC, $p < 0.05$). The average value of Σ PDL calculated in hTERT-NAC cells corresponds to the average Σ PDL in EC where senescence was delayed (34 ± 7 , $n=5$) and to the Σ PDL in EC where senescence was completely prevented (73 ± 7 , $n=4$).

hTERT overexpression increases telomerase activity. Infection of EC with hTERT, in the absence (data not shown) and presence of NAC (Figure 2), led to a significant increase in hTERT activity comparable to that of HEK293 cells. hTERT activity was not detectable in EC infected with the empty lentivirus FG12-CMV (data not shown) or in control non-infected EC (Figure 2A). In contrast, nuclear hTERT activity quantified with the sensitive real-time TRAP assay, decreased between initial and final passages in non-infected cells (Figure 2B).

Ectopic overexpression of hTERT in the presence of NAC, increased nuclear telomerase activity as early as the initial passage compared to control cells ($p < 0.0001$), and this activity further increased between initial and final passages ($p < 0.0001$, Figure 2A, B). Initial and final nuclear telomerase activities were similar in EC where senescence was delayed or prevented (Figure 2B).

hTERT overexpression maintains telomere length. Whereas there was no difference in initial telomere length between the groups (control: 9031 ± 308 , NAC: 8679 ± 360 , NAC-

hTERT: 8612 ± 338 bp, $n=9-11$ $p > 0.05$), final telomere lengths were longer in NAC-hTERT compared to their respective matched non-infected cells (control: 8761 ± 479 , NAC: 8456 ± 375 , NAC-hTERT: 9464 ± 609 bp, $n=9-11$ $p < 0.05$), confirming that hTERT stabilizes telomere length despite the accumulation of cell division normally triggering telomere shortening. There was no difference in either initial or final telomere length in NAC-hTERT EC where senescence was delayed or prevented (Figure 3). In EC infected with the lentiviral vector alone, initial and final telomere lengths were not significantly different from control EC (data not shown).

Low intrinsic antioxidant defense prevents cell immortalization by hTERT overexpression in the presence of the antioxidant. The endogenous antioxidant capacities were estimated in living cells loaded with CM-H₂DCFDA in non-infected EC ($n=11$) at initial passage, prior NAC treatment or hTERT infection. Cells were exposed to a pro-oxidant laser light until fluorescence signal saturated (Figure 4). The kinetic parameters of saturation (T50, lag time and termination time) were significantly lower in EC that will not be immortalized later in culture by the combination NAC-hTERT, suggesting lower endogenous antioxidant defenses (Figure 4D). In contrast, neither basal nor maximal fluorescence intensities of CM-H₂DCFDA differed between EC that will be immortalized or not (Figure 4C).

In addition, initial antioxidant capacities of the cells were positively associated with the beneficial effect of NAC-hTERT on cell proliferation (positive correlations between Σ PDL and 1) T50: $p=0.0059$, $r=0.862$, $n=8$; 2) lag time: $p=0.010$, $r=0.869$, $n=7$; and 3) termination time: $p=0.0082$, $r=0.809$, $n=9$).

Low endogenous Sirtuin-1 gene expression is associated with the lack of immortalization by hTERT overexpression in the presence of the antioxidant. At initial passage, non-infected and non-treated EC that will be later immortalized by the combination NAC-hTERT, have higher initial Sirtuin-1 mRNA level compared to cells that will respond to NAC-hTERT by a delayed senescence (0.896 ± 0.187 vs 0.494 ± 0.059 a.u., $p<0.05$). The combination NAC-hTERT *per se* did not affect the expression of Sirtuin-1 (final passage), whether or not senescence was delayed or prevented (data not shown). These data suggest that intrinsic Sirtuin-1 levels rather than experimentally induced levels of Sirtuin-1 may influence and predict the impact of the NAC-hTERT combination on cell survival in culture.

hTERT-NAC abolishes p16, p21 and p53 expression in immortalized cells. While in non-infected cells, gene expression of p16 increased between the initial and final passages (from 0.91 ± 0.15 to 1.67 ± 0.27 a.u., $p=0.005$, $n=11$), this rise was prevented in NAC-hTERT EC (from 1.07 ± 0.38 to 1.04 ± 0.40 a.u., $p>0.05$, $n=9$). The expression of p16 gene tended to be 4 folds lower in EC where hTERT-NAC immortalized the cells (0.35 ± 0.10 vs 1.65 ± 0.79 a.u., $p=0.1921$). Similarly, the rise in p16 protein level was abolished by the combination NAC-hTERT in EC where immortalization was observed (Figure 5A, B).

The level of p21 mRNA expression tended to increase between the initial and the final passages in non-infected cells (from 0.58 ± 0.07 to 0.89 ± 0.20 a.u., $p=0.08$, $n=11$); this was prevented in immortalized NAC-hTERT EC (final passage in immortalized NAC-hTERT: 0.67 ± 0.17 a.u.) but not in NAC-hTERT EC where senescence was delayed (final passage in NAC-hTERT: 1.46 ± 0.53 a.u., $p>0.05$). In addition, in EC

where senescence was only delayed by NAC-hTERT, p21 protein level increased. This rise in p21 level was abolished in immortalized NAC-hTERT cells (Figure 5A, C).

Similarly, the expression of the p53 protein increased with senescence in non-infected cells (initial vs final passage in control: 0.28 ± 0.02 vs 0.91 ± 0.15 a.u., $n=11$, $p=0.0026$). The combination NAC-hTERT lowered the rise in p53 in EC where senescence was delayed (final passage in NAC-hTERT: 0.17 ± 0.03 a.u.) and abolished the rise in p53 in EC where immortalization was reached (final passage in NAC-hTERT: 0.05 ± 0.01 a.u., $p=0.0004$ compared to delayed hTERT-NAC).

Combination of hTERT overexpression and NAC decreases lipid peroxidation. Initial levels (prior hTERT infection and NAC treatment) of HNE, a marker of lipid peroxidation, positively correlated with both the initial gene expression of ROS-related caveolin-1 ($p=0.0036$, $r=0.81$, $n=11$; data not shown).

In addition, senescence was associated with a rise in HNE that was lowered by NAC (Figure 6 A, B). Overexpression of hTERT alone had no impact on HNE levels and did not prevent the increase in HNE associated with senescence (Figure 6B). In contrast, combination of NAC with hTERT overexpression prevented the rise in HNE (figure 6A, B, C). The combination NAC-hTERT was more effective to prevent the rise in HNE than NAC alone ($p=0.0211$). Initial HNE levels were similar in all conditions (Figure 6B, C) and therefore did not predict if EC would be later immortalized or not by NAC-hTERT.

Combination of hTERT overexpression and NAC decreases caveolin-1 expression. Caveolin-1 increased with senescence (Figure 7). This cytosolic and nuclear rise in

caveolin-1 protein was not significantly affected by NAC or hTERT overexpression (data not shown), but was prevented by the combination NAC-hTERT in immortalized EC (figure 7B).

The prevention of senescence-induced rise in caveolin-1 by the combination NAC-hTERT was also observed at the gene level (mRNA expression in Control EC at initial passage = 0.913 ± 0.122 vs Control EC at final passage = 1.164 ± 0.179 , $n=11$, $p=0.054$; Control EC at final passage vs hTERT-NAC EC at final passage = 0.078 ± 0.019 , $p<0.001$).

Combination of hTERT overexpression and NAC decreases DNA damage. ATM protein expression increased with senescence in control EC (Figure 8A, B), NAC-EC and hTERT-EC (data not shown). This was prevented by the combination NAC-hTERT in immortalized EC but not in cells where senescence was delayed (Figure 8B). Similarly, the phosphorylation level of H₂AX protein (γ H₂AX), a DNA double-strand break marker, was significantly lowered in NAC-hTERT immortalized EC (Figure 9A, B).

Initial DNA damage levels were similar in all conditions (Figures 7 and 8) and therefore did not predict if EC would be later immortalized or not by NAC-hTERT.

Influence of the clinical parameters on hTERT infection. No particular clinical parameter (Table 1) could predict the response to the combination NAC-hTERT. We observed, however, that EC from smoker donors have a lower probability to be immortalized by NAC-hTERT (Chi squared test, $p=0.0476$). This is in line with the

facts that EC from smokers display lower endogenous antioxidant capacities [13] and that chronic treatment with NAC does not delay senescence in EC isolated from atherosclerotic smokers (data not shown).

Discussion

The main finding of our study is that *in vivo* exposition to high level of oxidative stress associated with risk factors for CAD may lead to irreversible cellular and molecular damages that prevent vascular EC immortalization by ectopic hTERT overexpression.

The cause of non-immortalization is likely related to the failure of EC to inactivate ROS. At least 3 different conditions could prevent EC immortalization by hTERT-NAC: 1) an unaffected senescence in response to NAC treatment, 2) a low initial endogenous antioxidant capacity, 3) a low initial endogenous expression of the longevity gene Sirtuin-1 known, among others, to confer stress resistance [25,26].

We previously reported that in patients with CAD exposed for years to oxidative stress associated with risk factors for CVD (hypertension, diabetes, dyslipidemia, cigarette smoke), there is a significant interplay between replicative and oxidative stress-induced senescence of EC [14]. In this study, we observed a positive correlation between initial levels (prior infection) of the lipid peroxidation marker HNE with the initial gene expression of caveolin-1, a protein known to induce SIS [14,15,27,28]. In addition, senescence was associated with a further rise in oxidative stress (HNE and caveolin-1). NAC, a direct scavenger of ROS also known to be physiologically converted to metabolites that will stimulate glutathione synthesis, an important source of endogenous antioxidant [29,30] has the ability to partially abrogate the oxidative DNA damages [31]. We recently demonstrated that only 50% of NAC-treated EC could be partially rescued from senescence [15]. This beneficial effect was due to a reversible decrease in oxidative stress markers and DNA damages and to a small

increase in hTERT activity. In the present study, the dichotomic response to NAC was also observed. In EC isolated from CAD patients, NAC was able to decrease oxidative stress, but not molecular damages (ATM and γ H₂AX). Accumulation of such damages was only prevented in hTERT-NAC immortalized EC (figures 7-9), suggesting that in these immortalized cells, hTERT overexpression combined with a chronic antioxidant treatment was able to bypass stimuli (DNA damage, ROS) normally inducing growth arrest by senescence.

The beneficial effect of NAC on senescence was directly related to the efficacy of the combination hTERT-NAC to induce immortalization (Figure 1): only cells that benefited from NAC were immortalized by the combination NAC-hTERT. The effect of the combination hTERT-NAC was more effective than NAC alone, likely due to sustained telomerase activity (Figure 2), to a stronger inhibition of DNA damage (Figures 8 and 9), to a higher inhibition of oxidative stress markers (Figures 6 and 7) and to the abolition of the increase in cell cycle inhibitors, p16 and p21, normally triggering senescence (Figure 5).

The present study shows that, by preserving telomere integrity, hTERT overexpression alone likely bypasses the onset of replicative senescence induced by telomere shortening; hTERT overexpression was unable, however, to counteract oxidative SIS. This suggests that EC isolated from these patients have undergone high levels of molecular damage and that hTERT and NAC, taken separately, are unable to repair and inhibit the accumulation of oxidative DNA damages as well as its consequences, *i.e.* senescence. However, because the diseased EC used in our study still undergo some oxidative damages, they eventually cease to divide when they enter

SIS. It has also been reported that hTERT-dependent immortalization of normal EC was prevented by exogenous H₂O₂. Accordingly, only EC with the lowest levels of expression of oxidative stress-related markers were immortalized by the combination hTERT-NAC. Despite the overexpression of hTERT, the accumulation of ROS associated with non-telomeric DNA damage could be responsible for the onset of SIS and in turn, for the non-immortalization of EC by hTERT and hTERT-NAC. All together, these data suggest that the potential effect of NAC to delay senescence by reducing oxidative stress-induced damages, is a prerequisite for immortalization by NAC-hTERT. To our knowledge, this is the first demonstration that *in vivo* exposition to high level of oxidative stress associated with risk factors for CAD prevents vascular EC immortalization by ectopic hTERT overexpression.

The beneficial effect of NAC-hTERT on cell proliferation was also directly correlated with the initial antioxidant defense: EC with the highest endogenous ability to scavenge ROS (Figure 4) underwent more cell divisions and could be immortalized. The fluorescent probe DCFDA is broadly used to non-specifically estimate the sources of oxidative stress. While our approach to quantify the intrinsic antioxidant capacities does not provide a descriptive assessment of the sources of antioxidant defenses, it globally estimates the capacities of EC to react against a pro-oxidant stimulus. The better antioxidant defense is in line with lower caveolin-1 expression in EC that benefited the most from hTERT-NAC.

Finally, we found that initial Sirtuin1 gene expression was higher in EC that could be immortalized by NAC-hTERT. Sirtuins (silencing information regulator) are

nuclear nicotinamide adenine nucleotide-dependent histone deacetylases. In mammalian cells, Sirtuin1 appears to control the cellular response to stress by regulating the FOXO family of Forkhead transcription factors [32]. Because FOXO transcription factors transactivate a series of target genes that have critical roles in the cellular response to stress stimuli, endogenous sirtuin1 may potentiate FOXO's ability to detoxify ROS and to repair damaged DNA [33,34]. It has been reported that Sirtuin1 levels were reduced in macrophages and lungs of smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease due to its post-translational modifications by cigarette smoke-derived reactive components [26]. This is in line with the fact that EC isolated from smoker patients have a lower probability to be immortalized by NAC-hTERT and that lower endogenous Sirtuin1 levels were found in EC that would not be immortalized.

In addition to its role in stress resistance, Sirtuin1 can also inhibit senescence. In different types of cells, Sirtuin1 deacetylates and represses p53-dependent PML-induced [25] and H₂O₂-induced [35,36] cellular senescence. Another important function of Sirtuin1 relevant to our study is that deacetylation is implicated in DNA repair, as a connection between the acetylation status of histones and repair of DNA breaks [33,37]. Thus, altogether, the functions of Sirtuin1 in stress resistance, detoxification of ROS, inhibition of senescence and DNA repair are in line with our observation that Sirtuin1 levels are higher in future immortalized EC.

In conclusion, telomerase overexpression in EC from atherosclerotic patients delays replicative senescence mainly by maintaining telomere integrity. Since no immortalization was observed, however, we hypothesize that hTERT by itself cannot

bypass CVD-related oxidative damage, and thus that SIS cannot be overcome by hTERT overexpression. Immortalization could be achieved only if hTERT overexpression was combined with a chronic antioxidant treatment, conditional to reversible stress-induced damage *via* high intrinsic antioxidant capacities and high levels of Sirtuin1. This may support the hypothesis that cells having strong antioxidant defense capacity and DNA repair mechanisms may be rescued from replicative and stress-induced senescence.

Acknowledgements

We thank Guy Charron (Montreal Heart Institute) for fruitful discussions and technical advises, and the biological tissue bank (RETEB) of the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec* for technical support. This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research (MOP 14496) and the Foundation of the Montreal Heart Institute. Guillaume Voghel and Frederic A. Mallette hold a PhD scholarship from the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec*.

References

1. **Ben-Porath I, Weinberg RA.** The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 May;37(5):961-76.
2. **Chen J, Goligorsky MS.** Premature senescence of endothelial cells: Methusaleh's dilemma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 May;290(5):H1729-39.
3. **Harley CB, Futcher AB, Greider CW.** Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 1990 May 31;345(6274):458-60.
4. **Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB.** Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol.* 1992 Jun 20;225(4):951-60.
5. **Allsopp RC, Chang E, Kashefi-Azham M, et al.** Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp Cell Res.* 1995 Sep;220(1):194-200.
6. **Brown JP, Wei W, Sedivy JM.** Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science.* 1997 Aug 8;277(5327):831-4.
7. **Lou Z, Chen J.** Cellular senescence and DNA repair. *Exp Cell Res.* 2006 Aug 15;312(14):2641-6.
8. **Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al.** Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994 Dec 23;266(5193):2011-5.
9. **Medrano EE, Im S, Yang F, Abdel-Malek ZA.** Ultraviolet B light induces G1 arrest in human melanocytes by prolonged inhibition of retinoblastoma protein phosphorylation associated with long-term expression of the p21Waf-1/SDI-1/Cip-1 protein. *Cancer Res.* 1995 Sep 15;55(18):4047-52.
10. **Toussaint O, Medrano EE, von Zglinicki T.** Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol.* 2000 Oct;35(8):927-45.
11. **Chen JH, Ozanne SE, Hales CN.** Methods of cellular senescence induction using oxidative stress. *Methods Mol Biol.* 2007;371:179-89.
12. **von Zglinicki T, Saretzki G, Ladhoff J, d'Adda di Fagagna F, Jackson SP.** Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev.* 2005 Jan;126(1):111-7.

13. **Farhat N, Thorin-Trescases N, Voghel G, et al.** Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated from atherosclerotic chronic smokers. *Can J Physiol Pharmacol.* 2008 Nov;86(11):761-9.
14. **Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, et al.** Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors. *Mech Ageing Dev.* 2007 Nov-Dec;128(11-12):662-71.
15. **Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, et al.** Chronic treatment with N-acetyl-cystein delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients. *Mech Ageing Dev.* 2008 May;129(5):261-70.
16. **Forsyth NR, Evans AP, Shay JW, Wright WE.** Developmental differences in the immortalization of lung fibroblasts by telomerase. *Aging Cell.* 2003 Oct;2(5):235-43.
17. **Naka K, Tachibana A, Ikeda K, Motoyama N.** Stress-induced premature senescence in hTERT-expressing ataxia telangiectasia fibroblasts. *J Biol Chem.* 2004 Jan 16;279(3):2030-7.
18. **Vaziri H, Benchimol S.** Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol.* 1998 Feb 26;8(5):279-82.
19. **Yang L, Suwa T, Wright WE, Shay JW, Hornsby PJ.** Telomere shortening and decline in replicative potential as a function of donor age in human adrenocortical cells. *Mech Ageing Dev.* 2001 Oct;122(15):1685-94.
20. **Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al.** Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.* 1998 Jan 16;279(5349):349-52.
21. **Yang J, Chang E, Cherry AM, et al.** Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *J Biol Chem.* 1999 Sep 10;274(37):26141-8.
22. **Gorbunova V, Seluanov A, Pereira-Smith OM.** Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *J Biol Chem.* 2002 Oct 11;277(41):38540-9.
23. **Zhang L, Aviv H, Gardner JP, et al.** Loss of chromosome 13 in cultured human vascular endothelial cells. *Exp Cell Res.* 2000 Nov 1;260(2):357-64.

24. **Dimri GP, Lee X, Basile G, et al.** A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Sep 26;92(20):9363-7.
25. **Langley E, Pearson M, Faretta M, et al.** Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J.* 2002 May 15;21(10):2383-96.
26. **Rajendrasozhan S, Yang SR, Kinnula VL, Rahman I.** SIRT1, an antiinflammatory and antiaging protein, is decreased in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 Apr 15;177(8):861-70.
27. **Chretien A, Piront N, Delaive E, Demazy C, Ninane N, Toussaint O.** Increased abundance of cytoplasmic and nuclear caveolin 1 in human diploid fibroblasts in H₂O₂-induced premature senescence and interplay with p38alpha(MAPK). *FEBS Lett.* 2008 May 28;582(12):1685-92.
28. **Dasari A, Bartholomew JN, Volonte D, Galbiati F.** Oxidative stress induces premature senescence by stimulating caveolin-1 gene transcription through p38 mitogen-activated protein kinase/Sp1-mediated activation of two GC-rich promoter elements. *Cancer Res.* 2006 Nov 15;66(22):10805-14.
29. **De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM.** Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis.* 2001 Jul;22(7):999-1013.
30. **Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M.** Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.* 2003 Jan;60(1):6-20.
31. **Tanaka T, Halicka HD, Traganos F, Seiter K, Darzynkiewicz Z.** Induction of ATM activation, histone H2AX phosphorylation and apoptosis by etoposide: relation to cell cycle phase. *Cell Cycle.* 2007 Feb 1;6(3):371-6.
32. **Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, et al.** Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science.* 2004 Mar 26;303(5666):2011-5.
33. **Michan S, Sinclair D.** Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J.* 2007 May 15;404(1):1-13.
34. **Westphal CH, Dipp MA, Guarente L.** A therapeutic role for sirtuins in diseases of aging? *Trends Biochem Sci.* 2007 Dec;32(12):555-60.
35. **Furukawa A, Tada-Oikawa S, Kawanishi S, Oikawa S.** H₂O₂ accelerates cellular senescence by accumulation of acetylated p53 via decrease in the

- function of SIRT1 by NAD⁺ depletion. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20(1-4):45-54.
36. **Ota H, Akishita M, Eto M, Iijima K, Kaneki M, Ouchi Y.** Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2007 Nov;43(5):571-9.
37. **Kruszewski M, Szumiel I.** Sirtuins (histone deacetylases III) in the cellular response to DNA damage--facts and hypotheses. *DNA Repair (Amst)*. 2005 Nov 21;4(11):1306-13.

Table 1. Clinical profile of patients undergoing CABG

Men (n=8), Women (n=3)

Age (years)	67±5
Body mass index (kg/m ²)	27±2
History of disease (years)	5±2
Left ventricular ejection fraction, %	50±5
Dyslipidemia, %	82 (9/11)
Hypertension, %	73 (8/11)
Diabetes, %	46 (5/11)
Nicotine use (active and recent ex-smokers), %	73 (8/11)

Patients were treated with similar medications including aspirin, angiotensin-converting

enzyme inhibitors, β -blockers, calcium channel blockers, statins and nitrates.

Figure 1 *Lack of effect of NAC on cellular senescence prevents cell immortalization by hTERT overexpression in the presence of NAC.* Senescence was quantified by cytochemical detection of β -galactosidase (β -Gal, in blue) at pH 6. (A) Average (mean \pm sem, n=5) senescence time course in non-infected, NAC-treated and (B) NAC-hTERT EC. NAC had no beneficial effect and senescence was only delayed by NAC-hTERT combination. (C) Average (mean \pm sem, n=4) senescence time course in non-infected, NAC-treated and (D) NAC-hTERT EC. NAC treatment delayed senescence and NAC-hTERT combination led to EC immortalization. Contrast phase photographs typical of a senescence-associated β -galactosidase staining in NAC-hTERT EC at final passages (x400 magnification), when senescence was delayed (A, B) or prevented (C, D).

Figure 2 *hTERT overexpression increases telomerase activity.* Telomerase activity (arbitrary units) was quantified at initial and final passages in non-infected EC and in NAC-hTERT-EC where senescence was either delayed or prevented, with both the conventional TRAP assay (A) and the very sensitive real-time TRAP assay (B). Two μ g of nuclear protein were loaded for each sample (n=10) and tumoral HEK293 cells were used as standard. For each sample, heat inactivated proteins were used as negative control.

*: p<0.05 compared to initial passage, †: p<0.05 compared to control EC.

Figure 3 *hTERT overexpression stabilizes telomere length.* Telomere restriction fragment length (RFL, bp, n=10) was measured by Southern blot at initial (i) and final (f) passage (A, B). Ten µg of DNA were loaded for each sample.

Figure 4 *Low intrinsic EC antioxidant defense prevents cell immortalization by hTERT overexpression in the presence of NAC.* The endogenous antioxidant capacities were estimated in living cells loaded with CM-H₂DCFDA in non-infected EC (n=11) at initial passage, prior NAC treatment or hTERT infection. Cells were exposed to a pro-oxidant laser light until fluorescence signal saturated (A, B). Typical profiles of fluorescence from 3 different EC donors are shown in (B). From the saturation profiles, the basal and maximal fluorescence (B and C) were estimated. Furthermore, the time course of each saturation profile was divided in 3 phases: the initiation phase, the linear phase and the termination phase (B and D), and the lag time, the time needed to obtain 50% of maximal signal (T50) and the termination time were respectively calculated. The parameters EC50, lag time and termination time were used as an index of the endogenous antioxidant defenses, the shorter the time, the lower the antioxidant capacities.

*: p<0.05 compared to EC that will not be immortalized by the combination NAC-hTERT.

Figure 5 *Combination of NAC treatment and hTERT overexpression abolished p16 and p21 expression only in immortalized EC.* Immunostaining of p16 and p21, cycling dependent kinases inhibitors. (A) Confocal images of EC at initial and final passage in NAC-hTERT EC where senescence was either delayed or prevented. (B)

Quantification of fluorescence intensity (arbitrary units) in the nucleus corrected by cell number of p16 and p21.

*: $p < 0.05$ compared to initial passage.

Figure 6 *Combination of NAC treatment and hTERT overexpression decreased cellular marker of oxidative stress.* Immunostaining of 4-hydroxy-nonenal (HNE, lipid peroxidation) was used as a marker of oxidative stress. (A) Confocal images of EC at initial passage prior infection and at the final passage in non-infected EC and in NAC-hTERT EC. (B) Quantification of total fluorescence intensity (arbitrary units corrected by cell number) of HNE in non-infected EC, NAC-treated, hTERT-infected and NAC-hTERT EC, at initial and final passages. (C) Quantification of total HNE-fluorescence intensity in non-infected EC and NAC-hTERT EC where senescence was delayed or prevented, at initial and final passages.

*: $p < 0.05$ compared to initial passage; †: $p < 0.05$ compared to control EC.

Figure 7 *Combination of NAC treatment and hTERT overexpression decreased ROS-induced caveolin-1 in immortalized EC.* Immunostaining of caveolin-1, a marker of stress-induced senescence. (A) Confocal images of NAC-treated EC at initial and final passage in non-infected EC and in NAC-hTERT EC. (B) Quantification of caveolin-1-fluorescence intensity in the cytosol (left panel) and in the nucleus (right panel) (arbitrary units, corrected by cell number) in non-infected EC and NAC-hTERT EC where senescence was delayed or prevented, at initial and final passages.

*: $p < 0.05$ compared to initial passage; †: $p < 0.05$ compared to control EC.

Figure 8 *Combination of NAC treatment and hTERT overexpression decreased ATM in immortalized EC.* Immunostaining of ATM, a transducer protein of DNA damage. (A) Confocal images of NAC-EC at initial and final passage in non-infected EC and in NAC-hTERT EC. (B) Quantification of ATM-fluorescence intensity in the nucleus (arbitrary units, corrected by cell number) in non-infected EC and NAC-hTERT EC where senescence was delayed or prevented, at initial and final passages.

*: $p < 0.05$ compared to initial passage; †: $p < 0.05$ compared to control EC.

Figure 9 *Combination of NAC treatment and hTERT overexpression decreased γ H₂AX in immortalized EC.* Immunostaining of γ H₂AX, a marker of double-DNA strand breaks. (A) Confocal images of EC at initial and final passage in non-infected EC and in NAC-hTERT EC. (B) Quantification of γ H₂AX-fluorescence intensity in the nucleus (arbitrary units, corrected by cell number) in non-infected EC and NAC-hTERT EC where senescence was delayed or prevented, at initial and final passages.

*: $p < 0.05$ compared to initial passage; †: $p < 0.05$ compared to control EC.

Figure 1

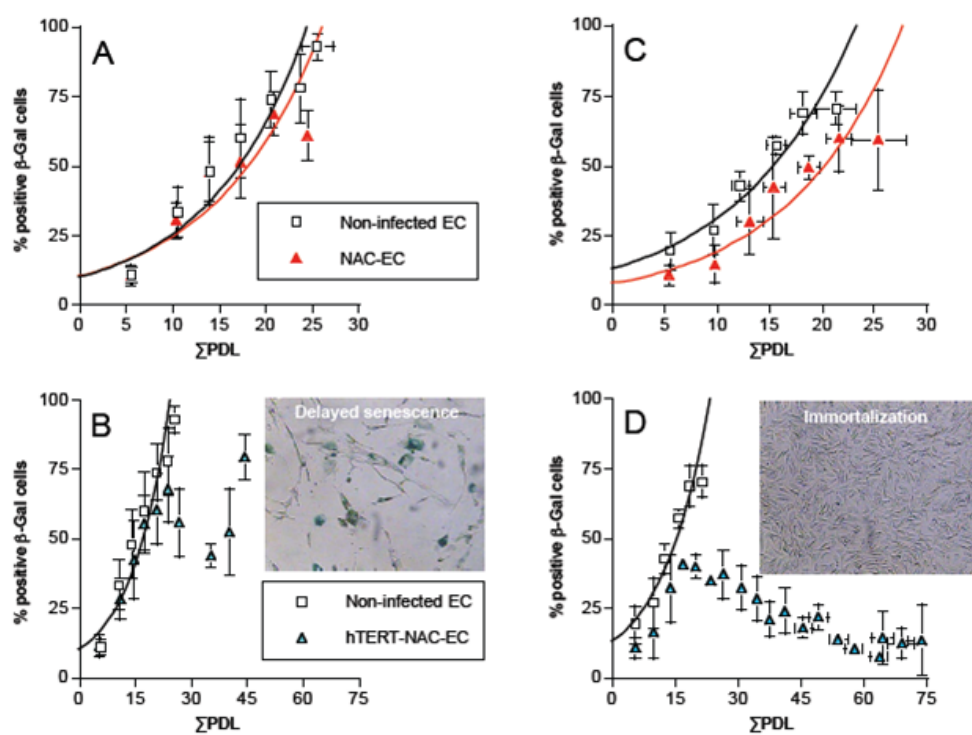


Figure 2

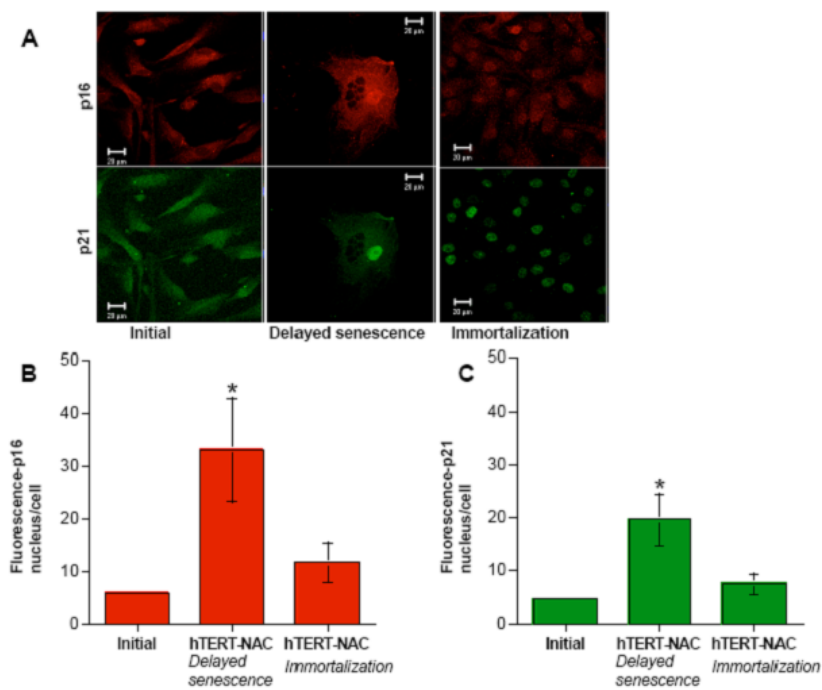


Figure 3

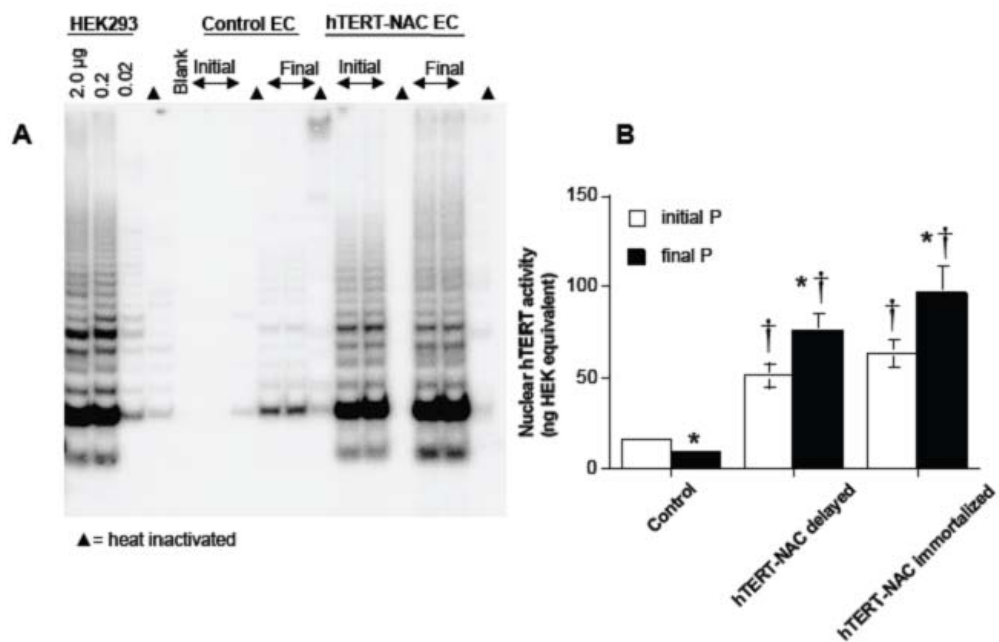


Figure 4

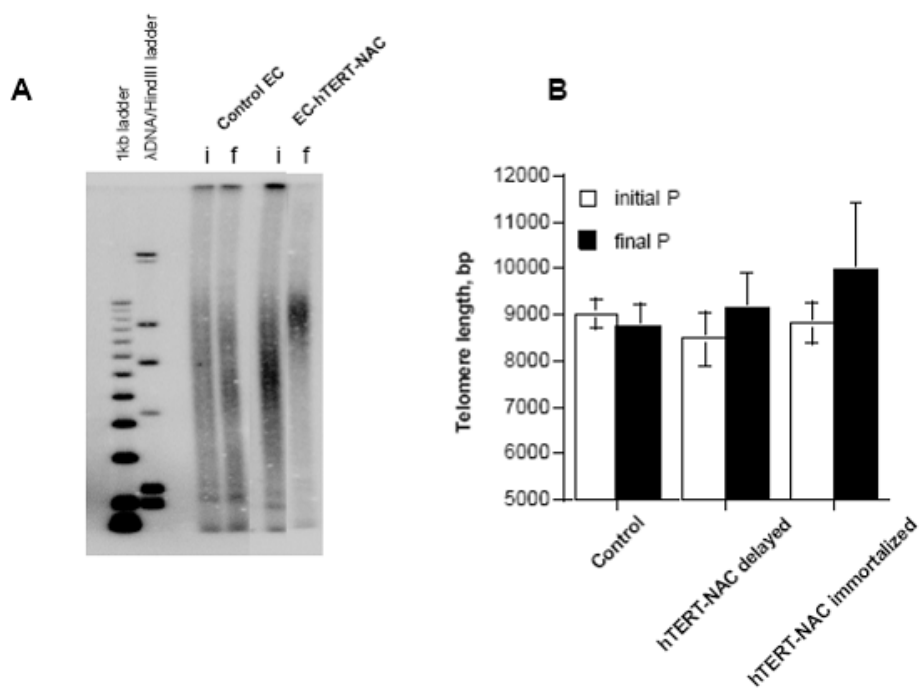


Figure 5

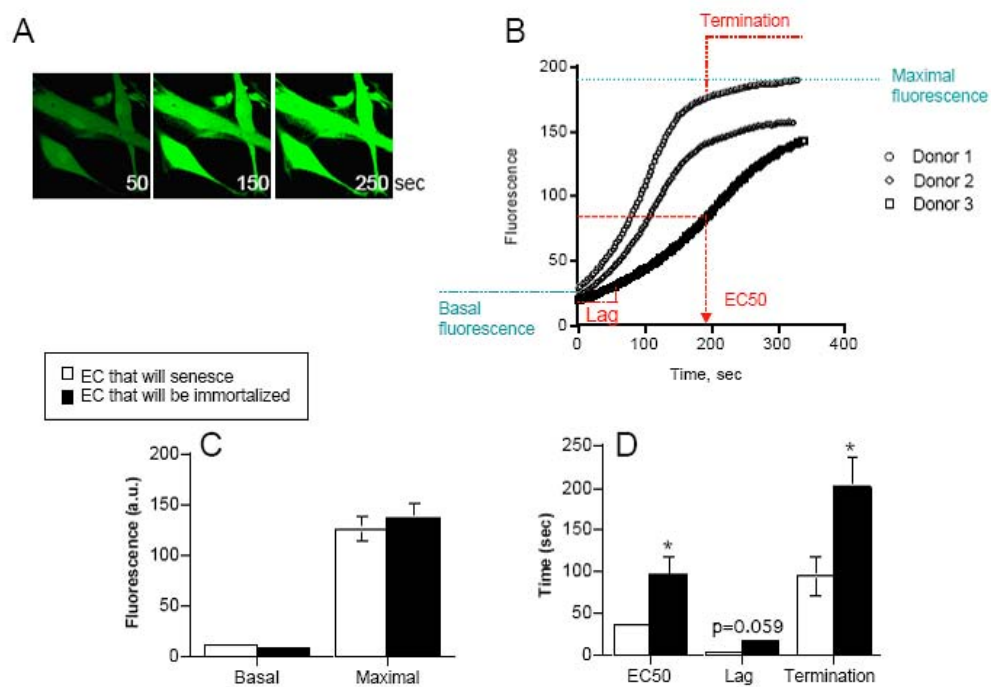


Figure 6

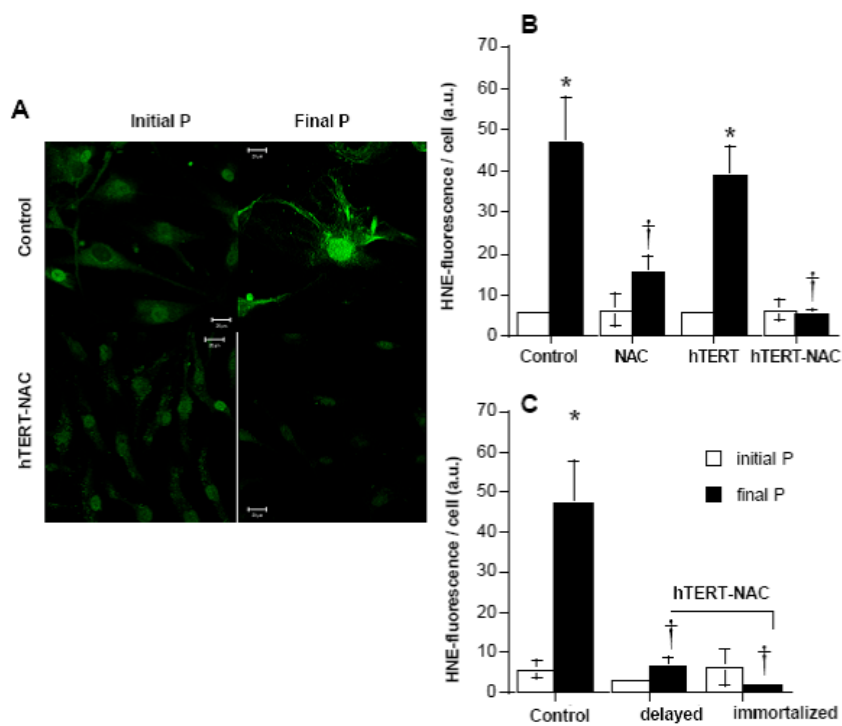


Figure 7

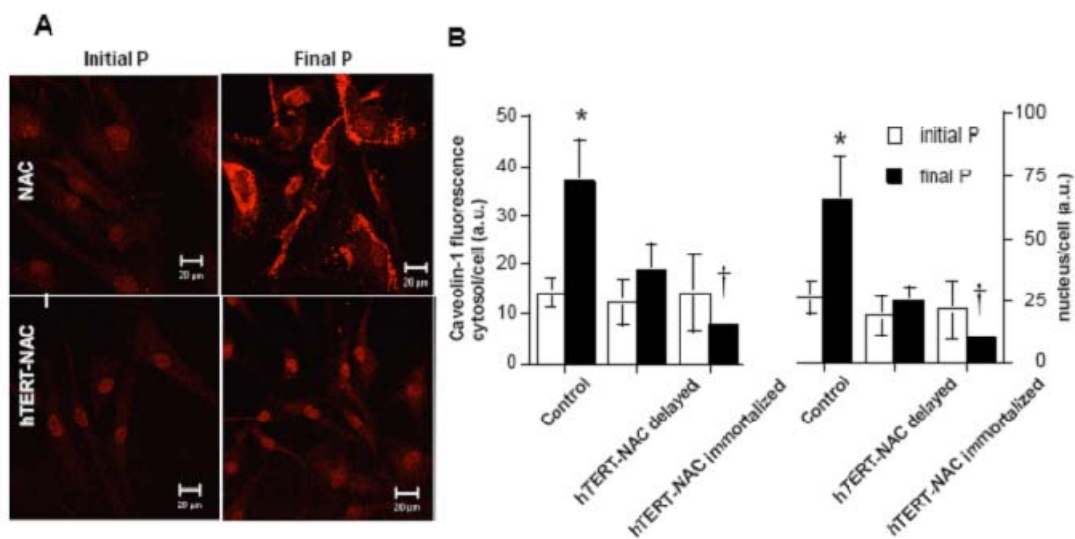


Figure 8

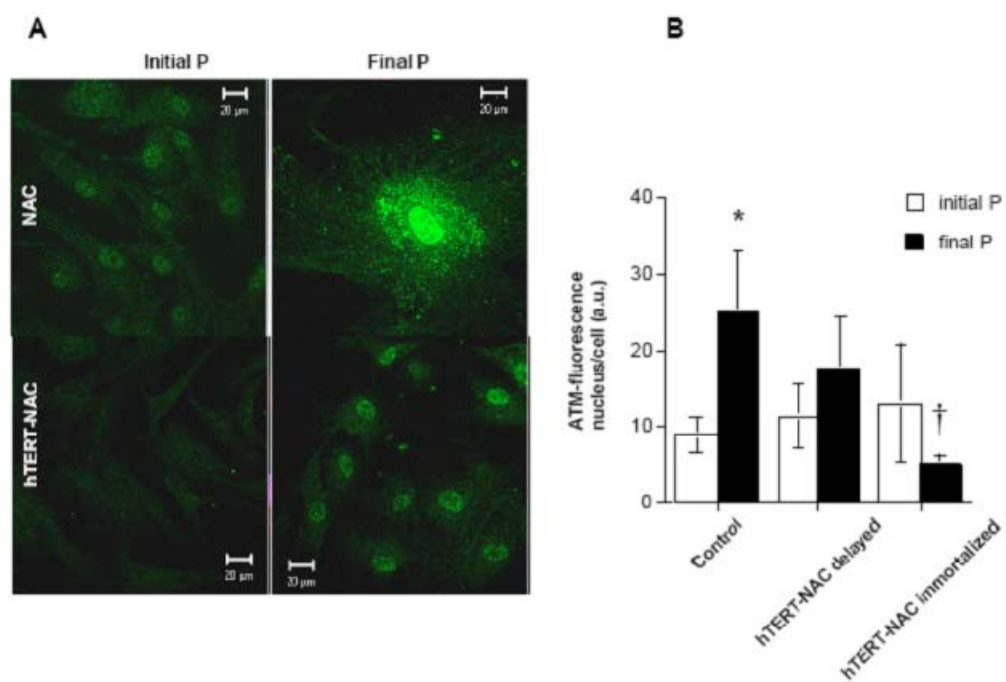
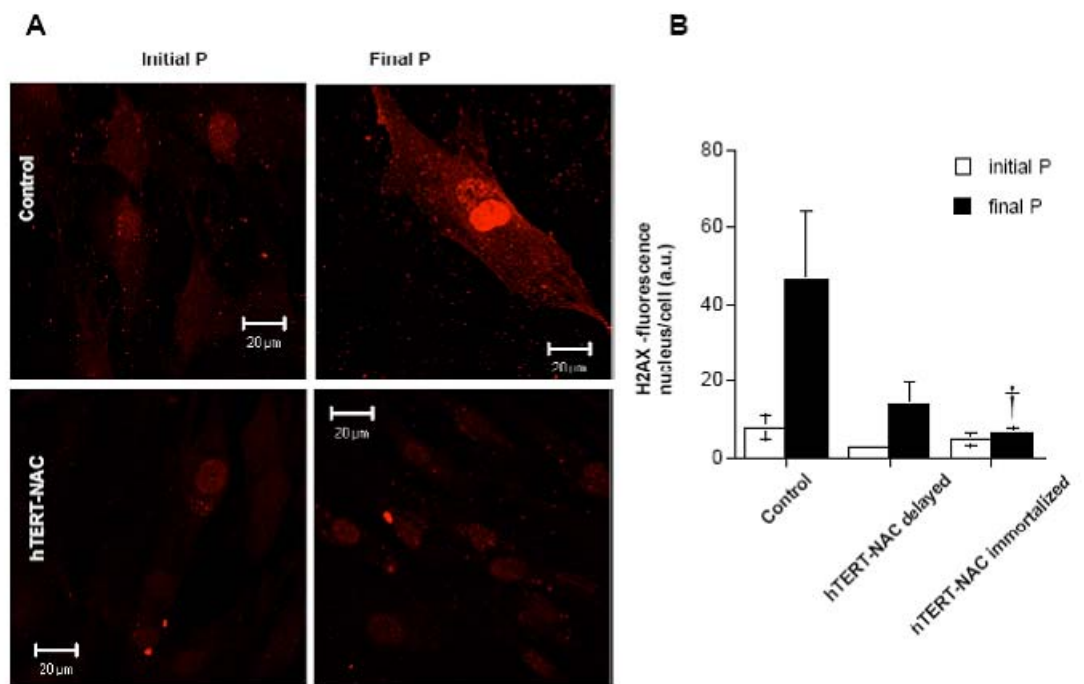


Figure 9



Étude #4

Apport original et contribution des co-auteurs:

La contribution du troisième auteur, Guillaume Voghel, est significative puisqu'il a effectué quelques expériences (southern blot, qPCR) en plus de contribuer à la culture cellulaire et à la rédaction du manuscrit. La majorité du travail a été effectuée par Nada Farhat avec la collaboration du Dr Nathalie Trescases-Thorin pour plusieurs expériences, la culture cellulaire et la rédaction/révision du manuscrit. Monsieur Louis Villeneuve a participé à l'acquisition des images d'immunofluorescence par microscopie confocale et Mme Maya A. Mamarbachi a offert son expertise en biologie moléculaire. Les Drs Michel Carrier et Louis P. Perrault, chirurgiens, ont fourni les prélèvements d'artères provenant des patients. Finalement, le Dr Éric Thorin a supervisé l'étude et contribué à la rédaction/révision du manuscrit.

PERMISSION DE L'ÉDITEUR

1. Identification de la revue ou du livre

Canadian Journal of Physiology and Pharmacology,

University of Manitoba, St. Boniface General Hospital Research Centre, RL008 – 351

Taché Avenue, Winnipeg, MB R2H 2A6 Canada

9 Juillet 2008

2. Identification de l'éditeur ou des éditeurs

Dr. Donald D. Smyth

3. Identification de l'article

Nada Farhat, Nathalie Thorin-Trescases, Guillaume Voghel, Louis Villeneuve,

Maya Mamarbachi, Louis P. Perrault, Michel Carrier & Eric Thorin

Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated from
atherosclerotic chronic smokers

Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 2008, Volume 86, p.761-769.

L'étudiant, Guillaume Voghel, est autorisé à inclure l'article ci-dessus dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : « Vieillissement vasculaire chez des patients athérosclérotiques : sénescence prématurée des cellules endothéliales? »

Éditeur Signature Date

**Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated from
atherosclerotic chronic smokers**

Nada Farhat¹, Nathalie Thorin-Trescases¹, Guillaume Voghel, Louis Villeneuve,
Maya Mamarbachi, Louis P. Perrault, Michel Carrier & Eric Thorin²

Department of Surgery and Research Center, Institut de Cardiologie de Montréal,
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

¹ These authors equally contributed to this work.

² To whom correspondence should be addressed: Institut de Cardiologie de Montréal,
Centre de recherche, 5000, rue Bélanger, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada. Tel.:
(514) 376-3330; fax.: (514) 376-1355; Email: eric.thorin@umontreal.ca

Abstract

Age-associated telomere shortening leads to replicative senescence of human endothelial cells (EC). Risk factors for cardiovascular diseases (CVD) accelerate ageing, while there is a concomitant rise in oxidative stress known to promote stress-induced senescence (SIS) *in vitro*. Among all risk factors for CVD, smoking is associated with the development of inflammation and accelerated atherosclerosis due to a prooxidant/antioxidant imbalance. We tested the hypothesis that SIS predominates in EC isolated from chronic smokers with premature atherosclerosis undergoing coronary artery bypass graft surgery (CABG). We isolated and cultured EC from segments of internal mammary arteries from smoker, former and never-smoker coronary patients. Senescence of EC was induced by serial passage and quantified by the measurement of telomere length and senescence-associated β -galactosidase activity. Compared to non-smoker, smoker patients were 10 years younger in having CABG, an evidence of premature atherosclerosis. Cellular senescence was independent of telomere length and directly related to oxidative damage. EC exhibited higher expression levels of markers of oxidative stress (lipid peroxydation level and caveolin-1 mRNA), inflammation (angiopoietin-like 2 mRNA), hypoxia (VEGF-A mRNA) and cell damage (p53 mRNA). In conclusion, high oxidative stress environment in EC isolated from atherosclerotic chronic smokers predisposes to SIS rather than replicative senescence.

Key words: smoking, atherosclerosis, oxidative stress, caveolin-1, stress-induced senescence, telomere, replicative senescence.

Introduction

The free radical-dependent cellular damage remains at the basis of the theory of ageing (Harman, 1956). Thus, a magnification of the age-associated rise in free radical production by any risk factor for cardiovascular disease (CVD) would accelerate the ageing process. At the cellular level, ageing leads to senescence (Ben-Porath & Weinberg, 2004, 2005). We previously proposed that in cultured endothelial cells (EC) isolated from coronary patients, there was an interplay between the two major pathways of senescence (Voghel et al., 2007): replicative senescence, due to telomere shortening following cell divisions, and stress-induced senescence (SIS), together contributed to the premature senescence of diseased EC. The duration of exposure to risk factor for CVD rather than the biological age of the donor predicted the onset of senescence (Voghel et al., 2007). We also reported that in EC from coronary patients, oxidative stress was a major contributor of stress-induced senescence, as a chronic antioxidant treatment could temporally delay the onset of senescence (Voghel et al., 2008).

Of all of the risk factors, smoking is the one that produces the most free radicals, both acutely and chronically (Nicita-Mauro et al., 2008). Cessation of smoking (Kondo et al., 2004); (Wannamethee et al., 2005) and antioxidant therapy (Heitzer, Just, & Münzel, 1996) improve endothelial function in smokers, suggesting a role for increased levels of oxygen-derived free radicals (Barua et al., 2003). The determinant role of cigarette smoking in coronary artery disease is to cause injury to the vascular endothelium by direct cytotoxicity, leading to premature endothelial dysfunction (Blann & McCollum, 1993); (Ambrose & Barua, 2004). Premature inflammation, atherosclerosis and cardiovascular death are also reported in smokers (Nicita-Mauro et

al., 2008). We therefore hypothesized that *in vivo* chronic exposure to tobacco, which contains mitogenic, carcinogenic and oxidative molecules, will predominantly lead, *in vitro*, to stress-induced senescence of human vascular EC. We found that among patients with severe coronary artery disease, chronic smokers patients underwent CABG 10 years earlier than non-smoker patients. In addition, EC isolated from coronary smokers displayed, early in culture, unique markers of oxidative stress and cell damage that in turn, predisposed EC to oxidative stress-dependent rather than to telomere-dependent senescence.

Methods

Clinical profile of the donors. Segments of human distal internal mammary arteries (IMA, n=46), harvested with low electrocautery energy and excised with cold scissors, discarded during CABG, were used. Collection of the samples was blind. Appropriate standards for human experimentation have been followed, the study has been reviewed and approved by our institution's ethics review committee and the subjects have given informed consent.

From notes in the clinical file of the patients, the donors were divided into active smokers (n=26), former smokers (n=40) and non-smokers (n=20). The information on cigarette consumption (pack/year) of the smokers was not available, however among the patients, 27% (7/26) had chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The group of former smokers was heterogeneous since the duration of smoking cessation ranged from 0.1 to 30 years (average of 13.5 ± 1.9 years) and among them 22.5% (9/40) suffered from COPD. Only one patient who never smoked had COPD.

Culture of EC. Endothelial cells were isolated from human internal mammary arteries, cultured and characterized as previously described (Voghel et al., 2007). Cells were incubated in Dubelcco's modified Eagle medium supplemented with 10% foetal bovine serum, 10% calf serum, 1% penicillin-streptomycin, 90 $\mu\text{g/ml}$ sodium heparin salt (Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri, MO, USA), 60 $\mu\text{g/ml}$ EC growth supplement (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada), and 100 U/ml fungizone (Gibco, Burlington, ON, Canada), at 37°C in a 95% air/5% CO₂ incubator. EC were serially passaged until senescence was reached. For some experiments (oxidative stress,

intrinsic antioxidant capacities estimation, initial gene expression, initial telomere length) passage 2 was used.

Cells were collected for senescence-associated β -galactosidase staining (SA- β -Gal, (Dimri et al., 1995; Voghel et al., 2007), for DNA (Southern blotting), and RNA (real-time reverse transcript polymerase chain reaction, RT-PCR), for reactive oxygen species (ROS) measurement; some cells were plated on coverslips for immunostaining. Before replating, cells were counted and the population doubling level (PDL) was calculated.

Telomere length measurement. Cells were grown in 75 cm² flasks at early (passage 2) and subsequent passages until replicative senescence was reached. DNA extraction was performed with a phenol/chloroform/isoamyl alcohol technique, precipitated using ethanol 95% and dissolved in Tris-HCl (10 mM, pH 8.6). Restriction fragments length (RFL) were quantified using a Southern blot technique (Voghel et al., 2007).

Real-time RT-PCR. Total RNA (EC at passage 2) was isolated using RNeasy kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) and reverse-transcribed into first-strand complementary DNA by MMLV using random hexamer primers. Real-time PCR was carried out on diluted RT products using the DNA-binding dye SYBR Green I for the detection of PCR products (Mx3005P system, Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to the manufacturer's instruction. Serial dilutions (100ng to 1pg) of commercially human aortic EC (Cambrex, Walkersville, MD, USA) total RNA were used as standard. The following primers designed by primer express (Version 2.0) were

used in order to quantify gene expression of caveolin-1, ATM, angiopoietin-like 2 (ANGPTL2), VEGF-A, p53 and GAPDH:

Primers	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>Caveolin-1</i>	GCTGAGCGAGAAGCAAGTGT	TGGTGAAGCTGGCCTTCCAA
<i>ATM</i>	GGCAGCTGATATTCGGAGGA	CATCTTGGTCACGACGATAC
<i>ANGPTL2</i>	GCAATGCGGGTGACTCCTT	TACCAGGACGGAGTCTA
<i>VEGF-A</i>	GAGGGCAGAATCATCACGAA	AGGAGTCCAACATCACCATG
<i>p53</i>	TGAGGTTGGCTCTGACTGTA	TTCTCTTCCTCTGTGCGCCG
<i>GAPDH</i>	TGAAGGTCGGAGTCAACGGA	CATTGATGACAAGCTTCCCG

The mRNA level in each sample was calculated relative to GAPDH. PCR was performed at 95°C for 10 minutes, and then for 40 cycles at 95°C for 30 seconds and 55°C for 1 minute and 72°C for 30 seconds. A final dissociation cycle was done at 95°C for 1 minute, 55°C for 30 seconds and 95°C for 30 seconds.

Immunofluorescence. Immunostaining was used (EC at passage 2) to assess the expression and sub-cellular localization of 4-hydroxy-nonenal (HNE) (rabbit polyclonal anti-HNE, 1:200, Alpha Diagnostics, San Antonio, Texas, USA), a marker of lipid peroxidation. DNA counterstaining was performed by incubating EC with TOPRO-3 (2µM; Molecular Probe, Burlington, ON, Canada). Negative controls were performed by omitting the primary antibodies during the protocol. Cells were visualized using a confocal microscope (Zeiss LSM 510 confocal microscope, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Semi-quantitative analysis was performed by measuring the average total fluorescence intensity from 4-5 different pictures from the same coverslip (Voghel et al., 2008). Values are expressed in arbitrary units (a.u.) of fluorescence corrected by the number of cells.

Intrinsic antioxidant capacities estimation. 5-(and -6) – chloromethyl - 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H₂DCFDA, Molecular Probes, Burlington, ON, Canada) was used as a non-specific marker of reactive oxygen species. Living EC (passage 2) were loaded with 5 μM of CM- H₂DCFDA (in physiological salt solution) for 30 min at 37°C, washed and let recover for 10-15 min at 37°C. The fluorescence was then observed at 488 nm under a confocal microscope. Negative control consisted in unstained cells (autofluorescence). Human internal mammary artery EC used in this study displayed an unstable basal level of CM-H₂DCFDA-fluorescence, level that significantly increased over time (Figure 4A and B). This is not observed using healthy cells, such as porcine or murine aortic endothelial cells, unless they are exposed to a superoxide dismutase inhibitor (data not shown), suggesting that EC isolated from coronary patients are more prone to produce ROS. Thus, we adapted the protocol that usually only consists in measuring the intensity of ROS-fluorescence: EC were exposed to the laser light (time series at 488 nm) until stabilization of the fluorescent signal. Cells in a different field were then exposed to 100 μM H₂O₂ in order to get maximal oxidative activity, and the fluorescent signal was recorded until saturation. Identical parameters were used for experiments with EC from different donors (objective 63x1.4 plan-Apochromat oil, laser Argon 488 nm, 0.1% transmission; dichroic mirror HFT 488 with filter LP505, pinhole size 1.7 Airy unit). The frame size of the images was 512x300 pixels and the scan speed was 2.56 μsec/pixel. The time needed to reach 50% of saturation in both control and H₂O₂ stimulated cells, was calculated with LSM 510 software. The maximal fluorescence intensity in both control and H₂O₂ stimulated cells was also measured. The parameters $\Delta\text{time } 50\%_{(\text{control-H}_2\text{O}_2)}$ and $\Delta\text{fluorescence } \max_{(\text{H}_2\text{O}_2\text{-control})}$ reflect the total intrinsic antioxidant capacities of the

cells: the shorter Δ time and/or the smaller Δ fluorescence, the lower the resistance against oxidative stimuli, the lower the antioxidant defenses.

Statistical analysis of the data. Continuous data are presented as mean \pm SEM, with n indicating the number of patients. Appropriate univariate analysis (t-test or ANOVA with Fisher's post hoc test) was used (Statview 4.5). A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Patient characteristics. The clinical parameters were evenly distributed between patients except for the age of the donor: smokers (56 ± 2 y/o) underwent CABG surgery 10 years before ($p < 0.05$) non-smokers (67 ± 2 y/o) or former smokers (66 ± 2 y/o, Table 1).

Telomere-dependent replicative senescence. Initial telomere length was similar between groups (8.9 ± 0.4 kbp, 9.3 ± 0.3 kbp and 9.0 ± 0.2 kbp, in EC from non-smokers, former smokers and active smokers, respectively). However, telomere shortening rate (the difference between telomere length measured at senescence and initially, corrected by the cumulative replicative potential, $\Delta\text{RFL} / \sum\text{PDL}$) was significantly reduced in EC from smokers, when compared to non-smokers (Fig. 1A; $p = 0.0093$) or former smokers ($p = 0.0204$). We previously reported that the onset of replicative senescence could be predicted by initial telomere length (Voghel et al., 2007). Accordingly, while short initial RFL predicted the development of early senescence in cultured EC isolated from non-smokers ($p = 0.0361$; Fig. 1B) or from former smokers ($p = 0.0042$, data not shown), initial RFL measured in EC from smokers did not correlate with the propensity to develop senescence ($p = 0.468$; Fig. 1C). Altogether, these results are suggestive of a minor role for replicative senescence in EC from smokers.

Senescence profile. Serial passage induced senescence in EC, whether or not the donor was smoking. Senescence, however, appeared slightly later in EC from smokers compared to non-smokers (Fig. 2): the time needed to reach 50% of senescence was 17 days longer in EC from smokers ($p = 0.0313$). PDL reached at 50% of senescence was also higher in smokers ($p = 0.0295$) (Fig. 2), suggesting a slightly higher replicative

potential. Senescence profile of EC from former smokers was intermediate (Fig. 2), suggesting some normalization towards a non-smoker phenotype.

Initial EC biomarkers of oxidative stress. Oxidative stress and free radical production were evaluated early in culture, *i.e.* at passage 2 (cumulative PDL = 4.5 ± 1.4 ; SA- β -Gal positive cells = $5.1 \pm 0.8\%$, n=46), in order to reflect the *in vivo* situation rather than the effect of cell culture.

Initial levels of HNE, a marker of lipid peroxidation, were significantly higher in EC from smokers compared to non-smokers or former smokers (Fig. 3).

In EC from coronary patients, smokers or non-smokers, the level of DCFDA-fluorescence increased over time (Figure 4A-B), likely due to the strong generation of ROS by the cells and concomitant oxidation of the dye. In healthy porcine EC, the level of DCFDA-fluorescence is $\approx 10\ 500$ fold lower than in human internal mammary artery EC (personnal data) and in healthy EC, the signal remains stable over time (data not shown). EC from smokers or non-smokers behaved differently when exogenous H_2O_2 was added at a sub-lethal concentration: in EC from smokers, DCFDA signal was faster to rise than the signal observed in the absence of H_2O_2 stimulus. In contrast, EC from non-smokers or former smokers developed a slow and weak signal in response to the laser light in the presence of H_2O_2 , demonstrating the endogenous ability of the cell to scavenge oxidative stress. Altogether, these data suggest that there is a significant lower antioxidant capacity in EC from smokers compared to non-smokers.

Genomic EC markers of smoking. Gene expression levels were quantified at passage 2, as above. The initial gene expression of caveolin-1, a protein known to promote oxidative SIS (Galbiati et al., 2001; Voghel et al., 2008; Voghel et al., 2007), was 8 fold higher ($p=0.0275$) in EC from smokers (Table 2). In addition, caveolin-1 expression positively correlated with the oxidative stress marker HNE ($p=0.0009$, $r=0.850$, $n=10$; data not shown). On the other hand, initial ATM expression, a protein known to function as transducer of double-strand DNA break and telomere dysfunction (Pandita, 2002); (Herbig, Jobling, Chen, Chen, & Sedivy, 2004), was 2 fold lower in EC from smokers ($p=0.0194$) or former smokers ($p<0.05$). Similar data were observed at the ATM protein level (data not shown). Initial angiopoietin-like 2 (ANGPTL2) mRNA levels, a potential marker of inflammation (Sun et al., 2007), were 4 times higher ($p=0.0406$) in EC from smokers compared to non-smokers (Table 2). Similarly, initial gene levels of the angiogenic factor VEGF-A were 3 times higher ($p=0.0005$) in EC from smokers (Table 2). Damage, on the other hand, was evidenced by a 2-fold increase in gene expression of the tumour suppressor gene p53 ($p=0.049$) and protein p53 (data not shown), a downstream target in EC from smokers (Table 2). Cessation of smoking was associated with a reduction of caveolin-1, ANGPTL2, p53 and VEGF-A mRNA levels, but not ATM mRNA levels (Table 2).

Discussion

The major finding of the present study is that SIS predominates in EC isolated from active smokers undergoing CABG surgery. Smoking is associated with an increased oxidative stress and a reduced antioxidant defence capacity of the cells. These results concord with the premature atherosclerosis that developed in these patients, a 10-year prematurity in the disease that strikingly matches the reduced life expectancy of active smokers (Doll, Peto, Boreham, & Sutherland, 2005);(Nicita-Mauro et al., 2008).

Cellular senescence, estimated by senescence-associated β -galactosidase, was slightly delayed in EC from smokers compared to non-smokers (Fig. 2). This small delay is likely related to the younger age of the smokers. This increase in replicative potential could be attributed to a better integrity of the mitotic clock of the cells. But EC eventually entered in senescence in both groups; the main pathway of senescence, however, differs dramatically between groups. In smokers, replicative senescence seems minimal since i) telomere shortening was smaller (Fig. 1A), ii) ATM gene expression was lower in EC from smokers (Table 2), suggesting lower molecular and telomeric instability and iii) initial telomere length was not correlated with the propensity to develop senescence (Fig. 1B). On the other hand, the massive oxidative stress and damage as evidenced by an increased level of lipid peroxidation (Fig. 3), the lack of antioxidant defence mechanisms (Fig. 4) and an increased caveolin-1 and p53 gene/protein expression (Table 2) in EC isolated from smokers, drive senescence through SIS. This contrasts with the work of Valdes (Valdes et al., 2005) where telomere shortening, measured in white blood cells, was greater in smoking women. The difference in cell types is likely responsible for this discrepancy. It is possible that

an increased inflammatory phenotype promotes leukocytes mobilization, high turnover rate and thus excessive telomere attrition, but this remains speculative. We also observed no difference in nuclear and cytosolic human telomerase activity between EC from smokers or non-smokers (data not shown) suggesting that telomere shortening is not compensated in EC from smokers by higher telomerase activity. Cessation of smoking was associated with a decrease in oxidative stress marker HNE (Fig. 3), an improvement in intrinsic antioxidant properties (Fig. 4), a decrease in caveolin-1, p53, VEGF-A and ANGPTL2 gene expression (Table 2) and a higher telomere shortening rate (Fig. 1). Altogether, these data strongly suggest that EC from chronic smokers are predisposed to SIS but not to telomere-dependent senescence pathways. The fact that cigarette smoke induces cellular senescence has been previously reported in alveolar epithelial cells (Tsuji, Aoshiba, & Nagai, 2006) and in fibroblasts (Nyunoya et al., 2006), but SIS was not clearly demonstrated.

The fluorescent probe DCFDA is broadly used to non-specifically estimate the sources of oxidative stress. While our approach to quantify the intrinsic antioxidant capacities does not provide a descriptive assessment of sources of antioxidant defences, it globally estimates the capacities of EC to react against H₂O₂ stimulus. This lack of antioxidant defence is in line with our finding that caveolin-1 gene expression was significantly increased in EC from smokers and positively correlated with HNE levels. The level of caveolin-1 is strictly regulated to maintain cellular integrity, leading to cellular transformation if depleted and to a phenotype of premature senescence if over-expressed (Cho & Park, 2005); (Galbiati et al., 2001). Our data therefore strongly support the concept of the presence of high oxidative stress in EC from smokers. The

fact that smoking is associated with increased oxidative stress has been previously reported in other sources (Nicita-Mauro et al., 2008): in serum and plasma from smokers, high levels of malondialdehydes (Sharma et al., 2002) and F₂-isoprostane (Dietrich et al., 2002) were observed. Oxidative-DNA damage products were measured in urinary samples (Chen, Wu, Hong, & Chang, 2004) and lung tissues (Asami et al., 1997) from smokers. Altogether, these data indicate that chronic exposure to tobacco induces potent chronic oxidative stress that could lead to EC damage, SIS and the premature atherosclerosis observed in our population of smoking patients.

Compared to coronary arteries, IMA rarely develop macroscopic atherosclerotic plaques. Although not exposed to the same mechanical stress imposed to the coronary circulation, they are nevertheless exposed to similar levels of atherogenic agents (Puga, 1995). It has been reported that in IMA tissue from smokers, antioxidant capacities were significantly lower than in tissues from non-smokers, and that the severity of coronary atherosclerotic lesions was inversely correlated to the IMA levels of vitamin E (Mezzetti et al., 1995). On the other hand, it has been reported that vascular smooth muscle cells (VSMC) from IMA compared to VSMC from coronary arteries have enhanced intrinsic antioxidant enzymes capacities (Mahadevan, Campbell, McKeown, & Bayraktutan, 2006). To the best of our knowledge, there is no data concerning intrinsic prooxidant/antioxidant capacities in EC isolated from IMA.

Endothelial cells from smokers display higher initial VEGF-A gene expression (Table 2). Nicotine has been shown to increase VEGF expression (Conklin, Zhao, Zhong, & Chen, 2002). Hypoxia is also a strong inducer of both VEGF and VEGF receptor genes, and VEGF is a trophic factor required for EC survival (Kasahara et al., 2001).

Combined with the younger age of the donors, these abnormally high levels of VEGF could also contribute to the higher replicative potential of EC from smokers observed in culture. In addition, we observed higher initial ANGPTL2 gene expression in EC from smokers (Table 2); if we consider in the smoker subgroup the impact of COPD, a state of chronic inflammation, ANGPTL2 mRNA levels were even higher in COPD-smokers (11.68 ± 5.44 versus 2.29 ± 0.97 , $p < 0.05$. COPD-smokers versus non-COPD smokers; data not shown). ANGPTL2 is a novel growth factor (Morisada, Kubota, Urano, Suda, & Oike, 2006) that could be involved in the development of the abnormal vasculature in diabetes and in endothelial inflammation (Sun et al., 2007). ANGPTL2 gene expression was positively correlated with VEGF-A gene expression and replicative potential (data not shown). Thus, both VEGF and ANGPTL2 could promote cell growth in response to the chronic inflammatory stress associated with smoking. Finally, EC isolated from smokers expressed both higher mRNA and protein (data not shown) levels of p53. The tumour suppressor p53 is involved in multiple cellular functions including senescence (Ben-Porath & Weinberg, 2005) and is an index of cell damage since its function is to restrict stress-exposed cells before damages to DNA become irreversible. There is therefore a striking combination of expression of pro-survival and damage biomarkers in EC isolated from smokers. This suggests that in EC isolated from active smokers, p53-driven senescence can occur before reaching the Hayflick limit, *i.e.* independently of telomere shortening and that oxidative stress triggers senescence upstream of DNA damage.

We have to consider some potential limitations of our study. The patients used in this study are atherosclerotic and hypertensive, obese and/or diabetic and therefore, the

combination of these multiple risk factors for cardiovascular disease makes the analysis of the effect of smoking on senescence complex. We found, however, clear differences between atherosclerotic smokers and atherosclerotic non-smokers, with, in the former group, younger age, lower EC antioxidant capacities and telomere-independent senescence. The second possible limitation is the lack of knowledge of the number of daily cigarette consumption. This however, should not be perceived as a weakness since it has been reported that alteration of endothelial vasoregulatory activity is independent from the number of smoked cigarettes (Barua et al., 2002) as this activity was similar in subjects who smoked one pack of cigarettes per week, per day, or less.

In conclusion, EC from severely atherosclerotic smokers display evidences of long-term *in vivo* exposure to oxidative stress and inflammation that likely contribute to hastening the need for CABG by a decade. The severe cellular damages induced by chronic smoking drive EC towards a senescence pathway that is telomere-independent and mainly triggered by oxidative stress.

Acknowledgements

This work has been supported in part by the Foundation of the Montreal Heart Institute, the Heart and Stroke Foundation of Quebec, and the Canadian Institute for Health Research (MOP 14496). Nada Farhat holds the *Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarships - Doctoral Award* in association with the Canadian Institute for Health Research. Guillaume Voghel is supported by the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec*. The authors acknowledge the technical and ethical support provided by the “Réseau d’échange de tissus et d’échantillons biologiques” funded by the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec*.

References:

- Ambrose, J., & Barua, R. (2004). The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol.*, 43(10), 1731-1737.
- Asami, S., Manabe, H., Miyake, J., Tsurudome, Y., Hirano, T., Yamaguchi, R., et al. (1997). Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis*, 18(9), 1763-1766.
- Barua, R., Ambrose, J., Eales-Reynolds, L., DeVoe, M., Zerva, J., & DC., S. (2002). Heavy and light cigarette smokers have similar dysfunction of endothelial vasoregulatory activity: an in vivo and in vitro correlation. *J Am Coll Cardiol.*, 39(11), 1758-1763.
- Barua, R., Ambrose, J., Srivastava, S., De Voe, M., LJ., E.-R., & (2003). Reactive oxygen species are involved in smoking-induced dysfunction of nitric oxide biosynthesis and upregulation of endothelial nitric oxide synthase: an in vitro demonstration in human coronary artery endothelial cells. *Circulation*, 107(18), 2342-2347.
- Ben-Porath, I., & Weinberg, R. (2004). When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest.*, 113(1), 8-13.
- Ben-Porath, I., & Weinberg, R. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(5), 961-976.
- Blann, A., & McCollum, C. (1993). Adverse influence of cigarette smoking on the endothelium. *Thromb Haemost*, 70(4), 707-711.
- Chen, H., Wu, C., Hong, C., & Chang, C. (2004). Urinary excretion of 3,N4-etheno-2'-deoxycytidine in humans as a biomarker of oxidative stress: association with cigarette smoking. *Chem Res Toxicol*, 17(7), 896-903.
- Cho, K. A., & Park, S. C. (2005). Caveolin-1 as a prime modulator of aging: a new modality for phenotypic restoration? *Mech Ageing Dev*, 126(1), 105-110.
- Conklin, B. S., Zhao, W., Zhong, D. S., & Chen, C. (2002). Nicotine and cotinine up-regulate vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells. *Am J Pathol*, 160(2), 413-418.
- Dietrich, M., Block, G., Hudes, M., Morrow, J., Norku, E., Traber, M., et al. (2002). Antioxidant supplementation decreases lipid peroxidation biomarker F(2)-isoprostanes in plasma of smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11(1), 7-13.

- Dimri, G., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(20), 9363-9367.
- Doll, R., Peto, R., Boreham, J., & Sutherland, I. (2005). Mortality from cancer in relation to smoking: 50 years observations on British doctors. *Br J Cancer*, *92*(3), 426-429.
- Galbiati, F., Volonté, D., Liu, J., Capozza, F., Frank, P., Zhu, L., et al. (2001). Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*, *12*(8), 2229-2244.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, *11*(3), 298-300.
- Heitzer, T., Just, H., & Münzel, T. (1996). Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation*, *94*(1), 6-9.
- Herbig, U., Jobling, W., Chen, B., Chen, D., & Sedivy, J. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell Biol*, *14*(4), 501-513.
- Kasahara, Y., Tuder, R., Cool, C., Lynch, D., Flores, S., & Voelkel, N. (2001). Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*, *163*(3 Pt 1), 737-744.
- Kondo, T., Hayashi, M., Takeshita, K., Numaguchi, Y., Kobayashi, K., Iino, S., et al. (2004). Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *24*(8), 1442-1447.
- Mahadevan, V., Campbell, M., McKeown, P., & Bayraktutan, U. (2006). Internal mammary artery smooth muscle cells resist migration and possess high antioxidant capacity. *Cardiovasc Res*, *72*(1), 60-68.
- Mezzetti, A., Lapenna, D., Pierdomenico, S., Calafiore, A., Costantini, F., Riario-Sforza, G., et al. (1995). Vitamins E, C and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and non-smokers. *Atherosclerosis*, *112*(1), 91-99.
- Morisada, T., Kubota, Y., Urano, T., Suda, T., & Oike, Y. (2006). Angiopoietins and angiopoietin-like proteins in angiogenesis. *Endothelium*, *13*(2), 71-79.
- Nicita-Mauro, V., Lo Balbo, C., Mento, A., Nicita-Mauro, C., Maltese, G., & Basile, G. (2008). Smoking, aging and the centenarians. *Exp Gerontol*, *43*(2), 95-101.

- Nyunoya, T., Monick, M., Klingelutz, A., Yarovinsky, T., Cagley, J., & Hunninghake, G. (2006). Cigarette smoke induces cellular senescence. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 35(6), 681-688.
- Pandita, T. (2002). ATM function and telomere stability. *Oncogene*, 21(4), 611-618.
- Puga, J. (1995). The use of the internal mammary artery for revascularization of the left anterior descending coronary artery. *Eur Heart J*, 16 Suppl E(21-5).
- Sharma, S., Dwivedi, S., Prabhu, K., Singh, G., Kumar, N., & Lal, M. (2002). Coronary risk variables in young asymptomatic smokers. *Indian J Med Res*, 122, 205-210.
- Sun, H., Zheng, J., Chen, S., Zeng, C., Liu, Z., & li, L. (2007). Enhanced expression of ANGPTL2 in the microvascular lesions of diabetic glomerulopathy. *Nephron Exp Nephrol*, 105(4), e117-123.
- Tsuji, T., Aoshiba, K., & Nagai, A. (2006). Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*, 174(8), 886-893.
- Valdes, A., Andrew, T., Gardner, J., Kimura, M., Oelsner, E., Cherkas, L., et al. (2005). Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet*, 366(9486), 662-664.
- Voghel, G., Thorin-Trescases, N., Farhat, N., Mamarbachi, A., Villeneuve, L., Fortier, A., et al. (2008). Chronic treatment with N-acetyl-cystein delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients. *Mech Ageing Dev*, 129(5), 261-270.
- Voghel, G., Thorin-Trescases, N., Farhat, N., Nguyen, A., Villeneuve, L., Mamarbachi, A. M., et al. (2007). Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors. *Mech Ageing Dev*, 128(11-12), 662-671.
- Wannamethee, S., Lowe, G., Shaper, A., Rumley, A., Lennon, L., & Whincup, P. (2005). Associations between cigarette smoking, pipe/cigar smoking, and smoking cessation, and haemostatic and inflammatory markers for cardiovascular disease. *Eur Heart J*, 26(17), 1765-1773.

Table 1. Clinical profile of patients undergoing coronary artery bypass graft surgery.

	Smokers (n=26)	Former-smokers (n=40)	Non-smokers (n=20)
Sex (Male/Female)	22/4	30/10	15/5
Age (years) [range]	56.2±2.4 * [25-79]	66.1±1.6 [47-84]	66.5±2.1 [50-80]
BMI (kg/m ²)	27.0±0.9	28.7±0.9	28.8±1.1
Glucose level (mM)	6.5±0.3	6.5±0.2	6.7±0.4
LEVF (%)	50.0±2.4	51.8±2.1	52.6±2.7
History of disease (years) [range]	8.2±2.6 [0.1-47]	7.0±1.2 [0.1-29]	6.3±1.9 [0.1-23]
Dyslipidemia (%)	92 (23/25)	85 (34/40)	89.5 (17/19)
Hypertension (%)	58 (14/24)	75 (30/40)	75 (15/20)
Diabetes (%)	24 (6/25)	30 (12/40)	45 (9/20)
Family history CAD (%)	94 (16/17)	85 (17/20)	63.6 (7/11)
Renal failure (%)	8 (2/25)	17.5 (7/40)	5 (1/20)
COPD (%)	27 (7/26)	23 (9/40)	5 (1/20)

Patients were treated with similar medications including aspirin, angiotensin-converting enzyme inhibitors, β -blockers, calcium channels blockers, statins and nitrates.

*; $p < 0.05$ versus non-smokers (ANOVA).

BMI: body mass index; LEVF: left ejection ventricular fraction; CAD: coronary artery disease; COPD: chronic obstructive pulmonary disease.

Table 2: Initial gene expression in EC isolated from patients.

mRNA	Non-smokers	Former-smokers	Smokers
Caveolin-1	0.446±0.091 (8)	0.691±0.131 (19)	3.666±1.436 (14) *
ATM	1.295±0.393 (6)	0.692±0.098 (18) *	0.689±0.089 (14) *
ANGPTL2	1.354±0.461 (12)	1.550±0.306 (25)	5.053±1.944 (17) *
VEGF-A	2.555±0.452 (12)	3.160±0.646 (25)	7.321±1.083 (17) *
p53	1.224±0.092 (5)	1.368±0.143 (15)	2.414±0.533 (12) *

*: $p < 0.05$ versus non-smokers (ANOVA).

Figure 1: *Lower telomere shortening in EC from smokers.*

(A) Telomere length (RFL, bp) was measured by Southern blot, initially (passage 2) and when cells reached senescence. Telomere shortening was then calculated (Δ RFL) and corrected by the number of cell divisions performed (Σ PDL) in EC from non-smokers (n=16), former smokers (n=30) and smokers (n=21). *: p<0.05 compared to non-smokers. (B) Correlation between the marker of propensity to develop senescence (Time to reach 50% of senescent EC, days) and initial telomere length (bp), in EC from non-smokers (r= 0.526, p=0.0361, n=15) and in EC from smokers (C) (r= 0.164, p=0.4680, n=21).

Figure 2: *Passage-induced senescence in EC from smokers.*

Time course of senescence, quantified by senescence associated β -galactosidase and induced by serial passage in culture, in EC isolated from non-smokers (open squares, n=16), former smokers (open triangles, n=34) and smokers (closed squares, n=25). From the profiles of senescence, the time (Σ Days) and the number of cell divisions (Σ PDL) reached when 50% of the cells are senescent, were calculated. *: p<0.05 compared to non-smokers.

Figure 3: *Increase in lipid peroxidation in EC isolated from smokers.*

Total levels of 4-hydroxy-nonenal (HNE) were estimated by immunofluorescence staining (red) at passage 2. DNA counterstaining (blue) was performed with TOPRO-3. Examples of immunostaining of EC isolated from a non-smoker (A) and a smoker (B) patient. (C) Average initial values of total HNE corrected by the number of cells, in EC

from non-smokers (n=8), former smokers (n=9) and smokers (n=5). *: $p < 0.05$ compared to non-smokers.

Figure 4: *Lower intrinsic antioxidant capacities in living EC from smokers.*

EC were loaded with the non-specific fluorescent dye CM-H₂DCFDA, at passage 2 (C). EC were stimulated with the laser light in the absence and presence of 100 μ M of H₂O₂ until the fluorescent signal stabilized. The time needed to reach 50% of saturation in both control and H₂O₂ stimulated cells, was measured and the maximal fluorescence intensity in both control and H₂O₂ stimulated cells was recorded. Δ time 50%_(control-H₂O₂) and Δ fluorescence max_(H₂O₂-control) were calculated: the shorter Δ time and the smaller Δ fluorescence, the lower the antioxidant capacities of the cells. Example of saturation profile in EC from a non-smoker (A) and a smoker (B) patient. Average Δ time 50% (D) and Δ fluorescence (E) in EC from non-smokers (n=6), former smokers (n=9) and smokers (n=4). *: $p < 0.05$ compared to non-smokers.

Figure 1

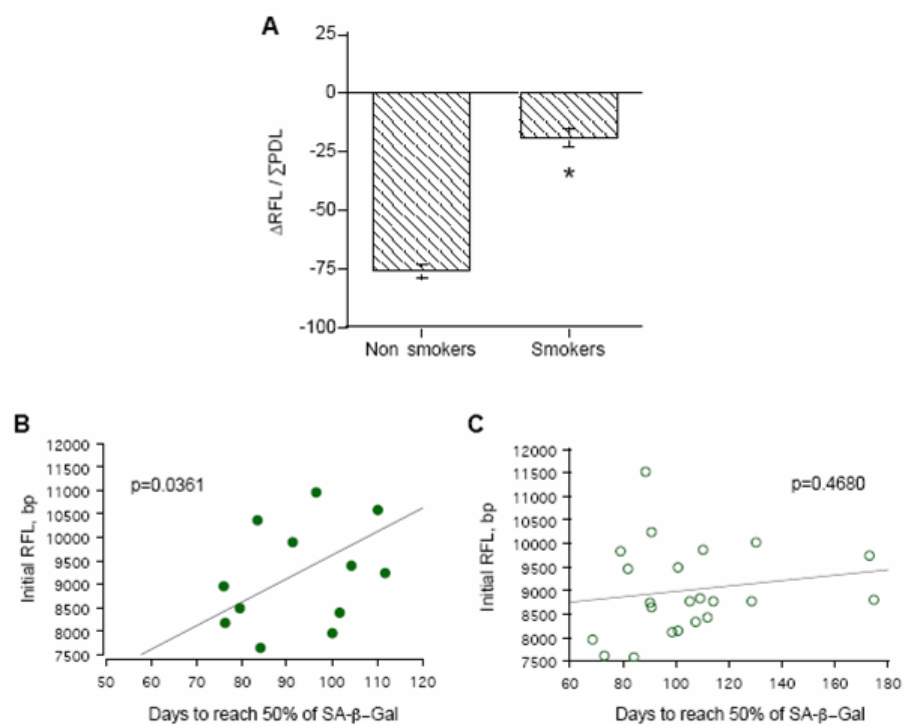
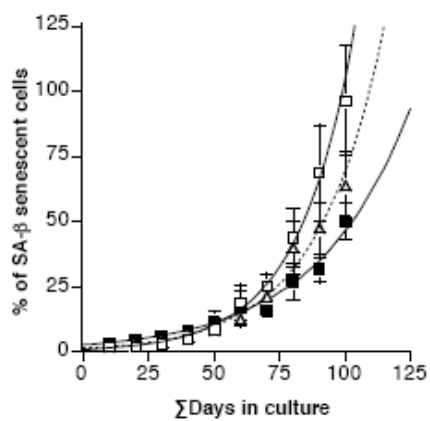


Figure 2



	50% of senescent cells: Σ Days	Σ PDL
□ Non smokers	87 \pm 4	10 \pm 1
△ Former smokers	103 \pm 5 *	12 \pm 1
■ Smokers	104 \pm 5 *	13 \pm 1 *

Figure 3

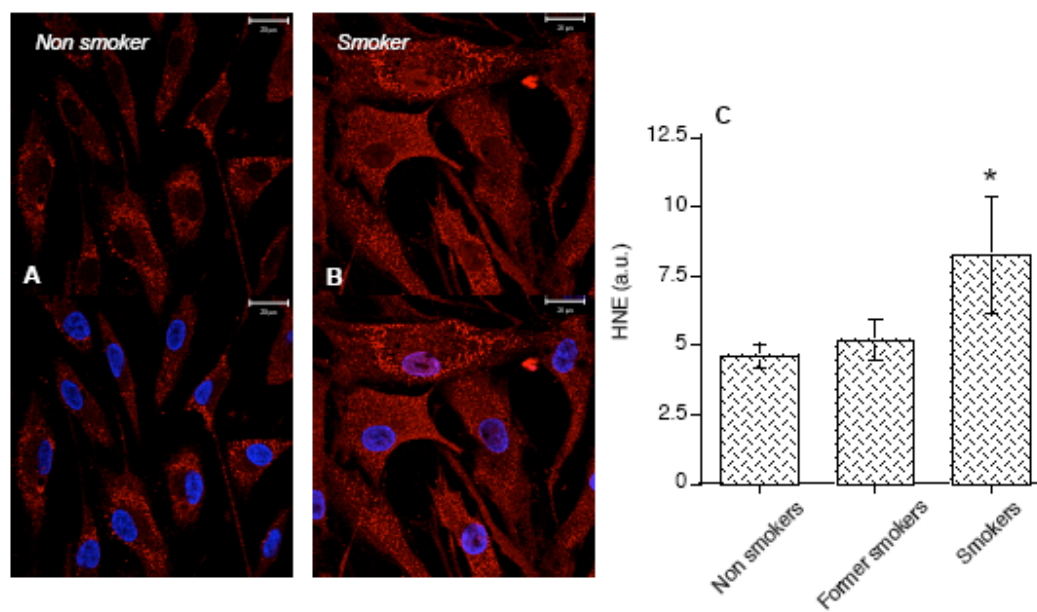


Figure 4

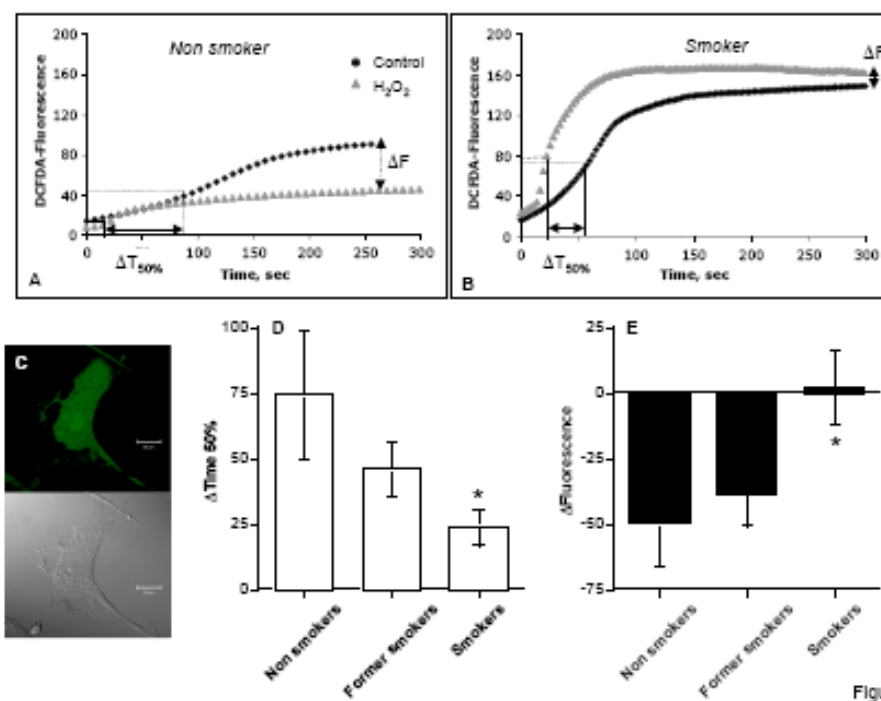


Figure 4

5. Discussion

Dans cette section, je discuterai des principaux résultats de mes travaux. J'essaierai d'établir un fil conducteur unissant les quatre études présentées dans cette thèse et leurs contributions aux connaissances scientifiques actuelles. Je résumerai également l'impact des facteurs de risque cardiovasculaire sur le vieillissement vasculaire ainsi que l'effet de diverses approches cherchant à ralentir la sénescence cellulaire, en plus de souligner les forces et les faiblesses de nos investigations.

5.1. Sénescence cellulaire et vieillissement de l'organisme

5.1.1. Sénescence cellulaire : cause du vieillissement *in vivo*?

In vitro, la sénescence est associée à plusieurs changements d'expression génique et protéique, mais survient-elle *in vivo* et est-elle la cause du vieillissement et des complications physiopathologiques qui lui sont associées?

Burrig a été un des premiers à observer *in vivo* la présence de cellules endothéliales géantes ($>800\mu\text{m}^2$) recouvrant les plaques d'athérosclérose avancée, suggérant la présence de cellules sénescents dans des régions où le flot sanguin est le plus turbulent (Burrig 1991). Le groupe de Minamino *et al.* a évalué cette hypothèse dans leurs travaux portant sur des artères coronaires. À l'aide d'un marquage *ex vivo* de la β -galactosidase associée à la sénescence, ils ont observé la présence de cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires positives au niveau de plaques athérosclérotiques tapissant les artères coronaires (Minamino and Komuro 2002). Ces

travaux confirment donc l'existence de la sénescence cellulaire *in vivo* et confèrent par le fait même, un rôle à la sénescence dans le développement de complications physiopathologiques telles que l'athérosclérose (Minamino and Komuro 2002; Minamino, Miyauchi et al. 2002).

Le phénotype de sénescence a également été proposé comme un mécanisme de suppression de la tumorigénèse *in vivo*, menant les cellules exposées à des stimuli oncogéniques à un état de non division afin de prévenir leur transformation en un phénotype tumorigénique (Campisi 2001). Cette hypothèse a été émise suite à l'observation qu'après mutations des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (p16, p21, p53, Rb), les mécanismes d'induction de sénescence sont contournés et confère aux cellules un potentiel répliatif illimité qui favorise l'apparition d'un phénotype tumoral (Sager 1991; Yeager, DeVries et al. 1998; Campisi 2000; Reddel 2000; Campisi 2001).

De plus, d'autres études suggèrent que les changements fonctionnels des cellules sénescents pourraient contribuer au processus du vieillissement. Par exemple, une corrélation négative a été observée entre l'âge des donneurs et le nombre de divisions cellulaires effectuées par des cellules en culture, suggérant que le potentiel répliatif des cellules diminue avec le vieillissement de l'organisme (Hayflick and Moorhead 1961; Schneider and Mitsui 1976; Perillo, Naeim et al. 1993; Campisi 1996; Faragher and Kipling 1998; Rufer, Brummendorf et al. 1999; Robertson, Gale et al. 2000; Martin-Ruiz, Gussekloo et al. 2005). D'autre part, plusieurs syndromes de vieillissement accéléré (progérie) ont également été associés à une entrée prématurée

des cellules en sénescence *in vitro* (Lavin and Shiloh 1997; Heiss, Knight et al. 1998; Lebel 2001; Hennekam 2006).

Les cellules sénescents secrètent plusieurs molécules telles que des métalloprotéinases, des cytokines inflammatoires et des facteurs de croissance (Campisi 1996; Campisi 2000; Campisi 2001), molécules qui sont normalement exprimées lors d'une infection ou de processus de réparation cellulaire, et qui altèrent la fonction tissulaire normale. Ainsi, il est plausible qu'une expression constitutive de ces molécules par les cellules sénescents soit plus importante dans les tissus de personnes âgées, ce qui pourrait expliquer la diminution des fonctions physiologiques tissulaires normalement associée avec le vieillissement.

5.1.2. Sénescence cellulaire *in vivo* : télomères dépendante ou indépendante?

Quels sont les réels éléments déclencheurs de la sénescence *in vivo*? Est-ce le raccourcissement des télomères, le stress oxydant ou bien d'autres agents?

Le stress oxydant semble jouer un rôle important. Considérant que la sénescence cellulaire survient *in vivo* et qu'elle peut contribuer au vieillissement, le groupe de Kapahi *et al.* a observé une corrélation directe entre la longévité de différentes espèces animales et leurs défenses antioxydantes (Kapahi, Boulton et al. 1999), suggérant que le stress oxydant peut être responsable du vieillissement biologique. De plus, l'espérance de vie de souris a été augmentée si elles étaient traitées avec des antioxydants exogènes (Yu, Kang et al. 1998). Parallèlement, des

études du vieillissement des souris ont révélé que ces dernières possèdent des télomères significativement plus longs (20-100kb), une télomérase active, mais une espérance de vie plus courte que les humains (Chadeneau, Siegel et al. 1995; Prowse and Greider 1995). Par contre, les cellules de souris prélevées en fin de vie et cultivées *in vitro*, ont des télomères très longs, suggérant que la sénescence serait déclenchée *in vivo* indépendamment de la longueur des télomères (Prowse and Greider 1995). Cette sénescence serait plutôt associée à leur faible capacité antioxydante endogène concordant avec les résultats de Kapahi (Prowse and Greider 1995; Saito, Hammond et al. 1995; Itahana, Zou et al. 2003).

À l'opposé, certains syndromes de progérie suggèrent fortement la participation de l'instabilité télomérique dans le vieillissement biologique. Par exemple, le syndrome de Werner est une pathologie associée à une mutation d'un gène (*Wrn*) codant pour une hélicase d'ADN (Lebel 2001). L'étude *in vitro* de ces cellules démontre que la conséquence de cette mutation est un taux de raccourcissement des télomères élevé associé à une diminution du potentiel répliatif des cellules et une sénescence prématurée, ce qui explique le phénotype de vieillissement accéléré observé *in vivo* chez les patients atteints du syndromes de Werner (Salk, Bryant et al. 1981; Faragher, Kill et al. 1993; Tahara, Tokutake et al. 1997). Comme une surexpression de la hTERT *in vitro* peut prévenir cette sénescence (Tahara, Tokutake et al. 1997; Wyllie, Jones et al. 2000), le raccourcissement excessif des télomères semble donc directement responsable de cette sénescence prématurée. De plus, les patients atteints du syndrome de Werner présentent une augmentation de la fréquence de maladies normalement associées au vieillissement, comme l'athérosclérose (Matsumoto 1993; Lebel, Lavoie

et al. 2003; Massip, Garand et al. 2006). Un autre syndrome appuyant le rôle des télomères et de la sénescence cellulaire dans le vieillissement *in vivo*, est la dyskeratosis congenita (DC). La mutation du gène impliqué (*Dkc1*) a pour conséquence de réduire l'activité de la télomérase, d'avoir des télomères plus courts que les contrôles sains et de développer un vieillissement prématuré (Mitchell, Wood et al. 1999; Rudolph, Chang et al. 1999; Ruggero, Grisendi et al. 2003). Ainsi, il est plausible dans ces cas, que l'instabilité télomérique soit responsable, du moins en partie, de la sénescence cellulaire et du vieillissement *in vivo* prématuré.

Toutefois, certains contestent le rôle des télomères comme indicateur de potentiel réplicatif et de vieillissement biologique, les cellules cancéreuses étant immortelles malgré des télomères relativement courts (Blackburn 2000; Rubin 2002). Cependant, bien qu'elles soient hyperprolifératives, 85% des cellules cancéreuses surexpriment la hTERT qui allongent principalement les télomères les plus courts (Blasco 2005). Ainsi, l'équilibre entre le raccourcissement télomérique à chaque division cellulaire et leur allongement par la hTERT, maintient les télomères à une longueur relativement courte mais stable. Par ailleurs, l'inhibition de la télomérase dans ces cellules cancéreuses mène ultimement à la sénescence (Hahn, Stewart et al. 1999; Zhang, Mar et al. 1999), appuyant ainsi le rôle d'horloge mitotique des télomères. Cependant, la corrélation existant entre la longueur des télomères, la sénescence cellulaire et l'âge chronologique des patients n'est pas toujours observée. Par exemple, une étude portant sur différents types cellulaires provenant de centenaires a révélé une corrélation inverse entre la longueur des télomères provenant de cellules sanguines mononucléaires et l'âge chronologique des donneurs, mais cette corrélation

n'était pas observée dans les fibroblastes et les cellules endothéliales provenant des mêmes individus (Mondello, Petropoulou et al. 1999). Une première explication réside probablement dans le type cellulaire utilisé. En effet, les cellules avec un fort taux de prolifération *in vivo* (cellules sanguines) sont plus susceptibles de voir leurs télomères raccourcir et atteindre la sénescence réplivative plus rapidement. Ceci suggère que, dans ce cas, le raccourcissement des télomères ne contribue pas *a priori*, à la sénescence de cellules telles que les fibroblastes *in vivo*, mais possiblement à celle de cellules plus prolifératives comme les cellules sanguines. Le corps humain doit ainsi être considéré comme étant une mosaïque de plusieurs populations cellulaires distinctes, possédant un potentiel répliatif différent et présentant donc, des télomères de longueurs variables. De plus, les cellules ne sont pas toutes exposées au même environnement, ce qui pourrait également expliquer la différence de longueurs télomériques.

L'impact des facteurs environnementaux sur la longueur des télomères a été évalué par le groupe de Cristofalo *et al.* qui a observé une variabilité de la longueur des télomères d'un même type cellulaire entre des individus de même âge (Cristofalo, Allen et al. 1998). Par exemple, certains groupes ont révélé que l'exposition aux rayons U.V. du soleil, un agent génotoxique, pouvait accentuer le raccourcissement et l'instabilité télomérique et ainsi accélérer le vieillissement biologique des kératinocytes, des fibroblastes cutanés (Faragher and Kipling 1998). De plus, le faible statut socio-économique (Cherkas, Aviv et al. 2006) ainsi que le stress psychologique (Epel, Blackburn et al. 2004) ont également été associés à une augmentation du raccourcissement des télomères. D'autres ont observé une augmentation du taux de

raccourcissement des télomères dans des leucocytes de patients hypertendus (Jeanclos, Schork et al. 2000), athérosclérotiques (Samani, Boulby et al. 2001; Brouillette, Singh et al. 2003; Fitzpatrick, Kronmal et al. 2007), diabétiques (Jeanclos, Krolewski et al. 1998) et ayant subi un infarctus du myocarde (Jeanclos, Krolewski et al. 1998). Cette accélération du taux de raccourcissement des télomères s'explique possiblement par le fait que chacune de ces conditions cliniques est normalement associée à un environnement inflammatoire. En effet, la réponse immunitaire étant plus sollicitée chez ces patients, ceci engendre une augmentation du taux de réplication des leucocytes menant à un raccourcissement accru des télomères et une apparition prématurée de la sénescence. Toutefois, les cellules endothéliales et musculaires lisses, normalement peu prolifératives, peuvent également effectuer de nombreuses divisions cellulaires à la suite de lésions et autres agressions *in vivo*. Par exemple, l'athérosclérose est un processus inflammatoire caractérisé, entre autres, par une hyperprolifération dite « réparatrice » des cellules musculaires lisses et endothéliales vasculaires au niveau de l'intima, favorisant le développement de plaques d'athérome (Figure 3) (Ross, Wight et al. 1984; Burring 1991). Conséquemment, les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires retrouvées au niveau des plaques athérosclérotiques présentent des télomères plus courts et entrent en sénescence plus rapidement que leurs homologues situés dans des vaisseaux sanguins sains, ne présentant pas de plaques d'athérome (Ross, Wight et al. 1984; Burring 1991; Minamino, Miyauchi et al. 2004). Nous avons également observé cet effet de l'environnement et de l'historique clinique dans les cellules endothéliales provenant de patients athérosclérotiques. En effet, la dissociation entre l'âge chronologique et la longueur initiale des télomères ainsi que la rapidité d'induction de la sénescence

suggère qu'un facteur externe autre que le temps avait affecté les cellules endothéliales vasculaires provenant de patients athérosclérotiques. Toutes ces données confirment donc l'impact de l'environnement au niveau du vieillissement biologique des cellules de l'organisme.

5.1.3. Extrapolation des études de sénescence *in vitro* au vieillissement *in vivo*.

L'extrapolation des études de vieillissement cellulaire *in vitro* aux processus physiopathologiques *in vivo* doit être faite avec soin. En effet, la culture cellulaire permet d'épuiser artificiellement le potentiel répliatif des cellules en provoquant leur division, le raccourcissement de leurs télomères et leur entrée en sénescence. Les cellules effectuent donc plus de divisions cellulaires *in vitro* qu'*in vivo*. De plus, la culture cellulaire utilise des concentrations d'oxygène de l'air ambiant ($\pm 20\%$), concentrations plus élevées qu'*in vivo* (2-5%) (Campisi 2001). En conséquence, les cellules en culture sont exposées à un stress oxydant indépendant du contexte *in vivo*.

Bien que les études de vieillissement *in vitro* ne soient pas parfaites, elles constituent cependant des outils précieux pour comprendre les mécanismes impliqués dans le vieillissement *in vivo*. Le groupe de Mitsui *et al.* a suggéré que les études *in vitro* s'avèrent de bons modèles pour étudier le comportement de la sénescence (précocité, marqueurs, potentiel répliatif), surtout avec l'utilisation de cellules à passage initial, le plus représentatif de ce qui a pu se dérouler *in vivo* (Schneider and Mitsui 1976). Cependant, l'extrapolation des données obtenues par les études *in vitro*

au niveau du vieillissement *in vivo*, doit aussi tenir compte du fait que la sénescence n'est pas strictement répllicative, spécialement chez les humains qui sont exposés à plusieurs agents agressant présents dans leur environnement, tels que le stress oxydant ou les rayons ultra-violet.

5.2. Sénescence et athérosclérose

5.2.1. Caractérisation de la sénescence des cellules endothéliales de patients athérosclérotiques: implications conjointes de la sénescence répllicative et celle induite prématurément par le stress oxydant.

À partir de nos études, nous pouvons affirmer que les facteurs de risque cardiovasculaire, et en particulier l'hypertension, favorisent l'apparition d'une sénescence endothéliale prématurée. En effet, chez des patients athérosclérotiques, le développement de la sénescence de cellules endothéliales vasculaires corrèle avec la durée d'exposition aux facteurs de risque cardiovasculaire plutôt qu'avec l'âge chronologique des donneurs. En conditions physiologiques, la sénescence répllicative est déclenchée par le raccourcissement des télomères survenant à chaque division cellulaire, et cette sénescence peut être complètement abolie par une surexpression de la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT) (Gorbunova, Seluanov et al. 2002; Roy, Nakano et al. 2004). Dans ce cas, un lien direct entre l'âge chronologique et le vieillissement cellulaire est observé. En revanche, dans notre modèle, les cellules endothéliales vasculaires proviennent de donneurs malades. La dissociation entre l'âge chronologique de nos donneurs et la sénescence s'explique donc par l'impact néfaste

de la pathologie (stress oxydant) au niveau de l'intégrité télomérique et de l'induction de la sénescence.

Néanmoins, l'implication des télomères dans le développement de la sénescence des cellules utilisées dans nos études n'est pas à exclure. En effet, nous avons observé qu'en début de culture, représentatif de ce qui a pu se dérouler *in vivo*, la longueur initiale des télomères prédit l'apparition de la sénescence : plus les télomères sont courts, plus la sénescence des cellules endothéliales sera précoce. Cette corrélation suggère que l'environnement pro-inflammatoire associé aux facteurs de risque cardiovasculaire a pu affecter le potentiel réplicatif des cellules *in vivo* et, conséquemment, les prédisposer à une sénescence prématurée.

Nous avons été les premiers à observer qu'une surexpression de la télomérase dans les cellules endothéliales de patients athérosclérotiques, en stabilisant la longueur des télomères, peut ralentir l'apparition de la sénescence, sans toutefois immortaliser les cellules. Bien que la hTERT n'ait pas d'activité antioxydante *per se*, nous avons observé que l'inhibition de la sénescence en présence de hTERT était directement liée à la capacité antioxydante endogène des cellules. L'entrée en sénescence est associée, elle, à l'augmentation des marqueurs de ROS (marqueur de peroxydation lipidique HNE, marqueur de SIPS Cav-1). Par conséquent, l'absence d'immortalisation en présence de hTERT combinée avec la corrélation existant entre l'exposition aux facteurs de risque cardiovasculaire et la sénescence, suggère fortement que la sénescence répliquative n'est pas la seule impliquée, mais que la sénescence induite par le stress oxydant y participe également.

Plusieurs études utilisant des cellules saines exposées à du H₂O₂ exogène, ont montré que la sénescence peut être également induite prématurément par le stress oxydant. Par exemple, l'équipe de von Zglinicki a montré que le stress oxydant pouvait induire la sénescence en fragilisant directement les télomères sans qu'ils aient toutefois atteints leur longueur minimale (von Zglinicki 2002; von Zglinicki and Martin-Ruiz 2005). Parallèlement, d'autres ont révélé que l'exposition au H₂O₂ peut induire une translocation de la hTERT du noyau au cytosol, empêchant ainsi son activité de maintenance des télomères (Haendeler, Hoffmann et al. 2003). De plus, il a également été démontré dans des cellules saines, que l'addition de H₂O₂ exogène empêchait l'immortalisation cellulaire induite par une surexpression de la hTERT (Gorbunova, Seluanov et al. 2002; Roy, Nakano et al. 2004). Finalement, le groupe de Galbiati a suggéré que le stress oxydant pouvait déclencher la sénescence indépendamment de la longueur des télomères, par une activation de la protéine cavéoline-1 (Cav-1) (Galbiati, Volonte et al. 2001; Cho, Ryu et al. 2003). Le rôle du stress oxydant dans la sénescence a aussi été confirmé par l'utilisation de différents molécules antioxydantes, telles que l'aspirine (Bode-Boger, Martens-Lobenhoffer et al. 2005), le NAC, les statines et la vitamine C (Misiti, Nanni et al. 2000; Haendeler, Hoffmann et al. 2004; Bode-Boger, Martens-Lobenhoffer et al. 2005; Ogawa, Nomiya et al. 2006), qui ont permis de ralentir le développement de la sénescence cellulaire. Ainsi, en accord avec le fait que les facteurs de risque cardiovasculaire sont associés à une augmentation des niveaux de stress oxydant (Csiszar, Ungvari et al. 2002), nos études ont révélé une corrélation positive entre les niveaux initiaux d'expression des différents marqueurs de stress oxydant (HNE, Cav-1) et la précocité de l'apparition de la sénescence. Ceci reflète fort probablement l'impact réel de l'historique de la maladie des patients

athérosclérotiques sur le développement de la sénescence cellulaire. L'exposition pendant des années, voire des décennies, aux ROS associés aux facteurs de risque cardiovasculaire endommage les cellules endothéliales. Nous avons observé que le traitement chronique des cellules avec l'antioxydant *N*-acetyl-*L*-cystéine (NAC) a ralenti l'apparition de la sénescence, mais seulement dans un sous-groupe de donneurs. Dans cette sous-population, les cellules endothéliales présentaient des dommages cellulaires réversibles, le NAC a (i) diminué initialement les niveaux de ROS, (ii) délocalisé et activé la hTERT au niveau nucléaire et (iii) stabilisé temporairement l'intégrité des télomères. Ces données concordent avec les travaux de Haendeler *et al.* (Haendeler, Hoffmann et al. 2003; Haendeler, Hoffmann et al. 2004). En revanche, dans nos études, le NAC n'a eu aucun effet dans les cellules présentant des dommages irréversibles. Nos données suggèrent que le NAC n'aurait un impact bénéfique que dans les cellules ayant des télomères initiaux plus longs et des dommages oxydatifs moindres. Ainsi, ce traitement antioxydant, à défaut d'être préventif, est toujours curatif. De la même façon, Gendron *et al.* et Steinberg & Witzum ont montré qu'une thérapie antioxydante pouvait être bénéfique à des stades initiaux d'athérosclérose, mais délétère à des stades plus avancés (Steinberg and Witzum 2002; Gendron 2008).

Finalement, afin de confirmer l'implication des deux voies de la sénescence, les cellules endothéliales d'un même donneur ont été séparées en différents groupes afin d'observer simultanément l'effet du NAC, de la hTERT et de hTERT-NAC (Étude #3, Figure 19). Ceci a permis de visualiser l'influence des profils cliniques de chacun des patients, profils très hétérogènes, sur le comportement des cellules face aux diverses approches pharmacologiques *in vitro*. Un traitement chronique avec l'antioxydant

NAC ralentit l'apparition de la sénescence seulement dans les cellules les moins endommagées *in vivo*; une surexpression de la hTERT permet, quant à elle, de ralentir cette sénescence dans toutes les cellules, appuyant le rôle des télomères dans la sénescence. L'immortalisation cellulaire en présence de hTERT-NAC ne survient que dans les populations cellulaires où le NAC, par lui-même, peut retarder l'apparition de la sénescence. Dans ces cellules, la hTERT permet de stabiliser l'intégrité télomérique et de bloquer la voie de la sénescence répllicative tandis que le NAC empêche l'augmentation de stress oxydant normalement associée à la sénescence. Uniquement dans ces circonstances (hTERT surexprimée, NAC, dommages oxydants réversibles), une immortalisation peut être observée. Les cellules endothéliales ne pouvant être immortalisées par la combinaison de hTERT-NAC ont en revanche subi d'insurmontables dommages oxydants, dépassant un seuil où des traitements cherchant à retarder le vieillissement biologique s'avèrent peu efficaces. L'implication des ROS dans la sénescence est d'autant plus reflétée, par le fait que les cellules présentant une meilleure défense antioxydante endogène, exhibent de plus faibles niveaux de sénescence en début de culture et effectuent plus de divisions cellulaires en présence de hTERT-NAC. Nos résultats corroborent ceux de Kurz *et al.* liant l'activité antioxydante de la glutathione de cellules HUVECs, à l'efficacité de la hTERT à maintenir l'intégrité des télomères et à retarder l'apparition de la sénescence (Kurz, Decary et al. 2004).

Nos études révèlent donc que, dans des cellules endothéliales vasculaires provenant de patients athérosclérotiques, la sénescence est prématurée et possède à la fois des composantes de la sénescence répllicative et induite par le stress oxydant.

5.2.2. Rôle de la sénescence de cellules endothéliales vasculaires dans le développement de l'athérosclérose

Plusieurs groupes ont observé une diminution du nombre et du potentiel thérapeutique des cellules endothéliales progénitrices circulantes chez des patients athérosclérotiques (Imanishi, Moriwaki et al. 2005; Fadini, Sartore et al. 2006; Michaud, Dussault et al. 2006). Il est plausible que ces diminutions soient attribuées aux facteurs de risque cardiovasculaire et reflètent une dysfonction de l'endothélium vasculaire. Plusieurs études révèlent que le vieillissement vasculaire et les facteurs de risque sont associés à une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium et une hypersensibilité aux agents vasoconstricteurs (Marin 1995; Heitzer, Just et al. 1996; Barua, Ambrose et al. 2001; Lakatta 2002; Ambrose and Barua 2004; Brandes, Fleming et al. 2005). Une méthode non-invasive afin d'étudier la fonction endothéliale *in vivo*, est d'observer la vasodilatation de l'artère brachiale par Doppler (*Flow-Associated Dilatation*) (Celermajer, Sorensen et al. 1992). Toutefois, les patients utilisés dans nos études n'ont pas été soumis à ce type d'examen. Nous n'avons pas non plus effectué des tests de vasoréactivité afin de pouvoir observer *ex vivo*, si la sénescence prématurée des cellules endothéliales d'hIMA était associée à une dysfonction endothéliale. Cependant, il a été décrit que les artères mammaires internes (hIMA) provenant de patients coronariens présentent une dysfonction vasomotrice comparativement aux hIMA provenant de sujets non coronariens (Erbs, Mobius-Winkler et al. 2006; Marx, Jax et al. 2006). Bien que ces artères soient dépourvues de plaques d'athérome et, par le fait même, utilisées lors de pontages coronariens, ces

études suggèrent que les artères mammaires internes ne sont pas parfaitement saines, pouvant même prédire le développement éventuel d'athérosclérose. Cependant, elles s'avèrent tout de même de bons compromis afin de remplacer les artères coronaires sclérosées. Dans nos études, nous avons analysé le profil d'expression de certains gènes impliqués dans une fonction endothéliale dite « saine ». Les niveaux de COX-1, l'isoforme constitutive de la cyclooxygénase, sont significativement inférieurs à ceux retrouvés dans les cellules endothéliales d'aorte de donneurs sains (hAoEC) et ces niveaux diminuent avec la sénescence. Considérant que, dans des conditions physiologiques, la COX-1 est responsable de la production de PGI₂, un vasodilatateur important, sa diminution avec la sénescence laisse présager une réduction de la fonction vasorelaxante de l'endothélium vasculaire (Vane and Botting 1994; Flavahan and Vanhoutte 1995). À l'inverse, nous avons observé que les niveaux d'expression génique de l'isoforme inductible de la cyclooxygénase (COX-2) sont augmentés avec la sénescence, et ces niveaux sont supérieurs à ceux des hAoEC, suggérant fortement le développement d'un environnement pro-inflammatoire et pro-oxydatif (Feng, Xia et al. 1995). Parallèlement, les niveaux d'expression du gène de l'isoforme endothéliale de la NO synthase (eNOS) sont virtuellement absents, 10 000 fois inférieurs à ceux quantifiés dans des hAoEC de patients sains, confirmant les résultats d'autres groupes (Sato, Morita et al. 1993; Minamino, Miyauchi et al. 2004). Considérant les effets anti-athérogéniques du NO, on peut présumer que la sénescence prématurée des cellules endothéliales vasculaires observée dans nos études, puisse mener à une dysfonction endothéliale et favoriser le développement d'un environnement pro-athérogénique.

Les artères coronaires sont plus susceptibles à développer de l'athérosclérose car, en plus d'être exposées aux médiateurs circulants dans le sang, elles sont soumises à des contraintes mécaniques et un flux sanguin turbulent. À l'inverse, les artères mammaires utilisées dans nos études sont dépourvues de plaques d'athérome. Toutefois, l'observation de marqueurs de sénescence prématurée dans ces cellules endothéliales initialement en culture et la corrélation entre la précocité de la sénescence et l'exposition aux facteurs de risque cardiovasculaire confirment que le stress oxydant et autres médiateurs chimiques associés aux facteurs de risque peuvent toucher l'ensemble de l'arbre vasculaire de l'organisme (Puga 1995). Comme ces artères (hIMA) provenant de patients athérosclérotiques présentent déjà des signes de dysfonction endothéliale (Erbs, Mobius-Winkler et al. 2006; Marx, Jax et al. 2006), il est logique de spéculer que, si les artères mammaires internes exposées aux facteurs de risque étaient aussi soumises aux mêmes contraintes mécaniques que les artères coronaires, elles développeraient probablement des plaques athérosclérotiques.

Parmi les facteurs de risque cardiovasculaire, l'hypertension s'est avérée déterminante dans nos études. En effet, les études multivariées ont révélé que l'hypertension accélère le raccourcissement des télomères, diminue le potentiel répliatif des cellules et accélère l'apparition de la sénescence, ce qui concorde avec les résultats du groupe d'Aviv (Benetos, Okuda et al. 2001). À l'inverse, les études multivariées ont révélé que le tabagisme augmente le potentiel répliatif des cellules. Ceci pourrait être causé par les effets mutagènes et carcinogènes de la fumée de cigarette qui augmenteraient le nombre de divisions « réparatrices » des cellules endothéliales, comme observé chez des fumeurs présentant un emphysème pulmonaire

(Tsuji, Nakamura et al. 2004; Yokohori, Aoshiba et al. 2004). La fumée de cigarette étant le facteur de risque produisant le plus de ROS, les télomères semblent *a priori*, jouer un rôle mineur dans le vieillissement endothélial alors que la sénescence induite par le stress oxydant semble prédominer dans les cellules de ces patients. Considérant les changements fonctionnels normalement associés avec la sénescence, nos résultats suggèrent donc que la précocité de la sénescence de l'endothélium vasculaire induite par l'exposition aux facteurs de risque cardiovasculaire pourrait favoriser le développement d'un environnement pro-athérosclérotique.

5.3. Limitations

Bien que nos études apportent des explications concernant le développement de la sénescence endothéliale en conditions pathologiques, elles présentent certaines limitations. Par exemple, l'utilisation de cellules primaires provenant de patients athérosclérotiques ayant des profils cliniques très hétérogènes complique les analyses statistiques. En effet, dans ces conditions, il est probable que notre faible échantillonnage (Étude #1, n=58; #2, n=26; #3, n=11; #4, n=46) puisse expliquer pourquoi certains paramètres n'ont pas été statistiquement significatifs et présentaient parfois seulement des tendances (e.g. raccourcissement des télomères dans l'étude #3). De plus, les patients de cette investigation n'étaient pas seulement fumeurs ou non-fumeurs, hypertendus ou non hypertendus, mais présentaient une combinaison de plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire. Nous devons donc considérer la possibilité que certaines de nos observations puissent être associées à d'autres facteurs de risque et, à l'inverse, que certains effets puissent être masqués par ces mêmes

facteurs. Conséquemment, ce faible « n » jumelé avec les profils cliniques variés peut expliquer pourquoi nous avons eu des difficultés à discriminer l'implication des facteurs de risque cardiovasculaire dans les réponses des populations cellulaires au NAC (étude #2; sénescence retardée ou non affectée) et à hTERT-NAC (étude #3; sénescence retardée ou immortalisation). Cependant, malgré notre échantillonnage limité, plusieurs corrélations en accord avec la littérature scientifique, ont été observées dans nos études, démystifiant ainsi un peu plus les mécanismes du vieillissement vasculaire dans des conditions pro-athérogéniques.

Par ailleurs, afin de comparer un lit vasculaire développant des plaques athérosclérotiques (artères coronaires) à un lit vasculaire moins susceptible, certains groupes ont utilisé comme contrôles négatifs des artères mammaires internes humaines (hIMA) (Minamino and Komuro 2002; Minamino, Miyauchi et al. 2002). Nous avons également utilisé les hIMA dans nos études mais nous les considérons comme « pathologiques » car elles ont été exposées aux facteurs de risque cardiovasculaire dans la circulation sanguine (Puga 1995). Une autre limitation de nos études réside donc dans l'absence de contrôles « sains ». Il est difficile dans ce type d'étude, de prélever des artères mammaires internes provenant d'individus sains, tout comme il est difficile, voire impossible, de considérer que des sujets humains, même jeunes, puissent être parfaitement sains. Nous nous sommes donc procurés commercialement des cellules endothéliales d'aortes (hAoEC) prélevées sur des individus considérés comme sains, étant décédés de façon accidentelle. Dans l'étude #1, nous avons observé le profil d'expression de certains gènes favorables à une bonne fonction endothéliale. Les résultats très différents entre les hAoEC et les hIMA (forte expression de eNOS,

faible expression de COX-2 pro-inflammatoire dans les hAoEC) confirment que les cellules endothéliales provenant d'aortes d'individus sains s'avèrent un bon compromis comme contrôles internes.

De plus, certains marqueurs de vieillissement cellulaire ont été critiqués. Par exemple, la validité de la quantification de la sénescence par la détection cytochimique de l'activité de la β -galactosidase à pH 6.0 a été remise en question par le groupe de Severino *et al.* avançant que ce marquage pouvait détecter des « faux positifs », comme certains types cellulaires non sénescents (phagocytes, follicules pileux et des cellules sécrétrices) (Severino, Allen et al. 2000). Cependant, l'isolation des cellules endothéliales *in vitro* et leur caractérisation a permis d'éviter ces faux positifs.

Il a été rapporté qu'un seul télomère ayant atteint la longueur minimale est suffisant pour déclencher la sénescence répllicative (Lansdorp, Verwoerd et al. 1996). Ainsi, différents groupes ont tenté de peaufiner les techniques de mesure de la longueur des télomères de chacun des chromosomes d'une cellule (Lansdorp, Verwoerd et al. 1996; McNeil and Ried 2000; Lin and Yan 2005) plutôt que la longueur moyenne de tous les chromosomes d'une population entière de cellules, méthode utilisée dans nos études. Cependant, considérant que (1) toutes les cellules de nos études ont été exposées au stress oxydant, que (2) les ROS affectent les télomères de tous les chromosomes et que (3) la sénescence de ces cellules n'est pas exclusivement causée par le raccourcissement des télomères mais également par le stress oxydant, nous croyons que la longueur moyenne des télomères s'avère un marqueur de sénescence

efficace et suffisant dans le cadre de nos études, spécialement lorsqu'utilisé en combinaison avec d'autres marqueurs tels que la SA- β -Gal. Ces arguments sont appuyés par l'observation que la longueur initiale des télomères, même moyenne, corrèle avec la rapidité de l'apparition de la sénescence chez tous les patients, excepté chez les fumeurs, où la sénescence est principalement induite par les ROS.

Finalement, nos études ont permis de révéler certains paramètres impliqués dans la sénescence pouvant prédire le type de réponse à divers traitements (NAC, hTERT). Nous avons par exemple développé une technique permettant de quantifier *in vitro*, la capacité antioxydante endogène des cellules endothéliales. Ce paramètre s'est avéré un outil précieux dans nos investigations. Il a permis d'identifier les cellules les plus résistantes au stress oxydant comme étant celles pouvant répondre le mieux à différents traitements cherchant à ralentir le vieillissement prématuré. Mais il aurait été intéressant de caractériser plus précisément les enzymes responsables de cette défense antioxydante. Quel(s) rôle(s) jouent la glutathione peroxydase, la superoxyde dismutase, la catalase et autres antioxydants endogènes dans la sénescence des cellules utilisées dans nos différentes études? Quelles molécules sont associées à une diminution de la capacité antioxydante observée chez les patients fumeurs (études #4)?

5.4. Perspectives

Dans nos travaux, trois molécules impliquées dans la défense antioxydante endogène ont particulièrement attiré notre attention et pourraient être étudiées dans des projets futurs.

Premièrement, nous avons utilisé la cavéoline-1 (Cav-1) comme marqueur de la SIPS. La Cav-1 est une protéine retrouvée dans les caveolae normalement impliquée dans le transport membranaire du cholestérol et qui peut également jouer un rôle dans l'induction de la SIPS. Il a été également suggéré que la Cav-1 serait impliquée dans la voie mitogénique de ERK $\frac{1}{2}$ et qu'elle interagirait avec certaines sous-unités de la NADPH oxydase (Cho, Ryu et al. 2003; Iwasa, Han et al. 2003; Peterson, Guicciardi et al. 2003; Fujita, Maruyama et al. 2004). Elle jouerait un rôle de chef d'orchestre, aiguillant les cellules dans un phénotype prolifératif ou vers la sénescence et l'apoptose. Considérant l'implication de ces molécules (ERK $\frac{1}{2}$, NADPH oxydase) dans certaines pathologies telles que l'hypertension et le tabagisme, il serait intéressant d'étudier plus précisément la contribution de la cavéoline-1 dans le développement de l'athérosclérose.

Deuxièmement, nous avons observé dans l'étude #4, de plus hauts niveaux d'angiopoïétine-like 2 (Angptl2) dans les cellules provenant de fumeurs. L'angptl2 est un nouveau facteur de croissance récemment identifié, dont les fonctions ne sont pas encore clairement élucidées. Elle serait impliquée dans la néovasculogénèse retrouvée dans le diabète ainsi que dans l'inflammation de l'endothélium vasculaire (Sun, Zheng et al. 2007). Son activité serait liée à la voie de la PI3K/Akt (Morisada, Kubota et al. 2006). Son expression génique élevée dans les cellules de fumeurs corrélant avec celles de Akt et du facteur de croissance VEGF-A pourrait expliquer le potentiel réplicatif augmenté des cellules de fumeurs par rapport aux cellules provenant de non-fumeurs (Etude #4). Ainsi, l'angiopoïétine-like 2 pourrait jouer un rôle de premier plan dans

l'athérogénèse, spécialement chez les fumeurs. Sa contribution directe demeure toutefois à être clarifiée.

Finalement, nous avons observé dans la troisième étude un rôle potentiel du gène de la sirtuine-1 (silencing information regulator) dans l'effet bénéfique de hTERT-NAC de cellules exposées *in vivo* au stress oxydant: les cellules immortalisées présentent des niveaux initiaux de sirtuine-1 plus élevés que celles répondant par une sénescence retardée. Cette protéine est une histone déacétylase impliquée dans différents processus promouvant la longévité (Michan and Sinclair 2007). Il a été suggéré que la sirtuine-1 jouerait un rôle dans la détoxification de ROS (Michan and Sinclair 2007), la réparation de l'ADN (Brunet, Sweeney et al. 2004), la déacétylation et répression de p53, pouvant ainsi ralentir l'apparition de la sénescence (Langley, Pearson et al. 2002). De plus, il a été rapporté que les produits réactifs dérivés de la fumée de cigarette diminuaient les niveaux de sirtuine-1 de cellules immunitaires et pulmonaires de patients fumeurs présentant une obstruction pulmonaire chronique (Rajendrasozhan, Yang et al. 2008). Ceci confirmerait nos résultats décrivant qu'aucune population cellulaire provenant de patients fumeurs ne présentait ni un décalage dans la sénescence en présence de NAC, ni une immortalisation en présence de hTERT-NAC. Cependant, comme les mécanismes moléculaires exacts de la sirtuine-1 ne sont pas encore bien élucidés et que notre étude n'a révélé qu'une corrélation statistique entre le niveau de sirtuine-1 et la réponse aux traitements hTERT-NAC, d'autres études sont nécessaires afin d'identifier plus précisément le rôle de la sirtuine-1 dans la sénescence de cellules provenant de patients athérosclérotiques.

6. Conclusions

Notre modèle expérimental utilisait des cellules endothéliales d'hIMA isolées chez des patients athérosclérotiques, exposés aux facteurs de risque cardiovasculaire. Considérant que la biologie des télomères et du stress oxydant diffère largement entre les modèles de rongeurs et les humains, notre modèle avait l'avantage de pouvoir étudier directement la mécanistique orchestrant la sénescence endothéliale dans des conditions pathologiques réelles. Nos études révèlent que, chez des patients athérosclérotiques, le vieillissement biologique des cellules endothéliales vasculaires se dissocie du vieillissement chronologique des individus. De plus, l'exposition aux facteurs de risque cardiovasculaire favorise le développement d'une sénescence prématurée possédant à la fois des composantes de la sénescence répllicative et de celle induite par le stress oxydant. Ceci pourrait favoriser l'apparition d'une dysfonction accélérée de l'endothélium vasculaire et ainsi, le développement d'un environnement pro-athérogénique.

Par la suite, nous avons également cherché à ralentir l'apparition de la sénescence endothéliale prématurée par divers traitements. Les réponses dichotomiques aux différents traitements (antioxydant, surexpression de la hTERT) constituent la première démonstration que l'exposition *in vivo* à des niveaux élevés de stress oxydant associé aux facteurs de risque cardiovasculaire, peut induire des dommages cellulaires et moléculaires irréversibles. L'absence de décalage de la sénescence en présence de NAC dans une sous-population cellulaire et l'incapacité de la hTERT à immortaliser à elle seule des cellules de patients athérosclérotiques,

démontrent que ces dernières ont accumulé trop de dommages, dépassant probablement un certain seuil au-dessus duquel une thérapie s'avère inefficace. Ainsi, les travaux de ma thèse convergent vers un concept déjà bien établi : mieux vaut prévenir... qu'essayer de guérir!

7. Bibliographie

- Agard, D. A., Y. Hiraoka, et al. (1989). "Fluorescence microscopy in three dimensions." Methods Cell Biol **30**: 353-77.
- Agrotis, A., J. Saltis, et al. (1995). "Transforming growth factor-beta 1 and the development of vascular hypertrophy in hypertension." Blood Press Suppl **2**: 43-8.
- Agrotis, A., M. Samuel, et al. (1996). "Vascular smooth muscle cells express multiple type I receptors for TGF-beta, activin, and bone morphogenetic proteins." Biochem Biophys Res Commun **219**(2): 613-8.
- Albelda, S. M., C. W. Smith, et al. (1994). "Adhesion molecules and inflammatory injury." Faseb J **8**(8): 504-12.
- Alcendor, R. R., S. Gao, et al. (2007). "Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart." Circ Res **100**(10): 1512-21.
- Alcorta, D. A., Y. Xiong, et al. (1996). "Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13742-7.
- Allsopp, R. C., E. Chang, et al. (1995). "Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo." Exp Cell Res **220**(1): 194-200.
- Ambrose, J. A. and R. S. Barua (2004). "The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update." J Am Coll Cardiol **43**(10): 1731-7.
- Amorino, G. P. and R. L. Hoover (1998). "Interactions of monocytic cells with human endothelial cells stimulate monocytic metalloproteinase production." Am J Pathol **152**(1): 199-207.

- Andressoo, J. O. and J. H. Hoeijmakers (2005). "Transcription-coupled repair and premature ageing." Mutat Res **577**(1-2): 179-94.
- Anversa, P., T. Palackal, et al. (1990). "Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart." Circ Res **67**(4): 871-85.
- Arroyo, M. and P. Raychaudhuri (1992). "Retinoblastoma-repression of E2F-dependent transcription depends on the ability of the retinoblastoma protein to interact with E2F and is abrogated by the adenovirus E1A oncoprotein." Nucleic Acids Res **20**(22): 5947-54.
- Aruoma, O. I., B. Halliwell, et al. (1989). "The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid." Free Radic Biol Med **6**(6): 593-7.
- Asahara, T., T. Murohara, et al. (1997). "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis." Science **275**(5302): 964-7.
- Asami, S., H. Manabe, et al. (1997). "Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung." Carcinogenesis **18**(9): 1763-6.
- Aso, Y., T. Inukai, et al. (2000). "Serum concentrations of advanced glycation endproducts are associated with the development of atherosclerosis as well as diabetic microangiopathy in patients with type 2 diabetes." Acta Diabetol **37**(2): 87-92.
- Assmus, B., C. Urbich, et al. (2003). "HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes." Circ Res **92**(9): 1049-55.

- Autexier, C. and N. F. Lue (2006). "The Structure and Function of Telomerase Reverse Transcriptase." Annu Rev Biochem.
- Bagui, T. K., S. Mohapatra, et al. (2003). "P27Kip1 and p21Cip1 are not required for the formation of active D cyclin-cdk4 complexes." Mol Cell Biol **23**(20): 7285-90.
- Bajorath, J., W. Hinrichs, et al. (1988). "The enzymatic activity of proteinase K is controlled by calcium." Eur J Biochem **176**(2): 441-7.
- Baker, G. T., 3rd and R. L. Sprott (1988). "Biomarkers of aging." Exp Gerontol **23**(4-5): 223-39.
- Baldwin, A. S., Jr. (1996). "The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights." Annu Rev Immunol **14**: 649-83.
- Banki, K., E. Hutter, et al. (1999). "Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling." J Immunol **162**(3): 1466-79.
- Barlow, R. S., A. M. El-Mowafy, et al. (2000). "H₂O₂ opens BK(Ca) channels via the PLA₂-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle." Am J Physiol Heart Circ Physiol **279**(2): H475-83.
- Barnes, P. J. and M. Karin (1997). "Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases." N Engl J Med **336**(15): 1066-71.
- Barnett, Y. A. and C. M. King (1995). "An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans." Mutat Res **338**(1-6): 115-28.

- Barrett-Connor, E., K. T. Khaw, et al. (1986). "A prospective study of dehydroepiandrosterone sulfate, mortality, and cardiovascular disease." N Engl J Med **315**(24): 1519-24.
- Barth, H. and V. Kinzel (1995). "Epidermal growth factor rapidly impairs activation of p34cdc2 protein kinase in HeLa cells at the G2-M boundary." J Cell Physiol **162**(1): 44-51.
- Barua, R., J. Ambrose, et al. (2002). "Heavy and light cigarette smokers have similar dysfunction of endothelial vasoregulatory activity: an in vivo and in vitro correlation." J Am Coll Cardiol. **39**(11): 1758-63.
- Barua, R. S., J. A. Ambrose, et al. (2001). "Dysfunctional endothelial nitric oxide biosynthesis in healthy smokers with impaired endothelium-dependent vasodilatation." Circulation **104**(16): 1905-10.
- Barua, R. S., J. A. Ambrose, et al. (2003). "Reactive oxygen species are involved in smoking-induced dysfunction of nitric oxide biosynthesis and upregulation of endothelial nitric oxide synthase: an in vitro demonstration in human coronary artery endothelial cells." Circulation **107**(18): 2342-7.
- Beckman, K. B. and B. N. Ames (1998). "The free radical theory of aging matures." Physiol Rev **78**(2): 547-81.
- Bekaert, S., I. Van Pottelbergh, et al. (2005). "Telomere length versus hormonal and bone mineral status in healthy elderly men." Mech Ageing Dev **126**(10): 1115-22.
- Ben-Porath, I. and R. Weinberg (2004). "When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence." J Clin Invest. **113**(1): 8-13.

- Ben-Porath, I. and R. Weinberg (2005). "The signals and pathways activating cellular senescence." Int J Biochem Cell Biol **37**(5): 961-76.
- Benetos, A., K. Okuda, et al. (2001). "Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity." Hypertension **37**(2 Part 2): 381-5.
- Bennett, C. B., A. L. Lewis, et al. (1993). "Lethality induced by a single site-specific double-strand break in a dispensable yeast plasmid." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(12): 5613-7.
- Bennett, M. R., K. Macdonald, et al. (1998). "Cooperative interactions between RB and p53 regulate cell proliferation, cell senescence, and apoptosis in human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques." Circ Res **82**(6): 704-12.
- Berendji-Grun, D., V. Kolb-Bachofen, et al. (2001). "Nitric oxide inhibits endothelial IL-1[beta]-induced ICAM-1 gene expression at the transcriptional level decreasing Sp1 and AP-1 activity." Mol Med **7**(11): 748-54.
- Bermudez, E. A., N. Rifai, et al. (2002). "Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women." Am J Cardiol **89**(9): 1117-9.
- Bierhaus, A., S. Schiekofe, et al. (2001). "Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB." Diabetes **50**(12): 2792-808.
- Bischoff, C., J. Graakjaer, et al. (2005). "The heritability of telomere length among the elderly and oldest-old." Twin Res Hum Genet **8**(5): 433-9.
- Blackburn, E. H. (2000). "Telomeres and telomerase." Keio J Med **49**(2): 59-65.
- Blann, A. and C. McCollum (1993). "Adverse influence of cigarette smoking on the endothelium." Thromb Haemost **70**(4): 707-11.

- Blasco, M. A. (2002). "Telomerase beyond telomeres." Nat Rev Cancer **2**(8): 627-33.
- Blasco, M. A. (2005). "Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond." Nat Rev Genet **6**(8): 611-22.
- Bobik, A. (2006). "Transforming growth factor-betas and vascular disorders." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(8): 1712-20.
- Bocan, T. M., T. A. Schifani, et al. (1986). "Ultrastructure of the human aortic fibrolipid lesion. Formation of the atherosclerotic lipid-rich core." Am J Pathol **123**(3): 413-24.
- Bode-Boger, S. M., J. Martens-Lobenhoffer, et al. (2005). "Aspirin reduces endothelial cell senescence." Biochem Biophys Res Commun **334**(4): 1226-32.
- Bodnar, A. G., M. Ouellette, et al. (1998). "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells." Science **279**(5349): 349-52.
- Bottazzi, M. E., X. Zhu, et al. (1999). "Regulation of p21(cip1) expression by growth factors and the extracellular matrix reveals a role for transient ERK activity in G1 phase." J Cell Biol **146**(6): 1255-64.
- Brandes, R. P., I. Fleming, et al. (2005). "Endothelial aging." Cardiovasc Res **66**(2): 286-94.
- Bringold, F. and M. Serrano (2000). "Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence." Exp Gerontol **35**(3): 317-29.
- Broccoli, D., J. W. Young, et al. (1995). "Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9082-6.
- Brookes, S., J. Rowe, et al. (2004). "Contribution of p16(INK4a) to replicative senescence of human fibroblasts." Exp Cell Res **298**(2): 549-59.

- Brouillette, S., R. K. Singh, et al. (2003). "White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(5): 842-6.
- Brouillette, S. W., J. S. Moore, et al. (2007). "Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study." Lancet **369**(9556): 107-14.
- Brown, J. P., W. Wei, et al. (1997). "Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts." Science **277**(5327): 831-4.
- Brunet, A., L. B. Sweeney, et al. (2004). "Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase." Science **303**(5666): 2011-5.
- Bruunsgaard, H. and B. K. Pedersen (2003). "Age-related inflammatory cytokines and disease." Immunol Allergy Clin North Am **23**(1): 15-39.
- Bryan, N. S., T. Rassaf, et al. (2004). "Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: an insight into their nature and kinetics in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(12): 4308-13.
- Burfeind, W. R., Jr., D. D. Glower, et al. (2004). "Single versus multiple internal mammary artery grafting for coronary artery bypass: 15-year follow-up of a clinical practice trial." Circulation **110**(11 Suppl 1): II27-35.
- Burrig, K. F. (1991). "The endothelium of advanced arteriosclerotic plaques in humans." Arterioscler Thromb **11**(6): 1678-89.
- Cadenas, E. (1997). "Basic mechanisms of antioxidant activity." Biofactors **6**(4): 391-7.
- Cadenas, E. and K. J. Davies (2000). "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging." Free Radic Biol Med **29**(3-4): 222-30.

- Cadenas, E. and H. Sies (1998). "The lag phase." Free Radic Res **28**(6): 601-9.
- Calatayud, S., D. Barrachina, et al. (2001). "Nitric oxide: relation to integrity, injury, and healing of the gastric mucosa." Microsc Res Tech **53**(5): 325-35.
- Calles-Escandon, J. and M. Cipolla (2001). "Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective." Endocr Rev **22**(1): 36-52.
- Campbell, J. H. and G. R. Campbell (1986). "Endothelial cell influences on vascular smooth muscle phenotype." Annu Rev Physiol **48**: 295-306.
- Campisi, J. (1996). "Replicative senescence: an old lives' tale?" Cell **84**(4): 497-500.
- Campisi, J. (1998). "The role of cellular senescence in skin aging." J Investig Dermatol Symp Proc **3**(1): 1-5.
- Campisi, J. (2000). "Cancer, aging and cellular senescence." In Vivo **14**(1): 183-8.
- Campisi, J. (2001). "From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture?" Exp Gerontol **36**(4-6): 607-18.
- Campisi, J. (2005). "Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors." Cell **120**(4): 513-22.
- Casino, P. R., C. M. Kilcoyne, et al. (1995). "Impaired endothelium-dependent vascular relaxation in patients with hypercholesterolemia extends beyond the muscarinic receptor." Am J Cardiol **75**(1): 40-4.
- Cawthon, R. M., K. R. Smith, et al. (2003). "Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older." Lancet **361**(9355): 393-5.
- Celermajer, D. S., M. R. Adams, et al. (1996). "Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults." N Engl J Med **334**(3): 150-4.

- Celermajer, D. S., K. E. Sorensen, et al. (1992). "Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis." Lancet **340**(8828): 1111-5.
- Chadeneau, C., P. Siegel, et al. (1995). "Telomerase activity in normal and malignant murine tissues." Oncogene **11**(5): 893-8.
- Chaudiere, J. and R. Ferrari-Iliou (1999). "Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms." Food Chem Toxicol **37**(9-10): 949-62.
- Chen, D., K. G. Daniel, et al. (2004). "Green tea and tea polyphenols in cancer prevention." Front Biosci **9**: 2618-31.
- Chen, H., C. Wu, et al. (2004). "Urinary excretion of 3,N4-etheno-2'-deoxycytidine in humans as a biomarker of oxidative stress: association with cigarette smoking." Chem Res Toxicol **17**(7): 896-903.
- Chen, J. and M. S. Goligorsky (2006). "Premature senescence of endothelial cells: Methusaleh's dilemma." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(5): H1729-39.
- Chen, J. H., S. E. Ozanne, et al. (2007). "Methods of cellular senescence induction using oxidative stress." Methods Mol Biol **371**: 179-89.
- Chen, L., L. Liu, et al. (2008). "Hydrogen peroxide-induced neuronal apoptosis is associated with inhibition of protein phosphatase 2A and 5, leading to activation of MAPK pathway." Int J Biochem Cell Biol.
- Chen, M., T. Masaki, et al. (2002). "LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis." Pharmacol Ther **95**(1): 89-100.

- Chen, Q. M., J. Liu, et al. (2000). "Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H₂O₂ response of normal human fibroblasts." Biochem J **347**(Pt 2): 543-51.
- Cho, K. A. and S. C. Park (2005). "Caveolin-1 as a prime modulator of aging: a new modality for phenotypic restoration?" Mech Ageing Dev **126**(1): 105-10.
- Cho, K. A., S. J. Ryu, et al. (2003). "Senescent phenotype can be reversed by reduction of caveolin status." J Biol Chem **278**(30): 27789-95.
- Christian, C. B., Jr., J. W. Mack, et al. (1985). "Current status of coronary artery bypass grafting for coronary artery atherosclerosis." Surg Clin North Am **65**(3): 509-26.
- Chua, K. F., R. Mostoslavsky, et al. (2005). "Mammalian SIRT1 limits replicative life span in response to chronic genotoxic stress." Cell Metab **2**(1): 67-76.
- Cleaver, J. E., R. Rose, et al. (1990). "Replication of chromosomal and episomal DNA in X-ray-damaged human cells: a cis- or trans-acting mechanism?" Radiat Res **124**(3): 294-9.
- Cohen, R. A. (1995). "The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease." Prog Cardiovasc Dis **38**(2): 105-28.
- Colavitti, R. and T. Finkel (2005). "Reactive oxygen species as mediators of cellular senescence." IUBMB Life **57**(4-5): 277-81.
- Collado, M. and M. Serrano (2006). "The power and the promise of oncogene-induced senescence markers." Nat Rev Cancer **6**(6): 472-6.
- Conchello, J. A. (1998). "Superresolution and convergence properties of the expectation-maximization algorithm for maximum-likelihood deconvolution of incoherent images." J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis **15**(10): 2609-19.

- Condorelli, G., U. Borello, et al. (2001). "Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10733-8.
- Conklin, B. S., W. Zhao, et al. (2002). "Nicotine and cotinine up-regulate vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells." Am J Pathol **160**(2): 413-8.
- Corpas, E., S. M. Harman, et al. (1993). "Human growth hormone and human aging." Endocr Rev **14**(1): 20-39.
- Craig, W. Y., G. E. Palomaki, et al. (1989). "Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data." Bmj **298**(6676): 784-8.
- Cristofalo, V. J., R. G. Allen, et al. (1998). "Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(18): 10614-9.
- Croce, K. and P. Libby (2007). "Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis." Curr Opin Hematol **14**(1): 55-61.
- Cross, S. M., C. A. Sanchez, et al. (1995). "A p53-dependent mouse spindle checkpoint." Science **267**(5202): 1353-6.
- Csiszar, A., Z. Ungvari, et al. (2002). "Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function." Circ Res **90**(11): 1159-66.
- Cybulsky, M. I. and M. A. Gimbrone, Jr. (1991). "Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis." Science **251**(4995): 788-91.

- d'Adda di Fagagna, F., P. M. Reaper, et al. (2003). "A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence." Nature **426**(6963): 194-8.
- D'Archivio, M., C. Filesi, et al. (2007). "Polyphenols, dietary sources and bioavailability." Ann Ist Super Sanita **43**(4): 348-61.
- Dalle-Donne, I., A. Scaloni, et al. (2005). "Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics." Mass Spectrom Rev **24**(1): 55-99.
- Dandona, P., H. Ghanim, et al. (2007). "Antioxidant activity of carvedilol in cardiovascular disease." J Hypertens **25**(4): 731-41.
- Dannenberg, J. H., A. van Rossum, et al. (2000). "Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions." Genes Dev **14**(23): 3051-64.
- Davies, P. F., A. Remuzzi, et al. (1986). "Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(7): 2114-7.
- Davignon, J., R. F. Jacob, et al. (2004). "The antioxidant effects of statins." Coron Artery Dis **15**(5): 251-8.
- de Champlain, J., R. Wu, et al. (2004). "Oxidative stress in hypertension." Clin Exp Hypertens **26**(7-8): 593-601.
- de Lange, T. (2004). "T-loops and the origin of telomeres." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(4): 323-9.
- de Lange, T. (2005). "Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres." Genes Dev **19**(18): 2100-10.
- De Sandre-Giovannoli, A., R. Bernard, et al. (2003). "Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria." Science **300**(5628): 2055.

- Decoursey, T. E. and E. Ligeti (2005). "Regulation and termination of NADPH oxidase activity." Cell Mol Life Sci **62**(19-20): 2173-93.
- DeGroot, J., N. Verzijl, et al. (2004). "Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis." Arthritis Rheum **50**(4): 1207-15.
- DelaTorre, A., R. A. Schroeder, et al. (1997). "Alteration of NF-kappa B p50 DNA binding kinetics by S-nitrosylation." Biochem Biophys Res Commun **238**(3): 703-6.
- Delbosc, S., M. Morena, et al. (2002). "Statins, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, are able to reduce superoxide anion production by NADPH oxidase in THP-1-derived monocytes." J Cardiovasc Pharmacol **40**(4): 611-7.
- DeMeester, S. L., Y. Qiu, et al. (1998). "Nitric oxide inhibits stress-induced endothelial cell apoptosis." Crit Care Med **26**(9): 1500-9.
- Dernbach, E., C. Urbich, et al. (2004). "Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress." Blood **104**(12): 3591-7.
- DeSouza, C. A., L. F. Shapiro, et al. (2000). "Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men." Circulation **102**(12): 1351-7.
- Devault, A., J. C. Cavadore, et al. (1991). "Concerted roles of cyclin A, cdc25+ mitotic inducer, and type 2A phosphatase in activating the cyclin B/cdc2 protein kinase at the G2/M phase transition." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **56**: 503-13.

- Di Leonardo, A., S. H. Khan, et al. (1997). "DNA rereplication in the presence of mitotic spindle inhibitors in human and mouse fibroblasts lacking either p53 or pRb function." Cancer Res **57**(6): 1013-9.
- Dietrich, M., G. Block, et al. (2002). "Antioxidant supplementation decreases lipid peroxidation biomarker F(2)-isoprostanes in plasma of smokers." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **11**(1): 7-13.
- Dimri, G., X. Lee, et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9363-7.
- Dinerman, J. L., C. J. Lowenstein, et al. (1993). "Molecular mechanisms of nitric oxide regulation. Potential relevance to cardiovascular disease." Circ Res **73**(2): 217-22.
- Dirac, A. M. and R. Bernards (2003). "Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53." J Biol Chem **278**(14): 11731-4.
- Dokal, I. (2000). "Dyskeratosis congenita in all its forms." Br J Haematol **110**(4): 768-79.
- Dolado, I., A. Swat, et al. (2007). "p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis." Cancer Cell **11**(2): 191-205.
- Doll, R., R. Peto, et al. (2005). "Mortality from cancer in relation to smoking: 50 years observations on British doctors." Br J Cancer **92**(3): 426-9.
- Dreesen, O., B. Li, et al. (2007). "Telomere structure and function in trypanosomes: a proposal." Nat Rev Microbiol **5**(1): 70-5.
- Drouin, A., N. Thorin-Trescases, et al. (2007). "Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatory H₂O₂ production in mouse cerebral arteries." Cardiovasc Res **73**(1): 73-81.

- Dudognon, C., F. Pendino, et al. (2004). "Death receptor signaling regulatory function for telomerase: hTERT abolishes TRAIL-induced apoptosis, independently of telomere maintenance." Oncogene **23**(45): 7469-74.
- Dunham, M. A., A. A. Neumann, et al. (2000). "Telomere maintenance by recombination in human cells." Nat Genet **26**(4): 447-50.
- Dyer, D. G., J. A. Dunn, et al. (1992). "Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging." Ann N Y Acad Sci **663**: 421-2.
- Dzau, V. J. (2001). "Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis." Hypertension **37**(4): 1047-52.
- Dzau, V. J. and G. H. Gibbons (1991). "Endothelium and growth factors in vascular remodeling of hypertension." Hypertension **18**(5 Suppl): III115-21.
- Ebeling, W., N. Henrich, et al. (1974). "Proteinase K from Tritirachium album Limber." Eur J Biochem **47**(1): 91-7.
- el-Deiry, W. S., J. W. Harper, et al. (1994). "WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis." Cancer Res **54**(5): 1169-74.
- Elledge, S. J. (1996). "Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis." Science **274**(5293): 1664-72.
- Endoh, T., N. Tsuji, et al. (2005). "Survivin enhances telomerase activity via up-regulation of specificity protein 1- and c-Myc-mediated human telomerase reverse transcriptase gene transcription." Exp Cell Res **305**(2): 300-11.
- Epstein, C. J., G. M. Martin, et al. (1966). "Werner's syndrome a review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process." Medicine (Baltimore) **45**(3): 177-221.

- Erbs, S., S. Mobius-Winkler, et al. (2006). "Both T-786C and G894T polymorphism of endothelial nitric oxide synthase affect in-vitro endothelium-dependent relaxation of internal mammary artery rings from patients with coronary artery disease." Eur J Cardiovasc Prev Rehabil **13**(5): 826-31.
- Eriksson, M., W. T. Brown, et al. (2003). "Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome." Nature **423**(6937): 293-8.
- Erwin, P. A., A. J. Lin, et al. (2005). "Receptor-regulated dynamic S-nitrosylation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells." J Biol Chem **280**(20): 19888-94.
- Esmon, C. T. (2004). "Structure and functions of the endothelial cell protein C receptor." Crit Care Med **32**(5 Suppl): S298-301.
- Esterbauer, H., R. J. Schaur, et al. (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes." Free Radic Biol Med **11**(1): 81-128.
- Esteve, J. M., J. Mompo, et al. (1999). "Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro." Faseb J **13**(9): 1055-64.
- Evans, M. D., M. Dizdaroglu, et al. (2004). "Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance." Mutat Res **567**(1): 1-61.
- Fadini, G. P., S. Sartore, et al. (2006). "Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(9): 2140-6.

- Faragher, R. G., I. R. Kill, et al. (1993). "The gene responsible for Werner syndrome may be a cell division "counting" gene." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(24): 12030-4.
- Faragher, R. G. and D. Kipling (1998). "How might replicative senescence contribute to human ageing?" Bioessays **20**(12): 985-91.
- Fedtke, N., J. A. Boucheron, et al. (1990). "Vinyl chloride-induced DNA adducts. II: Formation and persistence of 7-(2'-oxoethyl)guanine and N2,3-ethenoguanine in rat tissue DNA." Carcinogenesis **11**(8): 1287-92.
- Feldman, D. L., H. F. Hoff, et al. (1984). "Immunohistochemical localization of apoprotein B in aortas from hyperlipemic swine. Preferential accumulation in lesion-prone areas." Arch Pathol Lab Med **108**(10): 817-22.
- Feng, L., Y. Xia, et al. (1995). "Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide." J Clin Invest **95**(4): 1669-75.
- Fink, S. P., G. R. Reddy, et al. (1997). "Mutagenicity in Escherichia coli of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(16): 8652-7.
- Fisslthaler, B., R. Popp, et al. (1999). "Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries." Nature **401**(6752): 493-7.
- Fitzpatrick, A. L., R. A. Kronmal, et al. (2007). "Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study." Am J Epidemiol **165**(1): 14-21.
- Flavahan, N. A. and P. M. Vanhoutte (1995). "Endothelial cell signaling and endothelial dysfunction." Am J Hypertens **8**(5 Pt 2): 28S-41S.

- Fleming, I. and R. Busse (1999). "NO: the primary EDRF." J Mol Cell Cardiol **31**(1): 5-14.
- Flohe, L., W. A. Gunzler, et al. (1973). "Glutathione peroxidase: a selenoenzyme." FEBS Lett **32**(1): 132-4.
- Forsyth, N. R., A. P. Evans, et al. (2003). "Developmental differences in the immortalization of lung fibroblasts by telomerase." Aging Cell **2**(5): 235-43.
- Fortuno, A., G. San Jose, et al. (2005). "Oxidative stress and vascular remodelling." Exp Physiol **90**(4): 457-62.
- Foster, S. A., D. J. Wong, et al. (1998). "Inactivation of p16 in human mammary epithelial cells by CpG island methylation." Mol Cell Biol **18**(4): 1793-801.
- Fraga, C. G. (2007). "Plant polyphenols: how to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions." IUBMB Life **59**(4-5): 308-15.
- Franceschi, C., S. Valensin, et al. (2000). "The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives." Exp Gerontol **35**(6-7): 879-96.
- Franek, W. R., Y. C. Chowdary, et al. (2002). "Suppression of nuclear factor-kappa B activity by nitric oxide and hyperoxia in oxygen-resistant cells." J Biol Chem **277**(45): 42694-700.
- Frankel, E. N., J. Kanner, et al. (1993). "Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine." Lancet **341**(8843): 454-7.
- Franzoni, F., A. Quinones-Galvan, et al. (2003). "A comparative study of the in vitro antioxidant activity of statins." Int J Cardiol **90**(2-3): 317-21.
- Frenette, P. S. and D. D. Wagner (1996). "Adhesion molecules--Part 1." N Engl J Med **334**(23): 1526-9.

- Fujita, Y., S. Maruyama, et al. (2004). "Caveolin-1 in mesangial cells suppresses MAP kinase activation and cell proliferation induced by bFGF and PDGF." Kidney Int **66**(5): 1794-804.
- Fukami, K., S. Yamagishi, et al. (2008). "Role of AGEs in diabetic nephropathy." Curr Pharm Des **14**(10): 946-52.
- Funk, W. D., D. T. Pak, et al. (1992). "A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes." Mol Cell Biol **12**(6): 2866-71.
- Furukawa, A., S. Tada-Oikawa, et al. (2007). "H₂O₂ accelerates cellular senescence by accumulation of acetylated p53 via decrease in the function of SIRT1 by NAD⁺ depletion." Cell Physiol Biochem **20**(1-4): 45-54.
- Galbiati, F., D. Volonte, et al. (2001). "Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism." Mol Biol Cell **12**(8): 2229-44.
- Galetta, F., F. Franzoni, et al. (2006). "Endothelium-dependent vasodilation and carotid artery wall remodeling in athletes and sedentary subjects." Atherosclerosis **186**(1): 184-92.
- Garban, H. J. and B. Bonavida (2001). "Nitric oxide disrupts H₂O₂-dependent activation of nuclear factor kappa B. Role in sensitization of human tumor cells to tumor necrosis factor-alpha -induced cytotoxicity." J Biol Chem **276**(12): 8918-23.
- Garland, J. G. and G. A. McPherson (1992). "Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery." Br J Pharmacol **105**(2): 429-35.

- Gendron, M. E., Théorêt, JF., Mamarbachi, A.D., Merhi, Y., Thorin, E. (2008). "Deleterious Effects of Curative Catechin Treatment on the Vascular Function of Atherosclerotic Mice." ATVB *Under Review*.
- Gerrity, R. G. (1981). "The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions." Am J Pathol **103**(2): 181-90.
- Gerschman, R., D. L. Gilbert, et al. (1954). "Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common." Science **119**(3097): 623-6.
- Gerstenblith, G., J. Frederiksen, et al. (1977). "Echocardiographic assessment of a normal adult aging population." Circulation **56**(2): 273-8.
- Giannotti, G. and U. Landmesser (2007). "Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis." Herz **32**(7): 568-72.
- Gil, L., W. Siems, et al. (2006). "Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes." Free Radic Res **40**(5): 495-505.
- Gilligan, D. M., V. Guetta, et al. (1994). "Selective loss of microvascular endothelial function in human hypercholesterolemia." Circulation **90**(1): 35-41.
- Glantz, S. A. and W. W. Parmley (1991). "Passive smoking and heart disease. Epidemiology, physiology, and biochemistry." Circulation **83**(1): 1-12.
- Glass, C. K. and J. L. Witztum (2001). "Atherosclerosis. the road ahead." Cell **104**(4): 503-16.
- Goldberg, I. J. (2001). "Clinical review 124: Diabetic dyslipidemia: causes and consequences." J Clin Endocrinol Metab **86**(3): 965-71.

- Goldman, R. D., D. K. Shumaker, et al. (2004). "Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(24): 8963-8.
- Goldsby RA, K. T., Osborne BA (2000). KUBY Immunology. New-York, W.H. Freeman and company.
- Goodman, L. V. and R. A. Majack (1989). "Vascular smooth muscle cells express distinct transforming growth factor-beta receptor phenotypes as a function of cell density in culture." J Biol Chem **264**(9): 5241-4.
- Gorbunova, V., A. Seluanov, et al. (2002). "Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis." J Biol Chem **277**(41): 38540-9.
- Govindarajan, G., A. Whaley-Connell, et al. (2005). "The cardiometabolic syndrome as a cardiovascular risk factor." Am J Med Sci **330**(6): 311-8.
- Gow, A. J., C. R. Farkouh, et al. (2004). "Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **287**(2): L262-8.
- Greider, C. W. and E. H. Blackburn (1985). "Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts." Cell **43**(2 Pt 1): 405-13.
- Griendling, K. K. and R. W. Alexander (1997). "Oxidative stress and cardiovascular disease." Circulation **96**(10): 3264-5.
- Griendling, K. K., C. A. Minieri, et al. (1994). "Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells." Circ Res **74**(6): 1141-8.

- Griffith, J. D., L. Comeau, et al. (1999). "Mammalian telomeres end in a large duplex loop." Cell **97**(4): 503-14.
- Grumbach, I. M., W. Chen, et al. (2005). "A negative feedback mechanism involving nitric oxide and nuclear factor kappa-B modulates endothelial nitric oxide synthase transcription." J Mol Cell Cardiol **39**(4): 595-603.
- Gu, L., Y. Okada, et al. (1998). "Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice." Mol Cell **2**(2): 275-81.
- Guo, X., Y. Deng, et al. (2007). "Dysfunctional telomeres activate an ATM-ATR-dependent DNA damage response to suppress tumorigenesis." Embo J **26**(22): 4709-19.
- Gupta, A., H. L. Wang, et al. (2004). "Expression of alpha-methylacyl-coenzyme A racemase in nephrogenic adenoma." Am J Surg Pathol **28**(9): 1224-9.
- Hadi, H. A., C. S. Carr, et al. (2005). "Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome." Vasc Health Risk Manag **1**(3): 183-98.
- Haendeler, J., J. Hoffmann, et al. (2003). "Hydrogen peroxide triggers nuclear export of telomerase reverse transcriptase via Src kinase family-dependent phosphorylation of tyrosine 707." Mol Cell Biol **23**(13): 4598-610.
- Haendeler, J., J. Hoffmann, et al. (2004). "Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells." Circ Res **94**(6): 768-75.
- Haendeler, J., J. Hoffmann, et al. (2002). "Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69." Nat Cell Biol **4**(10): 743-9.

- Haendeler, J., J. Hoffmann, et al. (2004). "Antioxidant effects of statins via S-nitrosylation and activation of thioredoxin in endothelial cells: a novel vasculoprotective function of statins." Circulation **110**(7): 856-61.
- Hahn, W. C., S. A. Stewart, et al. (1999). "Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells." Nat Med **5**(10): 1164-70.
- Haimovich, B., N. Kaneshiki, et al. (1996). "Protein kinase C regulates tyrosine phosphorylation of pp125FAK in platelets adherent to fibrinogen." Blood **87**(1): 152-61.
- Halliwell, B. G., JMC (1999). Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press.
- Han, J. and P. Sun (2007). "The pathways to tumor suppression via route p38." Trends Biochem Sci **32**(8): 364-71.
- Han, J., Y. Tsukada, et al. (2005). "Hepatocyte growth factor induces redistribution of p21(CIP1) and p27(KIP1) through ERK-dependent p16(INK4a) up-regulation, leading to cell cycle arrest at G1 in HepG2 hepatoma cells." J Biol Chem **280**(36): 31548-56.
- Handy, D. E. and J. Loscalzo (2006). "Nitric oxide and posttranslational modification of the vascular proteome: S-nitrosation of reactive thiols." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(6): 1207-14.
- Hardwick, K. G. and A. W. Murray (1995). "Mad1p, a phosphoprotein component of the spindle assembly checkpoint in budding yeast." J Cell Biol **131**(3): 709-20.
- Harley, C. B., A. B. Futcher, et al. (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." Nature **345**(6274): 458-60.

- Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." J Gerontol **11**(3): 298-300.
- Harman, D. (1993). "Free radical involvement in aging. Pathophysiology and therapeutic implications." Drugs Aging **3**(1): 60-80.
- Harper, J. W., S. J. Elledge, et al. (1995). "Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21." Mol Biol Cell **6**(4): 387-400.
- Harrington, L. and M. O. Robinson (2002). "Telomere dysfunction: multiple paths to the same end." Oncogene **21**(4): 592-7.
- Hartwell, L. H. and M. B. Kastan (1994). "Cell cycle control and cancer." Science **266**(5192): 1821-8.
- Hatoum, O. A., D. G. Binion, et al. (2005). "Role of hydrogen peroxide in ACh-induced dilation of human submucosal intestinal microvessels." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(1): H48-54.
- Haus, J. M., J. A. Carrithers, et al. (2007). "Collagen, cross-linking, and advanced glycation end products in aging human skeletal muscle." J Appl Physiol **103**(6): 2068-76.
- Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Exp Cell Res **25**: 585-621.
- Hegele, R. A. (1996). "The pathogenesis of atherosclerosis." Clin Chim Acta **246**(1-2): 21-38.
- Heinzel, B., M. John, et al. (1992). "Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase." Biochem J **281** (Pt 3): 627-30.

- Heiss, N. S., S. W. Knight, et al. (1998). "X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions." Nat Genet **19**(1): 32-8.
- Heitzer, T., H. Just, et al. (1996). "Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers." Circulation **94**(1): 6-9.
- Heitzer, T., S. Yla-Herttuala, et al. (1996). "Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL." Circulation **93**(7): 1346-53.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." Nature **407**(6805): 770-6.
- Hennekam, R. C. (2006). "Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype." Am J Med Genet A **140**(23): 2603-24.
- Hennet, T., C. Richter, et al. (1993). "Tumour necrosis factor-alpha induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells." Biochem J **289** (Pt 2): 587-92.
- Herbig, U., W. Jobling, et al. (2004). "Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a)." Mol Cell Biol **14**(4): 501-13.
- Hickson, I. D. (2003). "RecQ helicases: caretakers of the genome." Nat Rev Cancer **3**(3): 169-78.
- Hirano, S., Y. Kobayashi, et al. (2004). "The accumulation and toxicity of methylated arsenicals in endothelial cells: important roles of thiol compounds." Toxicol Appl Pharmacol **198**(3): 458-67.

- Hirst, K., F. Fisher, et al. (1994). "The transcription factor, the Cdk, its cyclin and their regulator: directing the transcriptional response to a nutritional signal." Embo J **13**(22): 5410-20.
- Hockenbery, D. M., Z. N. Oltvai, et al. (1993). "Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis." Cell **75**(2): 241-51.
- Hsieh, C. C. and J. Papaconstantinou (2006). "Thioredoxin-ASK1 complex levels regulate ROS-mediated p38 MAPK pathway activity in livers of aged and long-lived Snell dwarf mice." FASEB J **20**(2): 259-68.
- Huffman, K. E., S. D. Levene, et al. (2000). "Telomere shortening is proportional to the size of the G-rich telomeric 3'-overhang." J Biol Chem **275**(26): 19719-22.
- Hur, J., C. H. Yoon, et al. (2004). "Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(2): 288-93.
- Ignarro, L. J. and P. J. Kadowitz (1985). "The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation." Annu Rev Pharmacol Toxicol **25**: 171-91.
- Ilmonen, P., A. Kotrschal, et al. (2008). "Telomere attrition due to infection." PLoS ONE **3**(5): e2143.
- Imanishi, T., C. Moriwaki, et al. (2005). "Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension." J Hypertens **23**(10): 1831-7.
- Ischiropoulos, H. (1998). "Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species." Arch Biochem Biophys **356**(1): 1-11.

- Ischiropoulos, H. (2003). "Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration." Biochem Biophys Res Commun **305**(3): 776-83.
- Ishii, A., K. Nakamura, et al. (2006). "Telomere shortening with aging in the human pancreas." Exp Gerontol **41**(9): 882-6.
- Ishikawa, F. (1998). "FISH goes with the flow." Nat Biotechnol **16**(8): 723-4.
- Itahana, K., Y. Zou, et al. (2003). "Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1." Mol Cell Biol **23**(1): 389-401.
- Iwasa, H., J. Han, et al. (2003). "Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway." Genes Cells **8**(2): 131-44.
- Jacob, K. N. and A. Garg (2006). "Laminopathies: multisystem dystrophy syndromes." Mol Genet Metab **87**(4): 289-302.
- Jeanclos, E., A. Krolewski, et al. (1998). "Shortened telomere length in white blood cells of patients with IDDM." Diabetes **47**(3): 482-6.
- Jeanclos, E., N. J. Schork, et al. (2000). "Telomere length inversely correlates with pulse pressure and is highly familial." Hypertension **36**(2): 195-200.
- Jin, P., S. Hardy, et al. (1998). "Nuclear localization of cyclin B1 controls mitotic entry after DNA damage." J Cell Biol **141**(4): 875-85.
- Johnson, R. D. and M. Jasin (2000). "Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells." Embo J **19**(13): 3398-407.
- Johnson, S. R. (1998). "Menopause and hormone replacement therapy." Med Clin North Am **82**(2): 297-320.

- Johnson, T. E. (2006). "Recent results: biomarkers of aging." Exp Gerontol **41**(12): 1243-6.
- Jongstra-Bilen, J., M. Haidari, et al. (2006). "Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis." J Exp Med **203**(9): 2073-83.
- Kang, J. L., K. Lee, et al. (2000). "Nitric oxide up-regulates DNA-binding activity of nuclear factor-kappaB in macrophages stimulated with silica and inflammatory stimulants." Mol Cell Biochem **215**(1-2): 1-9.
- Kapahi, P., M. E. Boulton, et al. (1999). "Positive correlation between mammalian life span and cellular resistance to stress." Free Radic Biol Med **26**(5-6): 495-500.
- Kappei, D. and J. A. Londono-Vallejo (2008). "Telomere length inheritance and aging." Mech Ageing Dev **129**(1-2): 17-26.
- Karlseder, J., D. Broccoli, et al. (1999). "p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2." Science **283**(5406): 1321-5.
- Kasahara, Y., R. Tuder, et al. (2001). "Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema." Am J Respir Crit Care Med **163**(3 Pt 1): 737-44.
- Kastan, M. B., O. Onyekwere, et al. (1991). "Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage." Cancer Res **51**(23 Pt 1): 6304-11.
- Katsuyama, K., M. Shichiri, et al. (1998). "NO inhibits cytokine-induced iNOS expression and NF-kappaB activation by interfering with phosphorylation and degradation of IkappaB-alpha." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(11): 1796-802.

- Katusic, Z. S. and P. M. Vanhoutte (1989). "Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor." Am J Physiol **257**(1 Pt 2): H33-7.
- Keisari, Y., L. Braun, et al. (1983). "The oxidative burst and related phenomena in mouse macrophages elicited by different sterile inflammatory stimuli." Immunobiology **165**(1): 78-89.
- Kelleher, C., I. Kurth, et al. (2005). "Human protection of telomeres 1 (POT1) is a negative regulator of telomerase activity in vitro." Mol Cell Biol **25**(2): 808-18.
- Kelley, G. A. and K. S. Kelley (2006). "Aerobic exercise and HDL2-C: a meta-analysis of randomized controlled trials." Atherosclerosis **184**(1): 207-15.
- Kerkhoff, E. and U. R. Rapp (1998). "High-intensity Raf signals convert mitotic cell cycling into cellular growth." Cancer Res **58**(8): 1636-40.
- Keston, A. S. and R. Brandt (1965). "The Fluorometric Analysis of Ultramicro Quantities of Hydrogen Peroxide." Anal Biochem **11**: 1-5.
- Keyomarsi, K. and T. W. Herliczek (1997). "The role of cyclin E in cell proliferation, development and cancer." Prog Cell Cycle Res **3**: 171-91.
- Khanna, A. (2004). "Concerted effect of transforming growth factor-beta, cyclin inhibitor p21, and c-myc on smooth muscle cell proliferation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(3): H1133-40.
- Kharitonov, V. G., A. R. Sundquist, et al. (1995). "Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen." J Biol Chem **270**(47): 28158-64.
- Khosravi-Far, R. and C. J. Der (1994). "The Ras signal transduction pathway." Cancer Metastasis Rev **13**(1): 67-89.
- Kill, I. R. and C. J. Hutchison (1995). "S-phase phosphorylation of lamin B2." FEBS Lett **377**(1): 26-30.

- Killewich, L. A., R. F. Macko, et al. (2004). "Exercise training enhances endogenous fibrinolysis in peripheral arterial disease." J Vasc Surg **40**(4): 741-5.
- Kim, N. W., M. A. Piatyszek, et al. (1994). "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer." Science **266**(5193): 2011-5.
- Kim, N. W. and F. Wu (1997). "Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP)." Nucleic Acids Res **25**(13): 2595-7.
- Kim, S. J., S. G. Hwang, et al. (2002). "p38 kinase regulates nitric oxide-induced apoptosis of articular chondrocytes by accumulating p53 via NFkappa B-dependent transcription and stabilization by serine 15 phosphorylation." J Biol Chem **277**(36): 33501-8.
- King, C. M. and Y. A. Barnett (1995). "Oxidative stress and human ageing." Biochem Soc Trans **23**(2): 375S.
- Kirkman, H. N., S. Galiano, et al. (1987). "The function of catalase-bound NADPH." J Biol Chem **262**(2): 660-6.
- Kleinman, H. K., M. L. McGarvey, et al. (1982). "Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma." Biochemistry **21**(24): 6188-93.
- Knight, S. W., T. J. Vulliamy, et al. (2001). "Identification of novel DKC1 mutations in patients with dyskeratosis congenita: implications for pathophysiology and diagnosis." Hum Genet **108**(4): 299-303.
- Koenig, W., N. Khuseyinova, et al. (2006). "Increased concentrations of C-reactive protein and IL-6 but not IL-18 are independently associated with incident coronary events in middle-aged men and women: results from the

- MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(12): 2745-51.
- Kondo, T., M. Hayashi, et al. (2004). "Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(8): 1442-7.
- Konishi, H., M. Tanaka, et al. (1997). "Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11233-7.
- Kougiyas, P., H. Chai, et al. (2005). "Effects of adipocyte-derived cytokines on endothelial functions: implication of vascular disease." J Surg Res **126**(1): 121-9.
- Kowald, A. and T. B. Kirkwood (1996). "A network theory of ageing: the interactions of defective mitochondria, aberrant proteins, free radicals and scavengers in the ageing process." Mutat Res **316**(5-6): 209-36.
- Kroncke, K. D. (2003). "Nitrosative stress and transcription." Biol Chem **384**(10-11): 1365-77.
- Kruszewski, M. and I. Szumiel (2005). "Sirtuins (histone deacetylases III) in the cellular response to DNA damage--facts and hypotheses." DNA Repair (Amst) **4**(11): 1306-13.
- Kumazaki, T., M. Kobayashi, et al. (1993). "Enhanced expression of fibronectin during in vivo cellular aging of human vascular endothelial cells and skin fibroblasts." Exp Cell Res **205**(2): 396-402.

- Kunath, T., M. K. Saba-El-Leil, et al. (2007). "FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment." Development **134**(16): 2895-902.
- Kunt, T., T. Forst, et al. (1998). "The influence of advanced glycation endproducts (AGE) on the expression of human endothelial adhesion molecules." Exp Clin Endocrinol Diabetes **106**(3): 183-8.
- Kurz, D. J., S. Decary, et al. (2000). "Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells." J Cell Sci **113 (Pt 20)**: 3613-22.
- Kurz, D. J., S. Decary, et al. (2004). "Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells." J Cell Sci **117**(Pt 11): 2417-26.
- Kyriakis, J. M., H. App, et al. (1992). "Raf-1 activates MAP kinase-kinase." Nature **358**(6385): 417-21.
- Lakatta, E. G. (1993). "Deficient neuroendocrine regulation of the cardiovascular system with advancing age in healthy humans." Circulation **87**(2): 631-6.
- Lakatta, E. G. (2002). "Age-associated cardiovascular changes in health: impact on cardiovascular disease in older persons." Heart Fail Rev **7**(1): 29-49.
- Lalonde, L., K. Gray-Donald, et al. (2002). "Comparing the benefits of diet and exercise in the treatment of dyslipidemia." Prev Med **35**(1): 16-24.
- Lander, H. M., P. K. Sehajpal, et al. (1993). "Nitric oxide signaling: a possible role for G proteins." J Immunol **151**(12): 7182-7.
- Langley, E., M. Pearson, et al. (2002). "Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence." EMBO J **21**(10): 2383-96.

- Lansdorp, P. M., N. P. Verwoerd, et al. (1996). "Heterogeneity in telomere length of human chromosomes." Hum Mol Genet **5**(5): 685-91.
- Larsen, B. T., D. D. Gutterman, et al. (2008). "Hydrogen peroxide inhibits cytochrome p450 epoxygenases: interaction between two endothelium-derived hyperpolarizing factors." Circ Res **102**(1): 59-67.
- Laufs, U., N. Werner, et al. (2004). "Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis." Circulation **109**(2): 220-6.
- Laughton, M. J., P. J. Evans, et al. (1991). "Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability." Biochem Pharmacol **42**(9): 1673-81.
- Lavin, M. F. and Y. Shiloh (1997). "The genetic defect in ataxia-telangiectasia." Annu Rev Immunol **15**: 177-202.
- Law, M. R., J. K. Morris, et al. (1997). "Environmental tobacco smoke exposure and ischaemic heart disease: an evaluation of the evidence." Bmj **315**(7114): 973-80.
- Lebel, M. (2001). "Werner syndrome: genetic and molecular basis of a premature aging disorder." Cell Mol Life Sci **58**(7): 857-67.
- Lebel, M., J. Lavoie, et al. (2003). "Genetic cooperation between the Werner syndrome protein and poly(ADP-ribose) polymerase-1 in preventing chromatid breaks, complex chromosomal rearrangements, and cancer in mice." Am J Pathol **162**(5): 1559-69.

- Leever, S. J. and C. J. Marshall (1992). "Activation of extracellular signal-regulated kinase, ERK2, by p21ras oncoprotein." EMBO J **11**(2): 569-74.
- Levine, A. J., J. Momand, et al. (1991). "The p53 tumour suppressor gene." Nature **351**(6326): 453-6.
- Levy, M. Z., R. C. Allsopp, et al. (1992). "Telomere end-replication problem and cell aging." J Mol Biol **225**(4): 951-60.
- Li, H., M. I. Cybulsky, et al. (1993). "An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium." Arterioscler Thromb **13**(2): 197-204.
- Li, P. L. and W. B. Campbell (1997). "Epoxyeicosatrienoic acids activate K⁺ channels in coronary smooth muscle through a guanine nucleotide binding protein." Circ Res **80**(6): 877-84.
- Li, Y. and R. Benezra (1996). "Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2." Science **274**(5285): 246-8.
- Libby, P. and M. Aikawa (2002). "Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets." Nat Med **8**(11): 1257-62.
- Libby, P. and D. I. Simon (2001). "Inflammation and thrombosis: the clot thickens." Circulation **103**(13): 1718-20.
- Lin, A. W., M. Barradas, et al. (1998). "Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling." Genes Dev **12**(19): 3008-19.
- Lin, C. P., J. D. Liu, et al. (2007). "Small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, inhibits proliferation, downregulates human telomerase reverse transcriptase and

enhances chemosensitivity in human hepatocellular carcinoma cells."

Anticancer Drugs **18**(2): 161-70.

Lin, K. W. and J. Yan (2005). "The telomere length dynamic and methods of its assessment." J Cell Mol Med **9**(4): 977-89.

Liu, B., J. Wang, et al. (2005). "Genomic instability in laminopathy-based premature aging." Nat Med **11**(7): 780-5.

Lloyd, A. C. (2002). "Limits to lifespan." Nat Cell Biol **4**(2): E25-7.

Lock, R. B. and W. E. Ross (1990). "Inhibition of p34cdc2 kinase activity by etoposide or irradiation as a mechanism of G2 arrest in Chinese hamster ovary cells." Cancer Res **50**(12): 3761-6.

Loft, S. and H. E. Poulsen (1996). "Cancer risk and oxidative DNA damage in man." J Mol Med **74**(6): 297-312.

Londono-Vallejo, J. A., H. Der-Sarkissian, et al. (2004). "Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange." Cancer Res **64**(7): 2324-7.

Lopez-Torres, M., R. Gredilla, et al. (2002). "Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria." Free Radic Biol Med **32**(9): 882-9.

Los, M., W. Droge, et al. (1995). "Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions." Eur J Immunol **25**(1): 159-65.

Loscalzo, J. (2001). "Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis." Circ Res **88**(8): 756-62.

Lou, Z. and J. Chen (2006). "Cellular senescence and DNA repair." Exp Cell Res **312**(14): 2641-6.

- Lowe, S. W. and C. J. Sherr (2003). "Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles." Curr Opin Genet Dev **13**(1): 77-83.
- Lowenstein, C. J., J. L. Dinerman, et al. (1994). "Nitric oxide: a physiologic messenger." Ann Intern Med **120**(3): 227-37.
- Lu, C., W. Fu, et al. (2001). "Telomerase protects developing neurons against DNA damage-induced cell death." Brain Res Dev Brain Res **131**(1-2): 167-71.
- Luc, S., N. Buza-Vidas, et al. (2008). "Delineating the cellular pathways of hematopoietic lineage commitment." Semin Immunol **20**(4): 213-20.
- Luscher, T. F. and M. Barton (1997). "Biology of the endothelium." Clin Cardiol **20**(11 Suppl 2): II-3-10.
- Maekawa, M., E. Nishida, et al. (2002). "Identification of the Anti-proliferative protein Tob as a MAPK substrate." J Biol Chem **277**(40): 37783-7.
- Mahadevan, V., M. Campbell, et al. (2006). "Internal mammary artery smooth muscle cells resist migration and possess high antioxidant capacity." Cardiovasc Res **72**(1): 60-8.
- Makarov, V. L., Y. Hirose, et al. (1997). "Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening." Cell **88**(5): 657-66.
- Malumbres, M., I. Perez De Castro, et al. (2000). "Cellular response to oncogenic ras involves induction of the Cdk4 and Cdk6 inhibitor p15(INK4b)." Mol Cell Biol **20**(8): 2915-25.
- Mao, H., N. C. Schnetz-Boutaud, et al. (1999). "Duplex DNA catalyzes the chemical rearrangement of a malondialdehyde deoxyguanosine adduct." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6615-20.

- Maraldi, N. M., S. Squarzone, et al. (2005). "Laminopathies: involvement of structural nuclear proteins in the pathogenesis of an increasing number of human diseases." J Cell Physiol **203**(2): 319-27.
- Marciniak, R. A., F. B. Johnson, et al. (2000). "Dyskeratosis congenita, telomeres and human ageing." Trends Genet **16**(5): 193-5.
- Marin, J. (1995). "Age-related changes in vascular responses: a review." Mech Ageing Dev **79**(2-3): 71-114.
- Mark, A. L. and W. I. Sivitz (2002). "Uncoupling metabolism and coupling leptin to cardiovascular disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(6): 881-3.
- Marshall, H. E., K. Merchant, et al. (2000). "Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression." Faseb J **14**(13): 1889-900.
- Martin-Ruiz, C., G. Saretzki, et al. (2004). "Stochastic variation in telomere shortening rate causes heterogeneity of human fibroblast replicative life span." J Biol Chem **279**(17): 17826-33.
- Martin-Ruiz, C. M., J. Gussekloo, et al. (2005). "Telomere length in white blood cells is not associated with morbidity or mortality in the oldest old: a population-based study." Aging Cell **4**(6): 287-90.
- Martin, G. M. and J. Oshima (2000). "Lessons from human progeroid syndromes." Nature **408**(6809): 263-6.
- Marx, R., T. Jax, et al. (2006). "Disturbed endothelial function of the internal thoracic artery in patients with coronary artery disease." Int J Cardiovasc Imaging **22**(6): 755-62.

- Masella, R., R. Di Benedetto, et al. (2005). "Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes." J Nutr Biochem **16**(10): 577-86.
- Mason, D. P., R. D. Kenagy, et al. (1999). "Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery." Circ Res **85**(12): 1179-85.
- Massip, L., C. Garand, et al. (2006). "Increased insulin, triglycerides, reactive oxygen species, and cardiac fibrosis in mice with a mutation in the helicase domain of the Werner syndrome gene homologue." Exp Gerontol **41**(2): 157-68.
- Matsumoto, B. (1993). Cell biological application of confocal microscopy. San Diego, Academic Press.
- Matthews, C., I. Gorenne, et al. (2006). "Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress." Circ Res **99**(2): 156-64.
- McCord, J. M. and I. Fridovich (1969). "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)." J Biol Chem **244**(22): 6049-55.
- McEachern, M. J. and E. H. Blackburn (1996). "Cap-prevented recombination between terminal telomeric repeat arrays (telomere CPR) maintains telomeres in *Kluyveromyces lactis* lacking telomerase." Genes Dev **10**(14): 1822-34.
- McEachern, M. J., A. Krauskopf, et al. (2000). "Telomeres and their control." Annu Rev Genet **34**: 331-358.
- McKinnon, P. J. (2004). "ATM and ataxia telangiectasia." EMBO Rep **5**(8): 772-6.

- McMurray, H. F., S. Parthasarathy, et al. (1993). "Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes." J Clin Invest **92**(2): 1004-8.
- McNally, F. J. (1996). "Modulation of microtubule dynamics during the cell cycle." Curr Opin Cell Biol **8**(1): 23-9.
- McNeil, N. and T. Ried (2000). "Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine." Expert Rev Mol Med **2000**: 1-14.
- Medrano, E. E., S. Im, et al. (1995). "Ultraviolet B light induces G1 arrest in human melanocytes by prolonged inhibition of retinoblastoma protein phosphorylation associated with long-term expression of the p21Waf-1/SDI-1/Cip-1 protein." Cancer Res **55**(18): 4047-52.
- Meloche, S. and J. Pouyssegur (2007). "The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition." Oncogene **26**(22): 3227-39.
- Meloche, S., K. Seuwen, et al. (1992). "Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity." Mol Endocrinol **6**(5): 845-54.
- Mendall, M. A., P. Patel, et al. (1997). "Relation of serum cytokine concentrations to cardiovascular risk factors and coronary heart disease." Heart **78**(3): 273-7.
- Mendes, A. F., A. P. Carvalho, et al. (2002). "Role of nitric oxide in the activation of NF-kappaB, AP-1 and NOS II expression in articular chondrocytes." Inflamm Res **51**(7): 369-75.

- Meyers, M. R. and N. Gokce (2007). "Endothelial dysfunction in obesity: etiological role in atherosclerosis." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **14**(5): 365-9.
- Mezzetti, A., D. Lapenna, et al. (1995). "Vitamins E, C and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and non-smokers." Atherosclerosis **112**(1): 91-9.
- Michan, S. and D. Sinclair (2007). "Sirtuins in mammals: insights into their biological function." Biochem J **404**(1): 1-13.
- Michaud, S. E., S. Dussault, et al. (2006). "Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities." Atherosclerosis **187**(2): 423-32.
- Migeon, C. J., A. R. Keller, et al. (1957). "Dehydroepiandrosterone and androsterone levels in human plasma: effect of age and sex; day-to-day and diurnal variations." J Clin Endocrinol Metab **17**(9): 1051-62.
- Minamino, T. and I. Komuro (2002). "Role of telomere in endothelial dysfunction in atherosclerosis." Curr Opin Lipidol **13**(5): 537-43.
- Minamino, T., H. Miyauchi, et al. (2002). "Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction." Circulation **105**(13): 1541-4.
- Minamino, T., H. Miyauchi, et al. (2004). "The role of vascular cell senescence in atherosclerosis: antisenescence as a novel therapeutic strategy for vascular aging." Curr Vasc Pharmacol **2**(2): 141-8.
- Misiti, S., S. Nanni, et al. (2000). "Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells." Mol Cell Biol **20**(11): 3764-71.

- Mitchell, D. A., P. A. Erwin, et al. (2005). "S-Nitrosation and regulation of inducible nitric oxide synthase." Biochemistry **44**(12): 4636-47.
- Mitchell, J. R., E. Wood, et al. (1999). "A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita." Nature **402**(6761): 551-5.
- Miura, H., J. J. Bosnjak, et al. (2003). "Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles." Circ Res **92**(2): e31-40.
- Moe, G. W., J. L. Rouleau, et al. (2003). "Role of endothelins in congestive heart failure." Can J Physiol Pharmacol **81**(6): 588-97.
- Moldeus, P., I. A. Cotgreave, et al. (1986). "Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine." Respiration **50 Suppl 1**: 31-42.
- Moncada, S., R. M. Palmer, et al. (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." Pharmacol Rev **43**(2): 109-42.
- Mondello, C., C. Petropoulou, et al. (1999). "Telomere length in fibroblasts and blood cells from healthy centenarians." Exp Cell Res **248**(1): 234-42.
- Monnat, R. J., Jr. (1992). "Werner syndrome: molecular genetics and mechanistic hypotheses." Exp Gerontol **27**(4): 447-53.
- Moreno, H., Jr., S. Chalon, et al. (1998). "Endothelial dysfunction in human hand veins is rapidly reversible after smoking cessation." Am J Physiol **275**(3 Pt 2): H1040-5.
- Morisada, T., Y. Kubota, et al. (2006). "Angiopoietins and angiopoietin-like proteins in angiogenesis." Endothelium **13**(2): 71-9.
- Mozaffarian, D., C. D. Furberg, et al. (2008). "Physical activity and incidence of atrial fibrillation in older adults: the cardiovascular health study." Circulation **118**(8): 800-7.

- Mudrak, I., E. Ogris, et al. (1994). "Coordinated trans activation of DNA synthesis- and precursor-producing enzymes by polyomavirus large T antigen through interaction with the retinoblastoma protein." Mol Cell Biol **14**(3): 1886-92.
- Muller, F. L., M. S. Lustgarten, et al. (2007). "Trends in oxidative aging theories." Free Radic Biol Med **43**(4): 477-503.
- Muntoni, A. and R. R. Reddel (2005). "The first molecular details of ALT in human tumor cells." Hum Mol Genet **14 Spec No. 2**: R191-6.
- Murasawa, S. and T. Asahara (2005). "Endothelial progenitor cells for vasculogenesis." Physiology (Bethesda) **20**: 36-42.
- Murasawa, S., A. Kawamoto, et al. (2005). "Niche-dependent translineage commitment of endothelial progenitor cells, not cell fusion in general, into myocardial lineage cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(7): 1388-94.
- Murray, A. W. (1995). "Cell cycle. Tense spindles can relax." Nature **373**(6515): 560-1.
- Naka, K., A. Tachibana, et al. (2004). "Stress-induced premature senescence in hTERT-expressing ataxia telangiectasia fibroblasts." J Biol Chem **279**(3): 2030-7.
- Nakamura, Y., Y. Horii, et al. (1993). "Immunohistochemical localization of advanced glycosylation end products in coronary atheroma and cardiac tissue in diabetes mellitus." Am J Pathol **143**(6): 1649-56.
- Narita, M., S. Nunez, et al. (2003). "Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence." Cell **113**(6): 703-16.

- Navarro, C. L., J. Cadinanos, et al. (2005). "Loss of ZMPSTE24 (FACE-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of Lamin A precursors." Hum Mol Genet **14**(11): 1503-13.
- Nedospasov, A., R. Rafikov, et al. (2000). "An autocatalytic mechanism of protein nitrosylation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13543-8.
- Ni, J., A. L. Tien, et al. (1997). "Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA." Cell **89**(4): 565-73.
- Nicita-Mauro, V., C. Lo Balbo, et al. (2008). "Smoking, aging and the centenarians." Exp Gerontol **43**(2): 95-101.
- Novelli, G., A. Muchir, et al. (2002). "Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C." Am J Hum Genet **71**(2): 426-31.
- Nowak, R., J. K. Siwicki, et al. (2002). "Telomere shortening and atherosclerosis." Lancet **359**(9310): 976; author reply 976-7.
- Nunoshiba, T. and B. Dimple (1993). "Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide." Cancer Res **53**(14): 3250-2.
- Nyunoya, T., M. Monick, et al. (2006). "Cigarette smoke induces cellular senescence." Am J Respir Cell Mol Biol **35**(6): 681-8.
- Ogawa, D., T. Nomiya, et al. (2006). "Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses telomerase activity in vascular smooth muscle cells." Circ Res **98**(7): e50-9.
- Ohuchida, K., K. Mizumoto, et al. (2005). "Quantitative assessment of telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase messenger RNA levels in pancreatic juice samples for the diagnosis of pancreatic cancer." Clin Cancer Res **11**(6): 2285-92.

- Olivetti, G., M. Melissari, et al. (1991). "Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy." Circ Res **68**(6): 1560-8.
- Orgogozo, J. M., J. F. Dartigues, et al. (1997). "Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area." Rev Neurol (Paris) **153**(3): 185-92.
- Ota, H., M. Akishita, et al. (2007). "Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells." J Mol Cell Cardiol **43**(5): 571-9.
- Packard, R. R. and P. Libby (2008). "Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction." Clin Chem **54**(1): 24-38.
- Palmero, I., B. McConnell, et al. (1997). "Accumulation of p16INK4a in mouse fibroblasts as a function of replicative senescence and not of retinoblastoma gene status." Oncogene **15**(5): 495-503.
- Pande, V. and M. J. Ramos (2005). "NF-kappaB in human disease: current inhibitors and prospects for de novo structure based design of inhibitors." Curr Med Chem **12**(3): 357-74.
- Pandita, T. (2002). "ATM function and telomere stability." Oncogene **21**(4): 611-8.
- Pantoja, C. and M. Serrano (1999). "Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras." Oncogene **18**(35): 4974-82.
- Parenteau, J. and R. J. Wellinger (1999). "Accumulation of single-stranded DNA and destabilization of telomeric repeats in yeast mutant strains carrying a deletion of RAD27." Mol Cell Biol **19**(6): 4143-52.
- Parker, L. L. and H. Piwnicka-Worms (1992). "Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase." Science **257**(5078): 1955-7.

- Pawley, J. B. (1990). Handbook of biological confocal microscopy. New-York and London, Plenum Press.
- Pawliczak, R., M. J. Cowan, et al. (2001). "p11 expression in human bronchial epithelial cells is increased by nitric oxide in a cGMP-dependent pathway involving protein kinase G activation." J Biol Chem **276**(48): 44613-21.
- Perez-Guerrero, C., M. Alvarez de Sotomayor, et al. (2003). "Effects of simvastatin on endothelial function after chronic inhibition of nitric oxide synthase by L-NAME." J Cardiovasc Pharmacol **42**(2): 204-10.
- Perez, N. G., W. D. Gao, et al. (1998). "Novel myofilament Ca²⁺-sensitizing property of xanthine oxidase inhibitors." Circ Res **83**(4): 423-30.
- Perillo, N. L., F. Naeim, et al. (1993). "The in vitro senescence of human T lymphocytes: failure to divide is not associated with a loss of cytolytic activity or memory T cell phenotype." Mech Ageing Dev **67**(1-2): 173-85.
- Peterson, T. E., M. E. Guicciardi, et al. (2003). "Caveolin-1 can regulate vascular smooth muscle cell fate by switching platelet-derived growth factor signaling from a proliferative to an apoptotic pathway." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(9): 1521-7.
- Pines, J. and T. Hunter (1989). "Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2." Cell **58**(5): 833-46.
- Pines, J. and T. Hunter (1991). "Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport." J Cell Biol **115**(1): 1-17.

- Pizzimenti, S., G. Barrera, et al. (1999). "Inhibition of D1, D2, and A-cyclin expression in HL-60 cells by the lipid peroxydation product 4-hydroxynonenal." Free Radic Biol Med **26**(11-12): 1578-86.
- Pizzimenti, S., F. Briatore, et al. (2006). "4-Hydroxynonenal inhibits telomerase activity and hTERT expression in human leukemic cell lines." Free Radic Biol Med **40**(9): 1578-91.
- Pou, S., W. S. Pou, et al. (1992). "Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase." J Biol Chem **267**(34): 24173-6.
- Prelog, M. (2006). "Aging of the immune system: a risk factor for autoimmunity?" Autoimmun Rev **5**(2): 136-9.
- Price, J. F., P. I. Mowbray, et al. (1999). "Relationship between smoking and cardiovascular risk factors in the development of peripheral arterial disease and coronary artery disease: Edinburgh Artery Study." Eur Heart J **20**(5): 344-53.
- Pries, A. R. and W. M. Kuebler (2006). "Normal endothelium." Handb Exp Pharmacol(176 Pt 1): 1-40.
- Pritchard, C., L. Carragher, et al. (2007). "Mouse models for BRAF-induced cancers." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 1329-33.
- Probin, V., Y. Wang, et al. (2007). "Busulfan-induced senescence is dependent on ROS production upstream of the MAPK pathway." Free Radic Biol Med **42**(12): 1858-65.
- Prowse, K. R. and C. W. Greider (1995). "Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 4818-22.

- Pryor, W. A. and N. A. Porter (1990). "Suggested mechanisms for the production of 4-hydroxy-2-nonenal from the autoxidation of polyunsaturated fatty acids." Free Radic Biol Med **8**(6): 541-3.
- Pueyo, M. E., W. Gonzalez, et al. (2000). "Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(3): 645-51.
- Puga, J. (1995). "The use of the internal mammary artery for revascularization of the left anterior descending coronary artery." Eur Heart J **16 Suppl E**: 21-5.
- Qin, X. F., D. S. An, et al. (2003). "Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 183-8.
- Quehenberger, P., A. Bierhaus, et al. (2000). "Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells." Diabetes **49**(9): 1561-70.
- Quinn, M. T., S. Parthasarathy, et al. (1987). "Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(9): 2995-8.
- Rajagopalan, S., S. Kurz, et al. (1996). "Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone." J Clin Invest **97**(8): 1916-23.

- Rajavashisth, T. B., A. Andalibi, et al. (1990). "Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins." Nature **344**(6263): 254-7.
- Rajendrasozhan, S., S. R. Yang, et al. (2008). "SIRT1, an antiinflammatory and antiaging protein, is decreased in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **177**(8): 861-70.
- Ramasamy, R., S. J. Vannucci, et al. (2005). "Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation." Glycobiology **15**(7): 16R-28R.
- Ramirez, C. L., J. Cadinanos, et al. (2007). "Human progeroid syndromes, aging and cancer: new genetic and epigenetic insights into old questions." Cell Mol Life Sci **64**(2): 155-70.
- Ramos, A. M., C. Fernandez, et al. (2006). "Pharmacologic inhibitors of extracellular signal-regulated kinase (ERKs) and c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) decrease glutathione content and sensitize human promonocytic leukemia cells to arsenic trioxide-induced apoptosis." J Cell Physiol **209**(3): 1006-15.
- Ravi, K., L. A. Brennan, et al. (2004). "S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2619-24.
- Reddel, R. R. (2000). "The role of senescence and immortalization in carcinogenesis." Carcinogenesis **21**(3): 477-84.
- RG, I. J., R. T. de Jongh, et al. (2003). "Individuals at increased coronary heart disease risk are characterized by an impaired microvascular function in skin." Eur J Clin Invest **33**(7): 536-42.

- Richter, T., G. Saretzki, et al. (2007). "TRF2 overexpression diminishes repair of telomeric single-strand breaks and accelerates telomere shortening in human fibroblasts." Mech Ageing Dev **128**(4): 340-5.
- Richter, T. and T. von Zglinicki (2007). "A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts." Exp Gerontol **42**(11): 1039-42.
- Rinder, M. R., R. J. Spina, et al. (2000). "Enhanced endothelium-dependent vasodilation in older endurance-trained men." J Appl Physiol **88**(2): 761-6.
- Roberts, C. K., N. D. Vaziri, et al. (2002). "Effect of diet and exercise intervention on blood pressure, insulin, oxidative stress, and nitric oxide availability." Circulation **106**(20): 2530-2.
- Robertson, J. D., R. E. Gale, et al. (2000). "Dynamics of telomere shortening in neutrophils and T lymphocytes during ageing and the relationship to skewed X chromosome inactivation patterns." Br J Haematol **109**(2): 272-9.
- Rocco, J. W., D. Li, et al. (1998). "p16INK4A adenovirus-mediated gene therapy for human head and neck squamous cell cancer." Clin Cancer Res **4**(7): 1697-704.
- Rojas, A. and M. A. Morales (2004). "Advanced glycation and endothelial functions: a link towards vascular complications in diabetes." Life Sci **76**(7): 715-30.
- Roninson, I. B. (2002). "Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts." Cancer Lett **179**(1): 1-14.
- Roovers, K. and R. K. Assoian (2000). "Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery." Bioessays **22**(9): 818-26.
- Ross, R. (1993). "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." Nature **362**(6423): 801-9.

- Ross, R., T. N. Wight, et al. (1984). "Human atherosclerosis. I. Cell constitution and characteristics of advanced lesions of the superficial femoral artery." Am J Pathol **114**(1): 79-93.
- Rosso, A., A. Balsamo, et al. (2006). "p53 Mediates the accelerated onset of senescence of endothelial progenitor cells in diabetes." J Biol Chem **281**(7): 4339-47.
- Roy, N. S., T. Nakano, et al. (2004). "Telomerase immortalization of neuronally restricted progenitor cells derived from the human fetal spinal cord." Nat Biotechnol **22**(3): 297-305.
- Ruas, M. and G. Peters (1998). "The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives." Biochim Biophys Acta **1378**(2): F115-77.
- Rubin, H. (2002). "The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo." Nat Biotechnol **20**(7): 675-81.
- Rudolph, K. L., S. Chang, et al. (1999). "Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice." Cell **96**(5): 701-12.
- Rufer, N., T. H. Brummendorf, et al. (1999). "Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood." J Exp Med **190**(2): 157-67.
- Rufer, N., W. Dragowska, et al. (1998). "Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry." Nat Biotechnol **16**(8): 743-7.
- Ruggero, D., S. Grisendi, et al. (2003). "Dyskeratosis congenita and cancer in mice deficient in ribosomal RNA modification." Science **299**(5604): 259-62.

- Ruiz-Ortega, M., O. Lorenzo, et al. (2000). "Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms." Circ Res **86**(12): 1266-72.
- Sage, J., A. L. Miller, et al. (2003). "Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry." Nature **424**(6945): 223-8.
- Sager, R. (1991). "Senescence as a mode of tumor suppression." Environ Health Perspect **93**: 59-62.
- Saito, H., A. T. Hammond, et al. (1995). "The effect of low oxygen tension on the in vitro-replicative life span of human diploid fibroblast cells and their transformed derivatives." Exp Cell Res **217**(2): 272-9.
- Saldanha, S. N., L. G. Andrews, et al. (2003). "Assessment of telomere length and factors that contribute to its stability." Eur J Biochem **270**(3): 389-403.
- Salk, D., E. Bryant, et al. (1981). "Systematic growth studies, cocultivation, and cell hybridization studies of Werner syndrome cultured skin fibroblasts." Hum Genet **58**(3): 310-6.
- Samani, N. J., R. Boulby, et al. (2001). "Telomere shortening in atherosclerosis." Lancet **358**(9280): 472-3.
- Sandell, L. L. and V. A. Zakian (1993). "Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss." Cell **75**(4): 729-39.
- Sargent, R. G., M. A. Brennehan, et al. (1997). "Repair of site-specific double-strand breaks in a mammalian chromosome by homologous and illegitimate recombination." Mol Cell Biol **17**(1): 267-77.
- Sasaki, J. E. and M. G. dos Santos (2006). "The role of aerobic exercise on endothelial function and on cardiovascular risk factors." Arq Bras Cardiol **87**(5): e226-31.

- Sato, I., I. Morita, et al. (1993). "Reduction of nitric oxide producing activity associated with in vitro aging in cultured human umbilical vein endothelial cell." Biochem Biophys Res Commun **195**(2): 1070-6.
- Sato, M., T. Miyazaki, et al. (1996). "Antioxidants inhibit tumor necrosis factor-alpha mediated stimulation of interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1, and collagenase expression in cultured human synovial cells." J Rheumatol **23**(3): 432-8.
- Sato, Y., T. Kondo, et al. (2001). "Estimation of age of human cadavers by immunohistochemical assessment of advanced glycation end products in the hippocampus." Histopathology **38**(3): 217-20.
- Savitsky, K., A. Bar-Shira, et al. (1995). "A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase." Science **268**(5218): 1749-53.
- Scaffidi, P., L. Gordon, et al. (2005). "The cell nucleus and aging: tantalizing clues and hopeful promises." PLoS Biol **3**(11): e395.
- Schafer, K. A. (1998). "The cell cycle: a review." Vet Pathol **35**(6): 461-78.
- Schaller, M. D., C. A. Borgman, et al. (1992). "pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(11): 5192-6.
- Schini-Kerth, V., A. Bara, et al. (1994). "Pyrrolidine dithiocarbamate selectively prevents the expression of the inducible nitric oxide synthase in the rat aorta." Eur J Pharmacol **265**(1-2): 83-7.
- Schleicher, E. D., E. Wagner, et al. (1997). "Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging." J Clin Invest **99**(3): 457-68.

- Schmidt, A. M., O. Hori, et al. (1995). "Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes." J Clin Invest **96**(3): 1395-403.
- Schneider, E. L. and Y. Mitsui (1976). "The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(10): 3584-8.
- Schuijt, M. P., B. Tom, et al. (2003). "Superoxide does not mediate the acute vasoconstrictor effects of angiotensin II: a study in human and porcine arteries." J Hypertens **21**(12): 2335-44.
- Schulz, V. P., V. A. Zakian, et al. (1996). "Accelerated loss of telomeric repeats may not explain accelerated replicative decline of Werner syndrome cells." Hum Genet **97**(6): 750-4.
- Schulze-Osthoff, K., A. C. Bakker, et al. (1992). "Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation." J Biol Chem **267**(8): 5317-23.
- Schwartz, S. M. and E. P. Benditt (1973). "Cell replication in the aortic endothelium: a new method for study of the problem." Lab Invest **28**(6): 699-707.
- Scott-Burden, T. and P. M. Vanhoutte (1994). "Regulation of smooth muscle cell growth by endothelium-derived factors." Tex Heart Inst J **21**(1): 91-7.
- Serrano, A. L. and V. Andres (2004). "Telomeres and cardiovascular disease: does size matter?" Circ Res **94**(5): 575-84.

- Serrano, M. and M. A. Blasco (2001). "Putting the stress on senescence." Curr Opin Cell Biol **13**(6): 748-53.
- Serrano, M., G. J. Hannon, et al. (1993). "A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4." Nature **366**(6456): 704-7.
- Severino, J., R. G. Allen, et al. (2000). "Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo?" Exp Cell Res **257**(1): 162-71.
- Shackelford, R. E., W. K. Kaufmann, et al. (1999). "Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress." Environ Health Perspect **107 Suppl 1**: 5-24.
- Shambaugh, G. E., 3rd, R. J. Lee, et al. (1996). "Reduced cyclin D1 expression in the cerebella of nutritionally deprived rats correlates with developmental delay and decreased cellular DNA synthesis." J Neuropathol Exp Neurol **55**(9): 1009-20.
- Shapiro, H. M. (1988). Practical Flow Cytometry. New York, John Wiley & Sons.
- Sharma, S., S. Dwivedi, et al. (2002). "Coronary risk variables in young asymptomatic smokers." Indian J Med Res **122**: 205-210.
- Sharma, S. B., S. Dwivedi, et al. (2005). "Coronary risk variables in young asymptomatic smokers." Indian J Med Res **122**(3): 205-10.
- Sharpless, N. E. and R. A. DePinho (1999). "The INK4A/ARF locus and its two gene products." Curr Opin Genet Dev **9**(1): 22-30.
- Shay, J. W. and W. E. Wright (2000). "Hayflick, his limit, and cellular ageing." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 72-6.
- Shay, J. W. and W. E. Wright (2007). "Hallmarks of telomeres in ageing research." J Pathol **211**(2): 114-23.

- Shelton, D. N., E. Chang, et al. (1999). "Microarray analysis of replicative senescence." Curr Biol **9**(17): 939-45.
- Shi, W., M. E. Haberland, et al. (2000). "Endothelial responses to oxidized lipoproteins determine genetic susceptibility to atherosclerosis in mice." Circulation **102**(1): 75-81.
- Siems, W. and T. Grune (2003). "Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal." Mol Aspects Med **24**(4-5): 167-75.
- Simm, A., N. Nass, et al. (2008). "Potential biomarkers of ageing." Biol Chem **389**(3): 257-65.
- Sitte, N., K. Merker, et al. (2000). "Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II--aging of nondividing cells." Faseb J **14**(15): 2503-10.
- Slagboom, P. E., S. Droog, et al. (1994). "Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups." Am J Hum Genet **55**(5): 876-82.
- Slatter, D. A., C. H. Bolton, et al. (2000). "The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus." Diabetologia **43**(5): 550-7.
- Smadja, D. M., A. Cornet, et al. (2007). "Endothelial progenitor cells: characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy." Cell Biol Toxicol **23**(4): 223-39.
- Smith, C. J. and T. H. Fischer (2001). "Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction." Atherosclerosis **158**(2): 257-67.
- Smith, L. L., H. A. Collier, et al. (2003). "Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation." Nat Cell Biol **5**(5): 474-9.

- Smogorzewska, A., B. van Steensel, et al. (2000). "Control of human telomere length by TRF1 and TRF2." Mol Cell Biol **20**(5): 1659-68.
- Sochman, J. (2002). "N-acetylcysteine in acute cardiology: 10 years later: what do we know and what would we like to know?!" J Am Coll Cardiol **39**(9): 1422-8.
- Sohal, R. S. and R. Weindruch (1996). "Oxidative stress, caloric restriction, and aging." Science **273**(5271): 59-63.
- Southern, E. M. (1975). "Long range periodicities in mouse satellite DNA." J Mol Biol **94**(1): 51-69.
- Stanley, A. and T. Osler (2001). "Senescence and the healing rates of venous ulcers." J Vasc Surg **33**(6): 1206-11.
- Stansel, R. M., T. de Lange, et al. (2001). "T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang." Embo J **20**(19): 5532-40.
- Starr, J. M., B. McGurn, et al. (2007). "Association between telomere length and heart disease in a narrow age cohort of older people." Exp Gerontol **42**(6): 571-3.
- Steinberg, D., S. Parthasarathy, et al. (1989). "Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity." N Engl J Med **320**(14): 915-24.
- Steinberg, D. and J. L. Witztum (2002). "Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis?" Circulation **105**(17): 2107-11.
- Stemme, S., B. Faber, et al. (1995). "T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(9): 3893-7.

- Stevens J.K. , L. R. M., J.E. Trogadis (1994). 3D confocal microscopy: volume investigation of biological systems. London, Academic Press.
- Storz, P. (2005). "Reactive oxygen species in tumor progression." Front Biosci **10**: 1881-96.
- Stouffer, G. A. and G. K. Owens (1992). "Angiotensin II-induced mitogenesis of spontaneously hypertensive rat-derived cultured smooth muscle cells is dependent on autocrine production of transforming growth factor-beta." Circ Res **70**(4): 820-8.
- Sugimoto, K., M. Yasujima, et al. (2008). "Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy." Curr Pharm Des **14**(10): 953-61.
- Sukhova, G. K., U. Schonbeck, et al. (1999). "Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques." Circulation **99**(19): 2503-9.
- Sun, A., L. Bagella, et al. (2007). "From G0 to S phase: a view of the roles played by the retinoblastoma (Rb) family members in the Rb-E2F pathway." J Cell Biochem **102**(6): 1400-4.
- Sun, H., J. Zheng, et al. (2007). "Enhanced expression of ANGPTL2 in the microvascular lesions of diabetic glomerulopathy." Nephron Exp Nephrol **105**(4): e117-23.
- Sun, Y. and L. W. Oberley (1996). "Redox regulation of transcriptional activators." Free Radic Biol Med **21**(3): 335-48.
- Suzuki, T., K. T. J, et al. (2002). "Phosphorylation of three regulatory serines of Tob by Erk1 and Erk2 is required for Ras-mediated cell proliferation and transformation." Genes Dev **16**(11): 1356-70.

- Svensjo, E., F. Cyrino, et al. (1999). "Vascular permeability increase as induced by histamine or bradykinin is enhanced by advanced glycation endproducts (AGEs)." J Diabetes Complications **13**(4): 187-90.
- Tabuchi, A., K. Sano, et al. (1994). "Modulation of AP-1 activity by nitric oxide (NO) in vitro: NO-mediated modulation of AP-1." FEBS Lett **351**(1): 123-7.
- Taddei, S., A. Viridis, et al. (2000). "Endothelial dysfunction in hypertension." J Nephrol **13**(3): 205-10.
- Tahara, H., Y. Tokutake, et al. (1997). "Abnormal telomere dynamics of B-lymphoblastoid cell strains from Werner's syndrome patients transformed by Epstein-Barr virus." Oncogene **15**(16): 1911-20.
- Takahashi, A., N. Ohtani, et al. (2006). "Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence." Nat Cell Biol **8**(11): 1291-7.
- Takai, H., A. Smogorzewska, et al. (2003). "DNA damage foci at dysfunctional telomeres." Curr Biol **13**(17): 1549-56.
- Tare, M., H. C. Parkington, et al. (1990). "Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium." Nature **346**(6279): 69-71.
- Tashiro, T., N. Morishige, et al. (2007). "Coronary artery bypass grafting in DES era." Ann Thorac Cardiovasc Surg **13**(1): 5-8.
- Tchirkov, A. and P. M. Lansdorp (2003). "Role of oxidative stress in telomere shortening in cultured fibroblasts from normal individuals and patients with ataxia-telangiectasia." Hum Mol Genet **12**(3): 227-32.

- Thannickal, V. J. and B. L. Fanburg (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(6): L1005-28.
- Thorin-Trescases, N., G. Voghel, et al. (2005). "Pathological aging of the vascular endothelium: are endothelial progenitor cells the sentinels of the cardiovascular system?" Can J Cardiol **21**(12): 1019-24.
- Thorin, E., M. A. Shatos, et al. (1997). "Human vascular endothelium heterogeneity. A comparative study of cerebral and peripheral cultured vascular endothelial cells." Stroke **28**(2): 375-81.
- Tombes, R. M., K. L. Auer, et al. (1998). "The mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade can either stimulate or inhibit DNA synthesis in primary cultures of rat hepatocytes depending upon whether its activation is acute/phasic or chronic." Biochem J **330 (Pt 3)**: 1451-60.
- Torrecillas, G., M. C. Boyano-Adanez, et al. (2001). "The role of hydrogen peroxide in the contractile response to angiotensin II." Mol Pharmacol **59**(1): 104-12.
- Toussaint, O., E. E. Medrano, et al. (2000). "Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes." Exp Gerontol **35**(8): 927-45.
- Touyz, R. M., M. Cruzado, et al. (2003). "Redox-dependent MAP kinase signaling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation." Can J Physiol Pharmacol **81**(2): 159-67.
- Touyz, R. M. and E. L. Schiffrin (2003). "Role of endothelin in human hypertension." Can J Physiol Pharmacol **81**(6): 533-41.

- Toyoshima, F., T. Moriguchi, et al. (1998). "Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint." EMBO J **17**(10): 2728-35.
- Tsuji, T., K. Aoshiba, et al. (2006). "Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema." Am J Respir Crit Care Med **174**(8): 886-93.
- Tsuji, T., S. Nakamura, et al. (2004). "Pulmonary Langerhans cell histiocytosis associated with lingual carcinoma." Intern Med **43**(8): 713-7.
- Uchida, K. (2003). "4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress." Prog Lipid Res **42**(4): 318-43.
- Uhlmann, V., M. Prasad, et al. (2000). "Improved in situ detection method for telomeric tandem repeats in metaphase spreads and interphase nuclei." Mol Pathol **53**(1): 48-50.
- Umansky, V., S. P. Hehner, et al. (1998). "Co-stimulatory effect of nitric oxide on endothelial NF-kappaB implies a physiological self-amplifying mechanism." Eur J Immunol **28**(8): 2276-82.
- Unryn, B. M., L. S. Cook, et al. (2005). "Paternal age is positively linked to telomere length of children." Aging Cell **4**(2): 97-101.
- Urbich, C. and S. Dimmeler (2004). "Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology." Circ Res **95**(4): 343-53.
- Valdes, A., T. Andrew, et al. (2005). "Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women." Lancet **366**(9486): 662-4.
- Valko, M., M. Izakovic, et al. (2004). "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence." Mol Cell Biochem **266**(1-2): 37-56.

- Valko, M., D. Leibfritz, et al. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 44-84.
- Valko, M., H. Morris, et al. (2005). "Metals, toxicity and oxidative stress." Curr Med Chem **12**(10): 1161-208.
- Valko, M., C. J. Rhodes, et al. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chem Biol Interact **160**(1): 1-40.
- van der Loo, B., M. J. Fenton, et al. (1998). "Cytochemical detection of a senescence-associated beta-galactosidase in endothelial and smooth muscle cells from human and rabbit blood vessels." Exp Cell Res **241**(2): 309-15.
- van Steensel, B. and T. de Lange (1997). "Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1." Nature **385**(6618): 740-3.
- Vane, J. R. and R. M. Botting (1994). "Mediators from the endothelial cell and their participation in inflammation." Int J Tissue React **16**(1): 19-49.
- Vanepps, J. S. and D. A. Vorp (2007). "Mechano-pathobiology of atherogenesis: a review." J Surg Res **142**(1): 202-17.
- Varela, I., J. Cadinanos, et al. (2005). "Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation." Nature **437**(7058): 564-8.
- Varga, R., M. Eriksson, et al. (2006). "Progressive vascular smooth muscle cell defects in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(9): 3250-5.

- Vasa, M., S. Fichtlscherer, et al. (2001). "Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease." Circ Res **89**(1): E1-7.
- Vaziri, H. and S. Benchimol (1998). "Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span." Curr Biol **8**(5): 279-82.
- Vaziri, H., W. Dragowska, et al. (1994). "Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(21): 9857-60.
- Veitonmaki, N., J. Fuxe, et al. (2003). "Immortalization of bovine capillary endothelial cells by hTERT alone involves inactivation of endogenous p16INK4A/pRb." Faseb J **17**(6): 764-6.
- Voghel G, T.-T. N., Farhat N, Nguyen A, Villeneuve L, Mamarbachi AM, Fortier A, Perrault LP, Carrier M, Thorin E (2007). "Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors." Mech Ageing Dev **In press**.
- Voghel, G., N. Thorin-Trescases, et al. (2008). "Chronic treatment with N-acetylcystein delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients." Mech Ageing Dev **129**(5): 261-70.
- Voghel, G., N. Thorin-Trescases, et al. (2007). "Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors." Mech Ageing Dev **128**(11-12): 662-71.
- von Zglinicki, T. (2002). "Oxidative stress shortens telomeres." Trends Biochem Sci **27**(7): 339-44.

- von Zglinicki, T. and C. M. Martin-Ruiz (2005). "Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases." Curr Mol Med **5**(2): 197-203.
- von Zglinicki, T., G. Saretzki, et al. (2005). "Human cell senescence as a DNA damage response." Mech Ageing Dev **126**(1): 111-7.
- Vona, M., A. Rossi, et al. (2004). "Impact of physical training and detraining on endothelium-dependent vasodilation in patients with recent acute myocardial infarction." Am Heart J **147**(6): 1039-46.
- Wack, A., A. Cossarizza, et al. (1998). "Age-related modifications of the human alphabeta T cell repertoire due to different clonal expansions in the CD4+ and CD8+ subsets." Int Immunol **10**(9): 1281-8.
- Wang, J. C. (1985). "DNA topoisomerases." Annu Rev Biochem **54**: 665-97.
- Wang, W., J. X. Chen, et al. (2002). "Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence." Mol Cell Biol **22**(10): 3389-403.
- Wannamethee, S., G. Lowe, et al. (2005). "Associations between cigarette smoking, pipe/cigar smoking, and smoking cessation, and haemostatic and inflammatory markers for cardiovascular disease." Eur Heart J **26**(17): 1765-73.
- Wassmann, S., U. Laufs, et al. (2001). "HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species." Hypertension **37**(6): 1450-7.
- Wassmann, S., U. Laufs, et al. (2002). "Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(2): 300-5.

- Wautier, M. P., P. Massin, et al. (2003). "N(carboxymethyl)lysine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients." Diabetes Metab **29**(1): 44-52.
- Weber, J. D., D. M. Raben, et al. (1997). "Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase." Biochem J **326 (Pt 1)**: 61-8.
- Weinberg, R. A. (1995). "The retinoblastoma protein and cell cycle control." Cell **81**(3): 323-30.
- Wellinger, R. J., K. Ethier, et al. (1996). "Evidence for a new step in telomere maintenance." Cell **85**(3): 423-33.
- Werner, N. and G. Nickenig (2006). "Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells: limitations for therapy?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(2): 257-66.
- Werner, N., S. Wassmann, et al. (2007). "Endothelial progenitor cells correlate with endothelial function in patients with coronary artery disease." Basic Res Cardiol **102**(6): 565-71.
- Westphal, C. H., M. A. Dipp, et al. (2007). "A therapeutic role for sirtuins in diseases of aging?" Trends Biochem Sci **32**(12): 555-60.
- Wink, D. A., J. F. Darbyshire, et al. (1993). "Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O₂ reaction." Chem Res Toxicol **6**(1): 23-7.
- Wink, D. A., R. W. Nims, et al. (1994). "Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the

- fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O₂ reaction." Chem Res Toxicol **7**(4): 519-25.
- Wolin, M. S., T. M. Burke-Wolin, et al. (1999). "Roles for NAD(P)H oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms." Respir Physiol **115**(2): 229-38.
- Woods, D., D. Parry, et al. (1997). "Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1." Mol Cell Biol **17**(9): 5598-611.
- Wright, W. E., M. A. Piatyszek, et al. (1996). "Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells." Dev Genet **18**(2): 173-9.
- Wright, W. E. and J. W. Shay (1995). "Time, telomeres and tumours: is cellular senescence more than an anticancer mechanism?" Trends Cell Biol **5**(8): 293-7.
- Wyllie, F. S., C. J. Jones, et al. (2000). "Telomerase prevents the accelerated cell ageing of Werner syndrome fibroblasts." Nat Genet **24**(1): 16-7.
- Xia, J. H., A. N. Xie, et al. (2006). "The vascular endothelial growth factor expression and vascular regeneration in infarcted myocardium by skeletal muscle satellite cells." Chin Med J (Engl) **119**(2): 117-21.
- Xiang, H., J. Wang, et al. (2002). "Human telomerase accelerates growth of lens epithelial cells through regulation of the genes mediating RB/E2F pathway." Oncogene **21**(23): 3784-91.
- Xiang, H., J. Wang, et al. (2000). "hTERT can function with rabbit telomerase RNA: regulation of gene expression and attenuation of apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **278**(3): 503-10.

- Yamagishi, S., S. Ueda, et al. (2008). "Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in diabetic retinopathy." Curr Pharm Des **14**(10): 962-8.
- Yamamoto, K., T. Takahashi, et al. (2003). "Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress." J Appl Physiol **95**(5): 2081-8.
- Yanagisawa, M., H. Kurihara, et al. (1988). "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." Nature **332**(6163): 411-5.
- Yang, J., E. Chang, et al. (1999). "Human endothelial cell life extension by telomerase expression." J Biol Chem **274**(37): 26141-8.
- Yang, L., T. Suwa, et al. (2001). "Telomere shortening and decline in replicative potential as a function of donor age in human adrenocortical cells." Mech Ageing Dev **122**(15): 1685-94.
- Yang, Y. and J. Loscalzo (2005). "S-nitrosoprotein formation and localization in endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(1): 117-22.
- Yates, F. E. B., L.A. (1955). Loss of integration and resiliency with age: a dissipative destruction. New-York.
- Yeager, T. R., S. DeVries, et al. (1998). "Overcoming cellular senescence in human cancer pathogenesis." Genes Dev **12**(2): 163-74.
- Yeager, T. R., A. A. Neumann, et al. (1999). "Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body." Cancer Res **59**(17): 4175-9.
- Yin, D. (1996). "Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores." Free Radic Biol Med **21**(6): 871-88.

- Yokohori, N., K. Aoshiba, et al. (2004). "Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema." Chest **125**(2): 626-32.
- Yoon, S. O., C. H. Yun, et al. (2002). "Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging." Mech Ageing Dev **123**(12): 1597-604.
- Yoshida, Y., T. Nakamura, et al. (2003). "Mice lacking a transcriptional corepressor Tob are predisposed to cancer." Genes Dev **17**(10): 1201-6.
- Yu, B. P., C. M. Kang, et al. (1998). "Can antioxidant supplementation slow the aging process?" Biofactors **7**(1-2): 93-101.
- Yu, G. L., J. D. Bradley, et al. (1990). "In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs." Nature **344**(6262): 126-32.
- Zafarullah, M., W. Q. Li, et al. (2003). "Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions." Cell Mol Life Sci **60**(1): 6-20.
- Zahradka, P., J. P. Werner, et al. (2002). "NF-kappaB activation is essential for angiotensin II-dependent proliferation and migration of vascular smooth muscle cells." J Mol Cell Cardiol **34**(12): 1609-21.
- Zdanov, S., F. Debacq-Chainiaux, et al. (2006). "Identification of p38MAPK-dependent genes with changed transcript abundance in H2O2-induced premature senescence of IMR-90 hTERT human fibroblasts." FEBS Lett **580**(27): 6455-63.
- Zeff, R. H., C. Kongtahworn, et al. (1988). "Internal mammary artery versus saphenous vein graft to the left anterior descending coronary artery: prospective randomized study with 10-year follow-up." Ann Thorac Surg **45**(5): 533-6.

- Zhang, H., A. Schmeisser, et al. (1999). "Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases." Cardiovasc Res **44**(1): 215-22.
- Zhang, L., H. Aviv, et al. (2000). "Loss of chromosome 13 in cultured human vascular endothelial cells." Exp Cell Res **260**(2): 357-64.
- Zhang, Q. H. and M. P. She (2007). "Biological behaviour and role of endothelial progenitor cells in vascular diseases." Chin Med J (Engl) **120**(24): 2297-303.
- Zhang, X., V. Mar, et al. (1999). "Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells." Genes Dev **13**(18): 2388-99.
- Zhu, J. H., Q. M. Tao, et al. (2004). "Statins contribute to enhancement of the number and the function of endothelial progenitor cells from peripheral blood." Sheng Li Xue Bao **56**(3): 357-64.
- Zindy, F., H. Soares, et al. (1997). "Expression of INK4 inhibitors of cyclin D-dependent kinases during mouse brain development." Cell Growth Differ **8**(11): 1139-50.
- Zink, M. H., C. L. Oltman, et al. (2001). "12-lipoxygenase in porcine coronary microcirculation: implications for coronary vasoregulation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**(2): H693-704.
- Zou, Y., A. Sfeir, et al. (2004). "Does a sentinel or a subset of short telomeres determine replicative senescence?" Mol Biol Cell **15**(8): 3709-18.
- Zuckerbraun, B. S., D. A. Stoyanovsky, et al. (2007). "Nitric oxide-induced inhibition of smooth muscle cell proliferation involves S-nitrosation and inactivation of RhoA." Am J Physiol Cell Physiol **292**(2): C824-31.

