



HAL
open science

Identification et caractérisation d'un nouveau marqueur de la sénescence cellulaire : la protéine WNT16B

Romuald Binet

► **To cite this version:**

Romuald Binet. Identification et caractérisation d'un nouveau marqueur de la sénescence cellulaire : la protéine WNT16B. Biologie cellulaire. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV007 . tel-00604466

HAL Id: tel-00604466

<https://theses.hal.science/tel-00604466>

Submitted on 29 Jun 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie Cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Romuald BINET

Thèse dirigée par **Christian BRAMBILLA** et
codirigée par **Rémy PEDEUX**

préparée au sein du **Laboratoire INSERM U823/UJF – Institut
Albert Bonniot – Equipe Bases Moléculaires de la Progression
des Cancers du Poumon**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Identification et Caractérisation d'un Nouveau Marqueur de la Sénescence Cellulaire : la Protéine WNT16B

Thèse soutenue publiquement le **31 mars 2011**,
devant le jury composé de :

Dr Claude CARON DE FROMENTEL

DR2, INSERM U590, Lyon - Rapporteur

Dr Oliver BISCHOF

CR1, INSERM U993, Paris - Rapporteur

Pr Elisabeth BRAMBILLA

PU/PH, INSERM U823, Grenoble - Examineur

Dr Jean-François DORE

DRE, INSERM U590, Lyon - Examineur

Pr Christian BRAMBILLA

PU/PH, INSERM U823, Grenoble – Examineur

Dr Rémy PEDEUX

CR1, INSERM U917, Rennes – Examineur



« C'est à force d'observation, de réflexion, que l'on trouve. »

Monet à Frédéric Bazille, 15 juillet 1864

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à adresser ma gratitude aux Prs Elisabeth et Christian Brambilla pour m'avoir accueilli au sein de l'unité INSERM U578, devenue depuis l'équipe 2 de l'unité INSERM U823. Je souhaite également remercier les différentes personnes qui m'ont encadré depuis mon master : le Dr Sylvie Gazzeri en M1, le Dr Rémy Pedoux en M2 et en Thèse, conjointement avec le Pr Christian Brambilla. Je tiens également à remercier la Fondation pour le Recherche Médicale (FRM) et en particulier le Dr Nadine Josso qui a créé le prix Mariane Josso, lequel a financé les trois premières années de ma thèse. De la même façon, je remercie l'Association pour la Recherche sur le Cancer pour l'attribution de ma bourse de quatrième année. Je remercie également les membres de mon jury, les Dr Claude Caron de Fromentel et Oliver Bischof, et le Pr Jean-François Doré, d'une part d'avoir accepté d'en faire partie, d'autre part d'avoir fait le déplacement pour ma soutenance et pour les rapporteurs d'avoir pris sur leur temps pour évaluer mon rapport.

Parce que tout a commencé en M1, j'ai une grosse pensée pour Céline Lampréia (oui tu es mariée maintenant mais je ne me souviens plus de ton nouveau nom !) qui a été ma première formatrice à la paillasse. Ta bonne humeur restera inoubliable !

L'année de M2 a été un tournant puisque j'ai commencé à travailler sur le sujet qui serait par la suite l'objet de ma thèse. Cette année a également été celle de la rencontre du

maintenant Docteur Damien Ythier (Dam's), qui m'a indéniablement tiré vers le haut aussi bien intellectuellement que techniquement, et de Damien Nissou, compagnon de boulettes mais surtout un excellent camarade.

C'est en thèse que j'ai finalement fait la connaissance du dernier membre du « ING Group », le désormais Docteur Delphine Larrieu, qui bien que je lui répétais régulièrement qu'elle ne servait à rien (!), était un modèle de qualité et de rigueur scientifique, autant qu'une personne humainement incomparable. On a fini tous les deux et ça aurait été difficile si on ne s'était pas entendu comme ça.

Je remercie chaleureusement nos collaborateurs qui ont permis l'aboutissement d'une partie de ce travail, les Drs Manuel Serrano et Manuel Collado de Madrid, le Pr Curtis Harris et le Dr Ana Robles de Bethesda.

D'autres rencontres ont jalonné mon parcours, notamment le personnel de la plateforme de protéomique gérée par le Pr Michel Seve, et je pense plus particulièrement à Jérôme Chenau. Je citerai également l'équipe du Pr Elisabeth Brambilla qui m'a accueilli pendant quelques semaines dans son laboratoire d'immunohistochimie, alors merci à Nicolas Lemaître, Laurence David-Boudet et Adrien Mombrun. Enfin, une pensée pour l'ensemble de l'ex-unité U578 et des équipes 2, 5 et 11 de l'unité U823.

Sur un plan plus personnel, je tiens à citer le nom de ces collègues devenus mes amis, Anastassia Karageorgis, Christiane Wenk, le Dr Molière N'Guile-Makao, Aurélien Vésin, Adrien Français, Sébastien Botagissi et Thomas Lloret. Les souvenirs d'une thèse ne s'accumulent pas essentiellement au labo, alors merci pour les bons moments passés ensemble.

Je tiens à remercier ma Maman, pour qui mon départ à Grenoble a été difficile mais qui a toujours été à mes côtés lorsque j'avais besoin d'elle. Une grosse pensée pour ma Mamie, toujours là elle aussi. Et bien que tout ne se soit pas passé comme on l'aurait voulu, je remercie la mère de mon fils Luc, grâce à qui d'une certaine façon cette aventure a commencé puisque c'est sur son impulsion que nous nous sommes retrouvés à Grenoble.

J'ai une pensée tendre pour Toi, qui es entrée dans ma vie cette dernière année, qui m'as soutenue pendant la rédaction du rapport, qui a partagé mes doutes et mes galères, et qui as accepté de t'engager avec moi pour longtemps encore... Merci.

Enfin, parce que ma thèse n'est que mon second bébé, je pense à mon fils Luc, né alors que je finissais mon master. Tu as été mon plus grand bonheur ces presque cinq dernières années, tu as supporté mes indisponibilités de thésard et tu as subi les choix de tes parents. Ta présence a rendu ma thèse inoubliable. Pardon et merci.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	7
ABREVIATIONS	11
LISTE DES FIGURES.....	15
LISTE DES TABLES.....	17
LISTE DES PUBLICATIONS	18
PREAMBULE	19
INTRODUCTION	21
1. La sénescence cellulaire	21
1.1. La sénescence réplivative	23
1.1.1. La limite de Hayflick.....	23
1.1.2. Les télomères.....	23
Mise en évidence chez <i>Tetrahymena thermophila</i>	25
Structure des télomères humains.	25
Principales fonctions des télomères.....	27
1.1.3. La télomérase.	29
Historique.....	29
Le complexe télomérase et son mode d'action.....	30
La télomérase in vivo.	31
1.1.4. Le raccourcissement des télomères : « end-replication problem »	33

Le problème de la réplication des télomères	33
Une activité exonucléasique à l'origine de l'extrémité 3' simple brin	33
Les autres acteurs impliqués dans la génération de l'extrémité 3' simple brin.	36
Le rôle du stress oxydatif dans le raccourcissement des télomères.	36
Le signal d'entrée en sénescence.....	37
1.1.5. La sénescence répllicative est une réponse aux dommages de l'ADN	39
Des protéines de la DDR s'accumulent au niveau des télomères.....	39
Rôle des voies DDR dans le processus de sénescence répllicative.....	43
1.1.6. L'inhibition du cycle cellulaire.....	44
La protéine suppressive de tumeur p53	44
Sénescence et p53.....	46
Régulation du facteur de transcription p53.....	47
L'inhibiteur des CDK : p21	48
La protéine pRB	49
Un autre inhibiteur des CDK : p16.....	51
1.2. La sénescence cellulaire prématurée	52
1.2.1. La sénescence prématurée induite par un stress (SIPS).....	52
Le stress oxydatif.....	52
La sénescence prématurée induite par des dommages à l'ADN.....	52
1.2.2. La sénescence prématurée induite par un oncogène	53
1.3. Les autres caractéristiques des cellules sénescents	55
1.3.1. Morphologie	55
1.3.2. L'activité β -galactosidase spécifique de la sénescence (SA- β Gal).....	57
1.3.3. Les foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF)	58
Les protéines impliquées dans la formation des SAHF.	58
Rôle des SAHF dans l'arrêt du cycle cellulaire.	59
1.3.4. La résistance à l'apoptose.....	60
Les cellules sénescents expriment des protéines anti-apoptotiques.	60
Le choix entre sénescence et apoptose.	60
1.4. La sénescence cellulaire – <i>in vivo</i>	61
1.4.1. La sénescence est un mécanisme de suppression tumorale	61
1.4.2. Effets néfastes de l'accumulation de cellules sénescents.....	65
Sénescence et vieillissement.....	65
Sénescence et promotion tumorale.....	67
1.4.3. Utilisation des cellules sénescents en clinique.....	71
Utilisation des marqueurs de sénescence dans le diagnostic et le pronostic.....	71
Applications thérapeutiques	71

2. Les protéines WNT	73
2.1. Les membres de la famille WNT chez l'Homme	73
2.1.1. Découverte de WNT1	73
2.1.2. Caractéristiques générales des protéines WNT	74
2.2. Les voies de signalisation WNT	77
2.2.1. Les récepteurs	77
2.2.2. Les inhibiteurs extracellulaires	78
2.2.3. La voie WNT/ β -caténine	80
2.2.4. La voie de polarité planaire	82
2.2.5. La voie du calcium	85
2.2.6. Les autres voies de signalisation indépendantes de la β -caténine	86
2.3. WNT16	90
2.3.1. Le gène <i>WNT16</i>	90
2.3.2. Les protéines WNT16	91
2.3.3. Orthologues et paralogues	93
2.3.4. Expression <i>in vivo</i>	93
2.3.5. WNT16 dans le tissu hématopoïétique	94
2.3.6. Autres rôles dans le développement et les cancers	95
2.3.7. Voies de signalisation activées par WNT16	96
3. Objectif et stratégie de l'étude	97
 RESULTATS	 98
1. Mise en évidence des fonctions de WNT16B dans la régulation de l'entrée en sénescence	98
1.1. WNT16B est un nouveau marqueur de la sénescence cellulaire	98
1.2. WNT16B est nécessaire pour l'entrée en sénescence répllicative	99
1.3. WNT16B régule l'activité transcriptionnelle de p53	100
1.4. WNT16B active la voie PI3K/AKT	101
Publication n°1 WNT16 Is a New Marker of Cellular Senescence That Regulates p53 Activity and the Phosphoinositide 3-Kinase/AKT Pathway.	103
 2. L'expression de WNT16 dans les CPNPC est associée à l'expression d'un marqueur de la sénescence et à un meilleur pronostic	 139
2.1. L'expression de WNT16 n'est pas altérée dans les CPNPC	139
2.2. WNT16 est exprimé dans le stroma tumoral	139
2.3. L'expression de WNT16 dans les tumeurs corrèle avec la SA- β -Gal.	140
2.4. L'expression de WNT16 est associée à un meilleur pronostic	140

DISCUSSION	171
1. Les voies de signalisation WNT non canoniques sont associées à la sénescence réplivative	171
2. WNT16B est un nouveau marqueur de la sénescence cellulaire	172
3. WNT16B et AKT.....	174
4. WNT16B et p53	176
5. WNT16 et croissance tumorale	178
6. L'importance des facteurs solubles	181
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	183
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	187
ANNEXES.....	200
1. Publication n°3	201
2. Publication n°4	209
3. Publication n°5	217

ABBREVIATIONS

4EBP1	eIF4E-binding protein
53BP1	TP53-binding protein 1
α SMA	α Smooth muscle actin
ADK	Adénocarcinome
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AKT	AKR mouse thymoma
ALL	Acute lymphoblastoid leukemia
APC	Adenomatous polyposis of the colon
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférent
ASF1a	Anti-silencing function 1
ASK1	Apoptosis-signal regulating kinase 1
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
BAD	BCL-2 antagonist of cell death
BCL-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BCL-xL	BCL-2 related protein, long isoform
BIM	BCL-2 interacting protein
CAF	Cancer-associated fibroblast
CAMKII	Ca ⁺⁺ /Calmodulin-dependent protein kinase II
CBP	CREB-binding protein
CDK	Cyclin-dependant kinase
CDKI	Cyclin-dependant kinase inhibitor
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
CHK2	Checkpoint protein 2
CIP1	CDK-interacting protein 1
CKI α	Casein kinase I α
CLL	Chronic lymphoblastoid leukemia
CPNPC	Carcinome pulmonaire non à petites cellules
CRD	Cysteine-rich domain
CREB	cAMP response element-binding protein

CXCR2	Chemokine, CXC motif, receptor 2
DAAM1	Dishevelled-associated activator of morphogenesis
DAG	Diacylglycérol
DAPI	4'6'-diamidino-2-phénylindole
DDR	DNA damage response
DVL	Dishevelled
E2A	Immunoglobulin enhancer-binding factors E12/E47
E2F	E2 factor
eIF4E	Eucaryote initiation factor 4E
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
Ets1	E26 transformation specific
FAS	Apoptosis Stimulating Fragment
FOX	Forkhead box
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 β
H3K9m	Histone H3 méthylée sur la lysine 9
HIF1 α	Hypoxia-inducible factor
HIRA	Histone cell cycle defective A
HMEC	Human mammary epithelial cells
HP1	Heterochromatin protein 1
HPV	Human papillomavirus
HR	Homologous recombination
HSC	Hematopoietic stem cell
hTERC	human telomerase RNA component
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
Id1	Inhibitor of DNA binding 1
IGF	Insulin growth factor
IGFBP	Insulin growth factor-binding protein
IKK	Inhibitor of kappa light chain gene enhancer in B cells, kinase of
IL	Interleukin
INCa	Institut National du Cancer
INK4A	Inhibitor of CDK4 A
InsP3	Inositol-1,4,5-trisphosphate
INT1	Integration 1
JNK	c-Jun NH2-terminal kinase
KIP2	Kinase inhibitory protein 2
LRP	Low-density lipoprotein receptor-related protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
MDM-2	Mouse double minute 2
MEF	Mouse embryonic fibroblasts

MEK	MAK/ERK kinase
MMTV	Mouse mammary tumor virus
MRE11	Meiotic recombination 11
MRN	MRE11/RAD50/NBS1 complex
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MYC	Myelocytose
NBS1	Nijmegen breakage syndrome
NFAT	Nuclear factor of activated t-cells
NFκB	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B cells
NHEJ	Non-homologous end joining
NOLA3	Nucleolar protein family A
OIS	Oncogene-induced senescence
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
PBN	N-tert-butyl-alpha-phénylnitrone
PBX1	Pre-B cells leukemia transcription factor
PCAF	p300/CBP-associated factor
PCP	Planar cell polarity pathway
PDL	Population doubling level
PERP	p53 effector related to PMP22
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
PIN	Prostate Intraepithelial Neoplasia
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase C
PML	Promyelocytic leukemia
POT1	Protection of telomeres 1
PP2A	Protein phosphatase 2A
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTOP	POT1- and TIN2-organizing protein
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
RAC2	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2
RAD50	Radiation-sensitive mutation 50
RAF	Rat fibrosarcoma. BRAF : B1
RAP1	Transcriptional activator/repressor protein 1
RAS	Rat sarcoma. HRAS : Harvey ; KRAS : Kirsten ; NRAS : Neuroblastoma
RB	Retinoblastoma protein
RHO	Ras homolog gene family
ROCK	Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase
ROR2	Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor
RYK	Related to tyrosine kinase
SAHF	Senescence-associated heterochromatin foci
SAPK	Stress-activated protein kinase

SASP	Senescence-associated secretory phenotype
SA- β -Gal	Senescence-associated β -galactosidase
SCC	Squamous cell carcinoma
SDI1	Senescent cell-derived inhibitor 1
SFRP	Secreted Frizzeld-related protein
SIPS	Stress-induced premature senescence
SMC1	Structural maintenance of chromosome 1
SMS	Senescence messaging secretome
SV40	Simian virus 40
TAM	Tumor-associated macrophages
TCAB1	Telomere Cajal body protein 1
TCF/LEF	T-cell factor / Lymphoid enhancer-binding factor
TGF	Transformin growth factor
TIF	Telomere dysfunction-induced foci
TIN2	TRF1-interacting nuclear factor 2
TNFRSF	Tumor necrosis factor receptor superfamily
TRF	Telomeric repeat-binding factor
TSC1/2	Tuberous sclerosis complex 1/2
UVB	Ultra-violets B
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VSMC	Vascular smooth muscle cells
WAF1	Wildtype p53-activated fragment 1
WGEF	Weak similarity guanine nucleotide exchange factor
WIF	WNT inhibitory factor
WIG1	Wildtype p53-induced gene
WNT	Wingless-type MMTV integration site
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Les principales étapes conduisant à l'entrée en sénescence cellulaire.....	22
Figure 2. Le raccourcissement des télomères et la limite de Hayflick.....	24
Figure 3. Le télosome.....	26
Figure 4. Recombinaison homologue et NHEJ.	28
Figure 5. Mode d'action de la télomérase.....	32
Figure 6. Modèle de réplication des télomères.....	34
Figure 7. Signalisation des cassures double brin par la kinase ATM.....	40
Figure 8. Signalisation des dommages à l'ADN par la voie ATR.....	42
Figure 9. Le cycle cellulaire eucaryote.....	45
Figure 10. Acteurs protéiques de la transition G1/S.	50
Figure 11. Modifications morphologiques des fibroblastes sénescents.....	56
Figure 12. Développement des lésions préneoplasiques dans le cancer du poumon. ..	63
Figure 13. Sénescence cellulaire et promotion tumorale.....	70
Figure 14. Structure des ARN et protéines WNT.....	75

Figure 15. La voie WNT/β-caténine.	81
Figure 16. Voies de signalisation WNT non canoniques.	83
Figure 17. La voie PI3K/AKT.	88
Figure 18. Le gène WNT16.	92
Figure 19. Modèle d'action de WNT16B dans le microenvironnement tumoral.	184

LISTE DES TABLES

Tableau 1. Les gènes WNT chez l'Homme.....	76
Tableau 2. Les interactions WNT/récepteur décrites chez l'Homme.	79
Tableau 3. Synthèse bibliographique des variants de WNT16 étudiés dans les différents travaux.	91

LISTE DES PUBLICATIONS

Publication n°1 - WNT16 is a New Marker of Cellular Senescence that Regulates p53 Activity and the Phosphoinositide 3-Kinase/AKT Pathway	103
Manuscrit de la publication n°2 - WNT16 Expression in NSCLC is Associated with Cellular Senescence	142
Publication n°3 - Expression of Candidate Tumor Suppressor Gene ING2 is Lost in Non-Small Cell Lung Carcinoma	201
Publication n°4 - ING2 Controls the Progression of DNA Replication Forks to Maintain Genome Stability	209
Publication n°5 - Sumoylation of ING2 Regulates the Transcription Mediated by SIN3A	217

PREAMBULE

Le cancer est une pathologie caractérisée par une prolifération cellulaire anarchique. Les cellules tumorales colonisent les tissus, affectant le fonctionnement des organes et pouvant conduire au décès du patient. La tumorigenèse, conduisant à la transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale, est un processus multi-étapes. Elle se définit par l'accumulation d'évènements mutationnels qui conduisent à la perte de contrôle du cycle cellulaire et à l'inhibition des mécanismes de suppression tumorale. Les deux principaux sont l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, et la sénescence cellulaire, caractérisée par un arrêt irréversible du cycle cellulaire. De plus, les cellules tumorales ont besoin d'un microenvironnement favorable pour survivre et proliférer. Ce microenvironnement est composé principalement de fibroblastes, de cellules immunitaires, de vaisseaux sanguins et d'une matrice extracellulaire. La compréhension des mécanismes de la tumorigenèse d'une part, et des modifications qui affectent le microenvironnement au cours du développement tumoral d'autre part, est indispensable pour pouvoir améliorer le diagnostic des patients et mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Il est intéressant de noter que l'incidence des cancers d'origine épithéliale, comme par exemple les cancers du poumon, augmente avec l'âge. En effet, l'Institut National du Cancer (INCa) a estimé l'apparition de 357500 nouveaux cas de cancers en France en 2010, dont

57,5% concernaient les personnes âgées de plus de 65 ans (INCa 2010). Ce lien entre vieillissement et cancer suggère que des modifications affectant l'organisme avec l'âge augmentent le risque de développement tumoral. Un modèle a été proposé pour expliquer ce phénomène. Avec l'âge, le nombre de cellules porteuses de mutations génétiques augmente, résultant d'une exposition continue à des agents mutagènes et de la baisse d'efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN. En parallèle, le nombre de cellules sénescents augmente dans les tissus. Les cellules sénescents possèdent un sécrétome particulier, appelé SASP (*Senescence-associated secretory phenotype*), composé de cytokines, de facteurs de croissance et d'enzymes de modification de la matrice extracellulaire. Le SASP stimule la prolifération des cellules porteuses de mutations et agit sur leur microenvironnement, le rendant permissif au développement tumoral (Campisi 2000). Ainsi, la sénescence cellulaire ferait le lien entre vieillissement et cancer.

Dans ce contexte, je me suis intéressé au cours de ma thèse à identifier et caractériser une nouvelle protéine du SASP : WNT16B (*Wingless-type MMTV integration site, member 16*). Afin d'introduire les résultats de mes travaux, je détaillerai tout d'abord les mécanismes qui contrôlent l'entrée des cellules en sénescence chez l'Homme, puis je présenterai les caractéristiques générales de la famille des protéines WNT avant de faire le point sur l'état des connaissances concernant WNT16B.

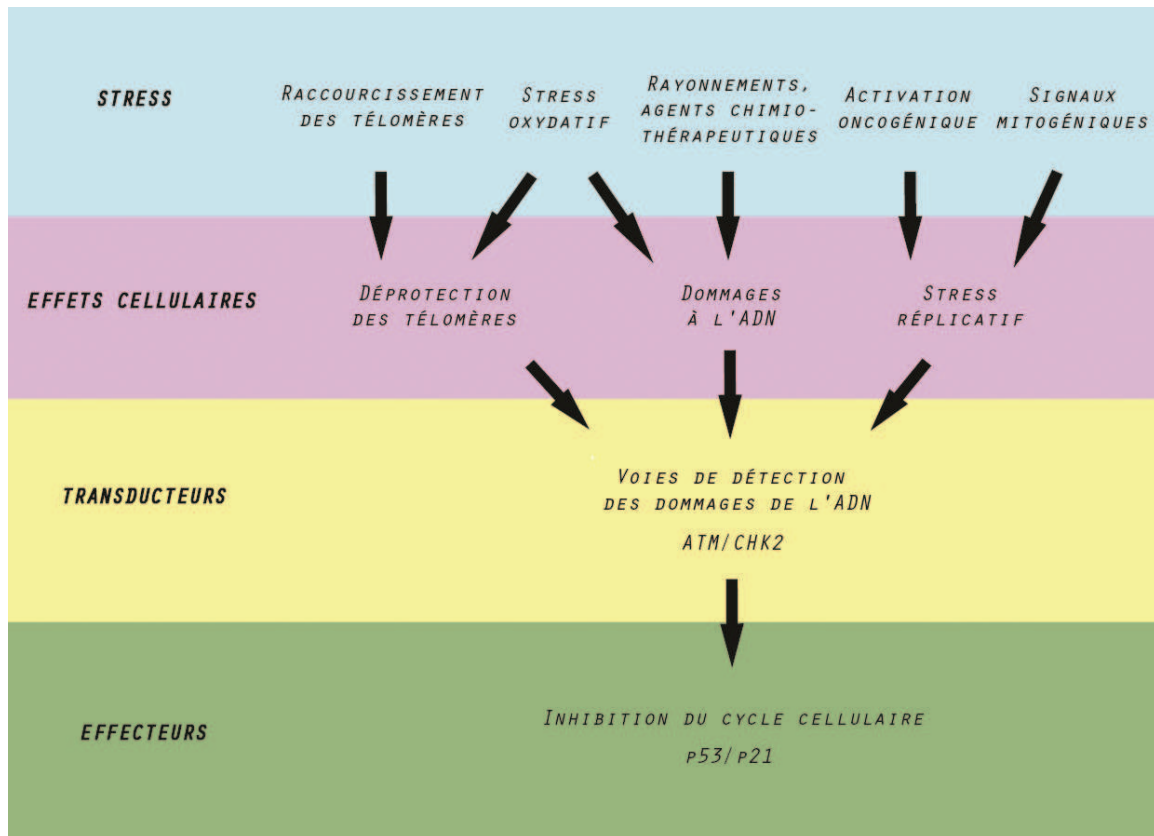
INTRODUCTION

1. LA SÉNESCENCE CELLULAIRE

On appelle sénescence cellulaire un état de différenciation avancé caractérisé par un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Cet état est la conséquence de l'exposition à des stress cellulaires qui menaceraient la survie de la cellule si celle-ci continuait à se diviser. Il existe plusieurs stimuli capables d'induire l'entrée en sénescence : le raccourcissement ou la déstabilisation des télomères, les stress génotoxiques comme les rayons X ou le stress oxydatif, ou encore l'activation d'oncogènes comme Ras. D'un point de vue morphologique, les cellules entrées en sénescence sont plus larges, avec un volume cytoplasmique et nucléaire accrus. Elles expriment également un marqueur spécifique nommé SA- β -Gal (β -galactosidase associée à la sénescence). D'un point de vue fonctionnel, les cellules sénescents activent deux types de voies de signalisation : les cascades des protéines de reconnaissance des dommages à l'ADN et les voies d'inhibition de la progression du cycle cellulaire. Les principales étapes qui conduisent à l'entrée en sénescence sont présentées **Figure 1**. La première partie de cette introduction a pour but de décrire l'état actuel des connaissances des principaux composants des voies de signalisation régulant l'entrée et le maintien de la sénescence chez l'Homme, en prenant comme modèle la sénescence induite par le raccourcissement des télomères, appelée sénescence réplivative.

Figure 1. Les principales étapes conduisant à l'entrée en sénescence cellulaire.

Sous l'effet du raccourcissement des télomères (on parle de sénescence réplivative), d'agents exogènes (rayonnements, agents chimiothérapeutiques, signaux mitogéniques) ou endogènes (stress oxydatif, activation oncogénique) qui endommagent l'ADN, la cellule active la voie de réponse aux dommages ATM/CHK2. La protéine p53 est ensuite activée, stimulant l'expression de l'inhibiteur des CDK p21, et conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire.



1.1. LA SENESCENCE REPLICATIVE

1.1.1. LA LIMITE DE HAYFLICK

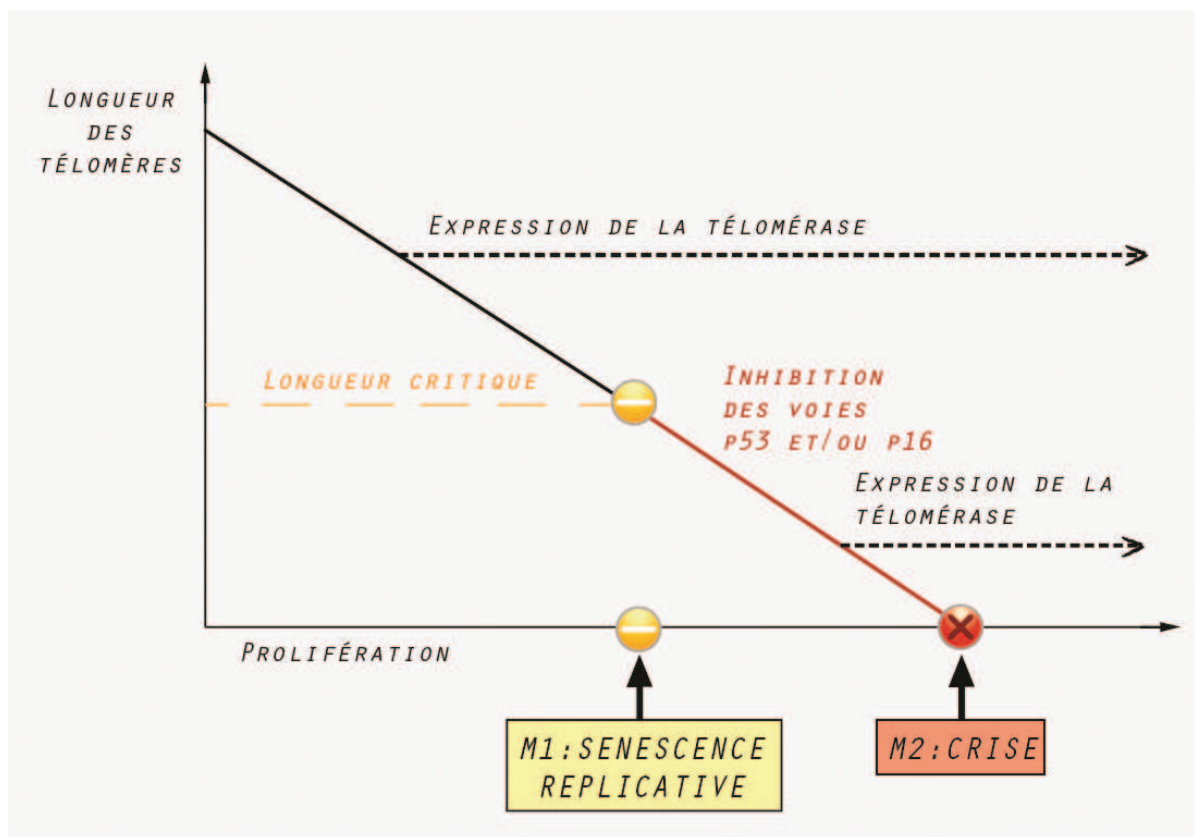
Jusqu'en 1961, il était admis que les cellules étaient immortelles. En effet, les laboratoires disposaient de lignées cellulaires dérivées de cellules tumorales qui pouvaient se multiplier indéfiniment en culture. Alors qu'ils établissaient les propriétés cellulaires de lignées fibroblastiques pulmonaires isolées à partir de fœtus, Leonard Hayflick et Paul Moorhead ont observé que ces cellules possédaient une capacité de prolifération *in vitro* limitée (en moyenne 50 doublements de population pour les fibroblastes WI utilisés dans cette étude) avant de dégénérer (HAYFLICK and MOORHEAD 1961). Le nombre de divisions subi par chaque cellule avant l'arrêt de prolifération ne dépendait que de la lignée cellulaire considérée et n'était pas lié à des signaux externes, tels que la congélation des cellules ou les modifications des conditions de culture (HAYFLICK 1965). L. Hayflick et P. Moorhead proposèrent que l'arrêt de prolifération observé après un nombre défini de divisions cellulaires fût l'expression d'un vieillissement cellulaire, ou sénescence cellulaire. Il fut par la suite nommé « limite de Hayflick » (**Figure 2**). Cette découverte a révolutionné le domaine de la gérontologie en proposant l'hypothèse de l'« horloge mitotique » pour expliquer le vieillissement. Aujourd'hui, il est établi que la limite de Hayflick est la conséquence du raccourcissement progressif des extrémités des chromosomes, les télomères, au cours des divisions cellulaires.

1.1.2. LES TELOMERES

Les télomères sont des régions de l'ADN localisées aux extrémités des chromosomes linéaires. Chez l'Homme, ils mesurent en moyenne entre 10 et 15 kilobases. Le rôle principal des télomères est de protéger l'intégrité des chromosomes. Il est directement lié à une

Figure 2. Le raccourcissement des télomères et la limite de Hayflick.

Dans les cellules somatiques, les télomères raccourcissent à chaque division cellulaire jusqu'à atteindre une longueur critique responsable de l'entrée en sénescence réplivative : c'est la limite de Hayflick (M1 ou mortality stage 1). L'entrée en sénescence peut être empêchée en inhibant les voies qui la contrôlent, c'est-à-dire la voie p53/p21 et la voie p16/Rb. Les cellules continuent alors de se diviser et leurs télomères de raccourcir. Finalement, l'accumulation de remaniements chromosomiques conduit les cellules à un état de crise (M2 ou mortality stage 2) et elles meurent par apoptose. L'entrée en sénescence ou en crise peut également être empêchée grâce à l'expression d'une enzyme qui stabilise la longueur des télomères : la télomérase. Cette enzyme est exprimée par exemple dans les cellules germinales, et dans la majorité des cellules tumorales.



séquence nucléique (séquences répétées), une structure tridimensionnelle (la boucle t) et une organisation nucléoprotéique caractéristiques (le télosome – **Figure 3**).

Mise en évidence chez Tetrahymena thermophila.

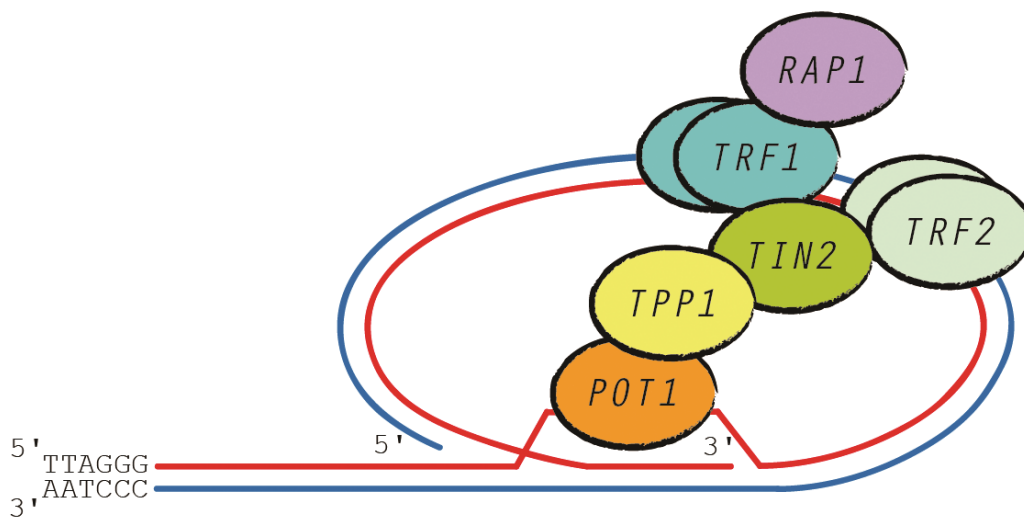
La notion de télomères fut pour la première fois abordée par Barbara McClintock dans les années 1930. Travaillant sur le maïs, elle avait observé que lors de cassures chromosomiques induites par des rayons X, les chromatides cassés pouvaient fusionner à nouveau (McClintock 1941). Puisque les extrémités des chromosomes linéaires, bien que ressemblant à des cassures chromosomiques, ne fusionnaient pas spontanément entre elles, il en a été déduit qu'à l'instar des centromères il existait des structures spécialisées empêchant les fusions interchromosomiques. Les mêmes conclusions avaient été formulées par Hermann Muller travaillant sur la drosophile (Muller 1938). Les premières séquences télomériques ont été déterminées en 1978 chez le cilié *Tetrahymena thermophila* (Blackburn and Gall 1978). Il s'agissait d'une répétition de l'hexanucléotide TTGGGG localisée aux extrémités des molécules d'ADN ribosomiques linéaires. Plus tard, le rôle principal des télomères a été mis en évidence lorsque ces séquences ont été clonées et placées aux extrémités de plasmides de Levure linéarisés (Szostak and Blackburn 1982) : l'addition de télomères de *T. thermophila* permettait de stabiliser les molécules d'ADN linéaires habituellement dégradées ou soumises à des recombinaisons.

Structure des télomères humains.

La séquence d'ADN télomérique humaine est constituée d'une répétition de six nucléotides TTAGGG (Cheng, Smith et al. 1989). Le brin riche en G, ou brin G (par opposition au brin complémentaire riche en C) constitue l'extrémité 3' et forme une protrusion simple brin de 50 à 500 nucléotides. L'observation des télomères en microscopie

Figure 3. Le télosome.

Le télosome ou shelterin est un complexe de six protéines présent au niveau des télomères. Les protéines TRF1 (TTAGGG repeats factor 1) et TRF2 reconnaissent les répétitions TTAGGG et se lient au niveau de l'ADN télomérique double brin sous la forme d'homodimères (Zhong, Shiue et al. 1992). Les protéines TIN2 (TRF1 interacting nuclear factor 2) et TPP1 (aussi nommée PTOP : POT1 and TIN2-organizing protein 1) se lient ensuite sur TRF1 et TRF2, respectivement. TIN2 et TPP1 créent un pont reliant les deux protéines télomériques (O'Connor, Safari et al. 2006). TPP1 permet le recrutement de POT1 (Protection of telomeres 1) (Liu, Safari et al. 2004) qui se lie à l'ADN télomérique simple brin, uniquement sur le brin riche en G (Baumann and Cech 2001). Enfin, RAP1 (transcriptional repressor/activator protein 1) interagit avec TRF2 (Sfeir, Kabir et al. 2010).



électronique a montré l'existence d'une boucle t (*telomeric*) (Griffith, Comeau et al. 1999) (Figure 3). En effet, l'extrémité 3' simple brin s'insère dans la molécule d'ADN double brin au niveau des répétitions télomériques et s'hybride avec la séquence complémentaire AATCCC, ne laissant plus apparaître l'extrémité de la molécule d'ADN. Le triplex d'ADN ainsi formé est appelé boucle D (*displacement*). Cette conformation est induite et stabilisée par un complexe protéique appelé *shelterin* ou télosome, constitué de six sous-unités : TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, RAP1 et POT1 (Figure 3) (Xin, Liu et al. 2008).

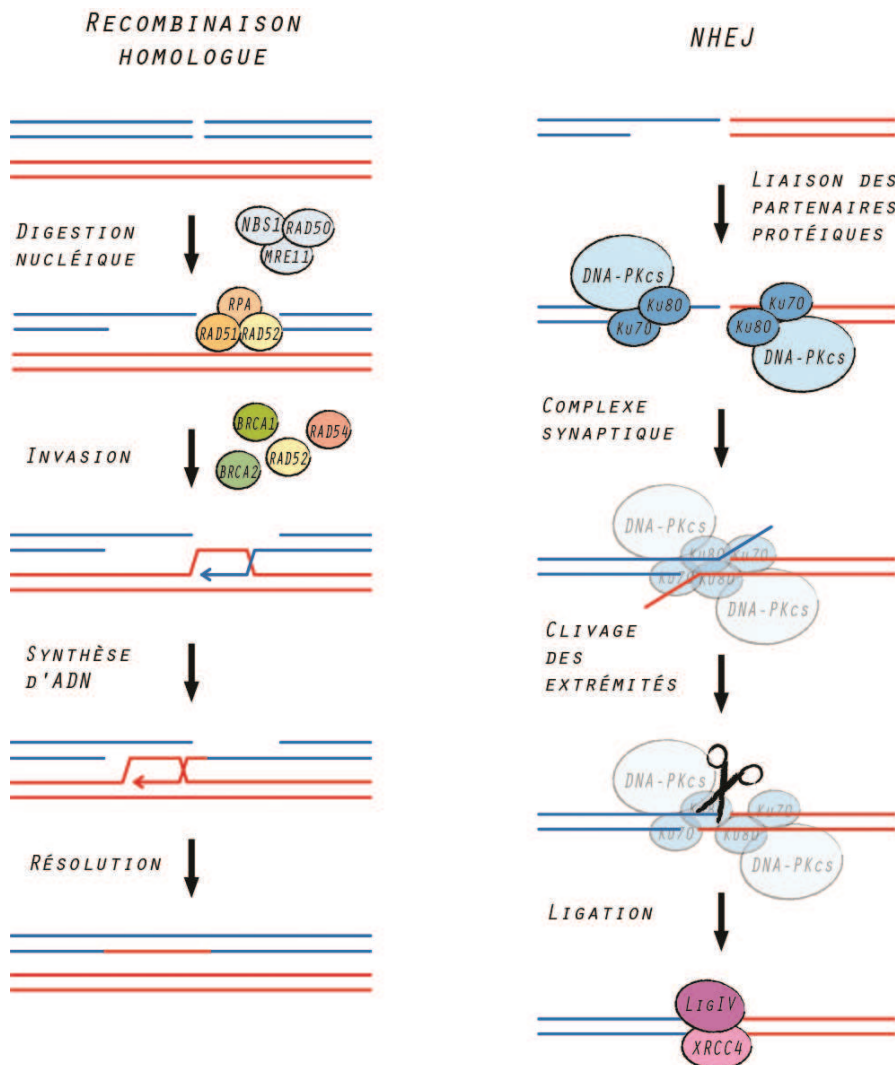
Principales fonctions des télomères.

Une des fonctions des télomères est de protéger l'extrémité des chromosomes de leur reconnaissance par des mécanismes de réparation de l'ADN. Cette protection est liée à la formation de la boucle t qui masque l'extrémité de la molécule d'ADN. Celle-ci n'est ainsi plus accessible aux protéines de reconnaissance des dommages. Ainsi, la déstabilisation des télomères induite par l'inhibition de TRF2 induit des fusions télomériques, conséquences de l'action des mécanismes de réparation des cassures double brin, tels que la recombinaison homologue et la jonction des extrémités non homologues (NHEJ *Non homologous end joining*) (**Figure 4**) (van Steensel, Smogorzewska et al. 1998). Les fusions entre chromosomes sont hautement délétères pour la cellule puisqu'elles provoquent des cassures de l'ADN pouvant conduire à la mort cellulaire, ou bien à des réarrangements génétiques. Ces réarrangements peuvent affecter des gènes de contrôle du cycle cellulaire et contribuer à la transformation tumorale. Les protéines du télosomes agissent également directement sur les voies de réponse aux dommages. En effet, TRF2 a été montré comme interagissant avec la protéine CHK2 (Checkpoint protein 2) qui participe à la voie ATM (Buscemi, Zannini et al. 2009). Cette interaction masque le résidu thréonine 68 de CHK2, empêchant son activation par phosphorylation et ainsi la propagation du signal de cassure (voir paragraphe 1.1.5). Ainsi,

Figure 4. Recombinaison homologue et NHEJ.

Au cours de la recombinaison homologue, les molécules d'ADN sont digérées afin de créer des extrémités simple brin. Cette étape implique le complexe MRN (MRE11/RAD50/NBS1). RPA, RAD51 et RAD52 se lient sur l'ADN simple brin, formant un filament nucléoprotéique qui va envahir la chromatide homologue. D'autres protéines participent à ce processus : BRCA1, BRCA2 et RAD54. L'ADN s'hybride avec la séquence complémentaire qui est ensuite utilisée comme matrice pour permettre l'addition de nouveaux nucléotides.

Lors de la jonction des extrémités non homologues (NHEJ – Non homologous end joining), les protéines KU70/80 sont d'abord recrutées au niveau des extrémités, puis recrutent la sous-unité catalytique DNA-PKcs. Cette kinase permet la formation d'un complexe synaptique qui rapproche les deux extrémités d'ADN. Dans ce complexe, l'ADN subit plusieurs modifications (digestion, allongement) afin de rendre compatible les deux extrémités simple brin. Finalement, les nucléotides surnuméraires sont clivés et les deux molécules d'ADN sont liguées par le complexe Ligase IV/XRCC4. (Adapté d'après Weterings E et Chen DJ, Cell Research, 2008)



les protéines du télosome protègent les télomères à la fois en induisant la formation de la boucle t et en inhibant l'activation des protéines des voies de détection des dommages.

Le télosome a également un rôle important dans la régulation de l'activité de la télomérase, une enzyme capable d'ajouter des nucléotides aux extrémités des télomères (voir partie 1.1.3). En particulier, TRF1 contrôle en *cis* l'action de l'enzyme sur l'élongation des télomères. En effet, la surexpression de TRF1 dans des cellules de fibrosarcome HT1080 exprimant la télomérase entraîne un raccourcissement des télomères, alors qu'aucun changement n'est observé dans des fibroblastes IMR90, négatifs pour la télomérase (van Steensel and de Lange 1997; Karlseder, Smogorzewska et al. 2002). POT1 pourrait être un médiateur de l'effet inhibiteur de TRF1 sur la télomérase : TRF1 recrute POT1 sur l'extrémité 3' simple brin afin de bloquer l'accessibilité de l'ADN à la télomérase, et l'inhibition de POT1 ou l'utilisation d'un mutant incapable de se lier à l'ADN entraînent l'allongement des télomères (Loayza and De Lange 2003; Ye, Hockemeyer et al. 2004).

1.1.3. LA TELOMERASE.

Historique

La longueur des télomères est régulée par une ADN polymérase particulière : la télomérase. Les travaux d'E. Blackburn et J. Szostak sur *Tetrahymena thermophila* avaient montré que le nombre des répétitions télomériques pouvait augmenter au cours des divisions cellulaires, suggérant un mécanisme d'addition de nucléotides. En effet, lors de l'introduction dans des levures de plasmides linéaires possédant des télomères de *T. thermophila*, ils ont observé l'addition de répétitions télomériques spécifiques de la levure (Szostak and Blackburn 1982). A l'inverse, en introduisant dans *T. thermophila* un plasmide avec des télomères de levure constitués de la répétition TTGGG, ils observèrent l'addition d'une guanine puis des

répétitions de nucléotides TTGGGG spécifiques des télomères de *T. thermophila*. L'activité enzymatique identifiée ici ne se contente donc pas de copier un modèle mais rajoute spécifiquement les six nucléotides TTGGGG aux extrémités des chromosomes. Cette enzyme a été nommée télomérase (Greider and Blackburn 1985; Greider and Blackburn 1987). La spécificité de la séquence ajoutée par la télomérase provient de l'utilisation d'une molécule d'ARN comme matrice. En effet, il a été observé que l'utilisation d'une ribonucléase abolissait l'activité de la télomérase, confirmant la nécessité de l'utilisation d'un ARN (Greider and Blackburn 1987). Finalement, en purifiant la télomérase, la séquence ribonucléique CAACCCCAA a été identifiée comme liée à l'enzyme et nécessaire à son activité (Greider and Blackburn 1989). L'orthologue humain de la télomérase fut découvert en 1997 (Meyerson, Counter et al. 1997; Nakamura, Morin et al. 1997).

Le complexe télomérase et son mode d'action.

La télomérase est une ADN polymérase ARN dépendante. C'est une ribonucléoprotéine constituée d'une sous-unité enzymatique, hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*), et d'une matrice d'ARN, hTERC (*human telomerase RNA component*). Des protéines additionnelles sont également associées à hTERT : la dyskérine, la pontine, la reptine, TCAB1 (*Telomere Cajal body protein 1*) et NOLA3 (*Nucleolar protein family A*). *In vitro*, le complexe minimum nécessaire pour observer une activité télomérase est composé d'une molécule de hTERC, deux de hTERT et deux de dyskérines (Cohen, Graham et al. 2007). *In vivo*, la pontine, la reptine et TCAB1 sont également nécessaires pour l'assemblage du complexe ribonucléoprotéique. Toutefois, le rôle exact de ces protéines additionnelles n'est pas connu (Venteicher, Meng et al. 2008; Venteicher, Abreu et al. 2009).

L'allongement des séquences télomériques par la télomérase est réalisé en trois étapes (**Figure 5**). Premièrement, l'enzyme se lie aux télomères grâce à un site d'ancrage à

l'ADN situé sur la sous-unité hTERT et à l'hybridation de l'ARN hTERC avec l'extrémité 3' simple brin (Moriarty, Ward et al. 2005). Ensuite, le télomère est allongé grâce à l'addition de nucléotides complémentaires à la matrice ARN hTERC. Finalement, la télomérase se déplace en 3' de la séquence nouvellement synthétisée. Après plusieurs cycles, l'enzyme se dissocie du télomère avec l'aide d'une hélicase hPIF1 (Boule, Vega et al. 2005).

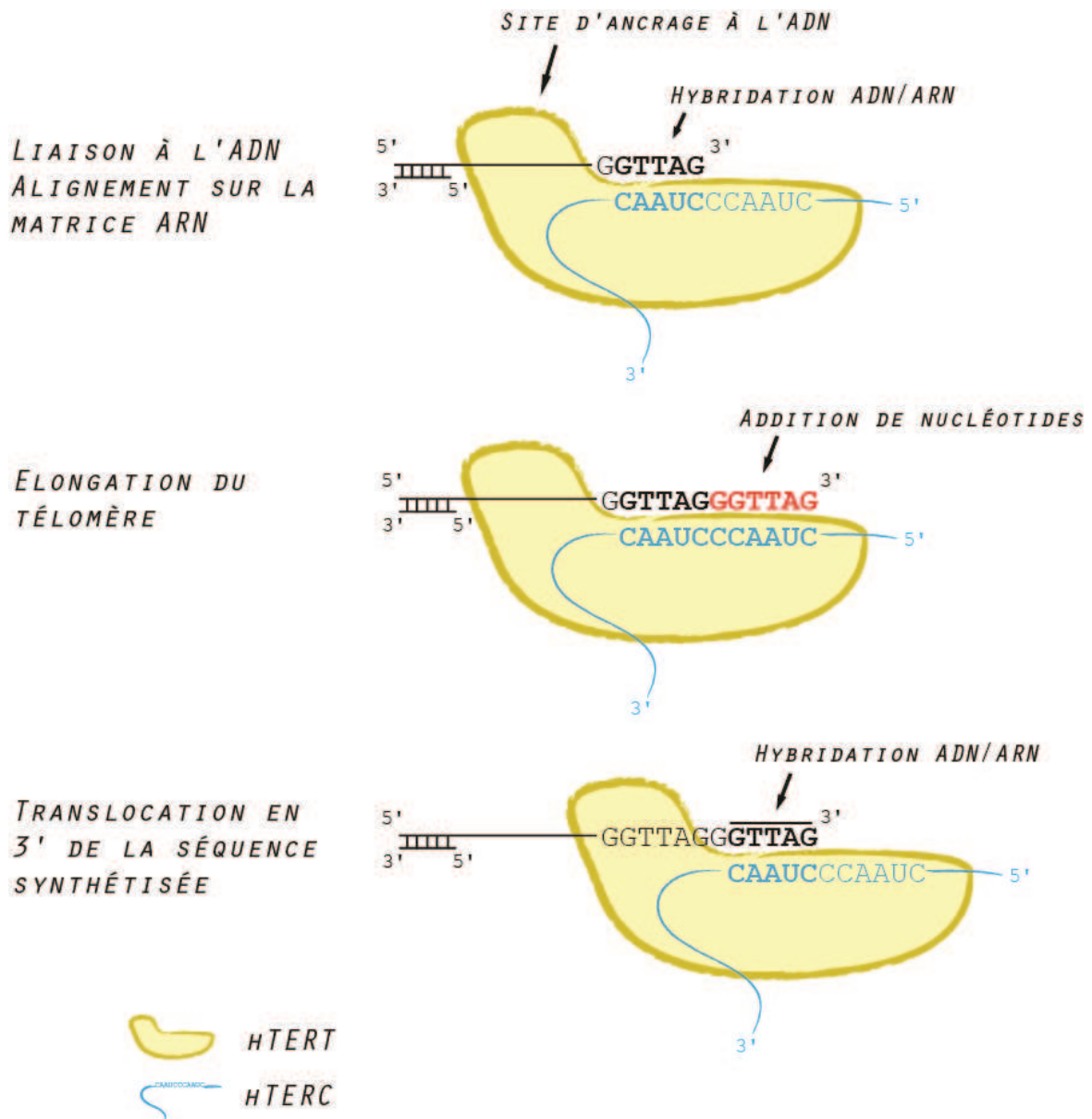
La télomérase in vivo.

Chez l'Homme, la télomérase est activée dans les cellules germinales et dans les cellules souches embryonnaires. Son activité est quasiment indétectable dans les cellules somatiques mais est élevée dans les cellules tumorales. En effet, la télomérase joue un rôle prépondérant dans le processus de transformation : la régulation de la longueur des télomères dans les cellules cancéreuses à fort potentiel prolifératif empêche l'accumulation d'erreurs chromosomiques et l'activation des processus de suppression tumorale que sont la sénescence et l'apoptose (Counter, Avilion et al. 1992). Ainsi, l'inhibition de la télomérase par ARNi a pour conséquence l'arrêt de la croissance tumorale (Li, Crothers et al. 2005). De plus, les souris *knock out* pour la télomérase sont résistantes à la tumorigenèse (Gonzalez-Suarez, Samper et al. 2000). L'inhibition de la télomérase constitue par conséquent une piste thérapeutique intéressante pour le traitement des cancers.

A l'inverse, la télomérase a un effet bénéfique sur le vieillissement. La surexpression de la télomérase dans des souris augmente effectivement l'espérance de vie de certaines d'entre elles grâce à une meilleure régénération des tissus, mais une partie des animaux développent des tumeurs et meurent plus rapidement que les souris sauvages (Gonzalez-Suarez, Samper et al. 2001; Artandi, Alson et al. 2002; Canela, Martin-Caballero et al. 2004; Gonzalez-Suarez, Geserick et al. 2005). Pour pallier à cela, une souris résistante à la tumorigenèse a été créée : elle exprime fortement p53, p16/INK4A et p19/ARF, trois protéines à fort pouvoir

Figure 5. Mode d'action de la télomérase.

Après assemblage, la télomérase est recrutée au niveau des télomères. La séquence d'alignement située en 3' de la matrice d'ARN hTERC s'hybride avec l'extrémité 3' simple brin du télomère. L'interaction est stabilisée grâce à un domaine de liaison à l'ADN situé sur le domaine catalytique hTERT. Le brin 3' du télomère est ensuite allongé en utilisant l'ARN hTERC comme matrice, puis la télomérase se déplace pour ajouter davantage de nucléotides.



antiprolifératif, et surexprime TERT. Cette souris a permis de confirmer le rôle de la télomérase dans la lutte contre le vieillissement en contrôlant son caractère protumoral (Tomás-Loba, Flores et al. 2008). Globalement, la réactivation de la protéine pourrait être utilisée pour augmenter la durée de vie des individus, à condition de bloquer les voies responsable de la tumorigénèse.

1.1.4. LE RACCOURCISSEMENT DES TELOMERES : « END-REPLICATION PROBLEM »

Le problème de la réplication des télomères

Dans les cellules somatiques, chaque division cellulaire s'accompagne d'une perte de 50 à 300 nucléotides à l'extrémité des chromosomes (Levy, Allsopp et al. 1992). A.M. Olovnikov fut le premier à proposer que le raccourcissement progressif des télomères était dû à un défaut de la machinerie de réplication (Olovnikov 1973). En effet, l'ADN polymérase a besoin d'une amorce ARN pour exercer son activité. Cette amorce est ensuite éliminée laissant une lacune qui est comblée par l'ADN polymérase synthétisant le fragment situé en amont, excepté à l'extrémité 5' (**Figure 6**). Ainsi, il reste obligatoirement une zone non répliquée à l'extrémité 5' des brins d'ADN néoformés. Néanmoins, les observations réalisées ne peuvent pas toutes être expliquées par ce modèle. En effet, seulement 50% des extrémités des chromosomes devraient dans ce cas posséder une extrémité 3' simple brin. Or, un taux supérieur à 80% a été observé (Makarov, Hirose et al. 1997). De plus, le raccourcissement résultant de ce modèle serait d'environ 10 nucléotides par division au lieu de plusieurs dizaines. Il existe par conséquent d'autres mécanismes impliqués dans la génération de cette extrémité simple brin.

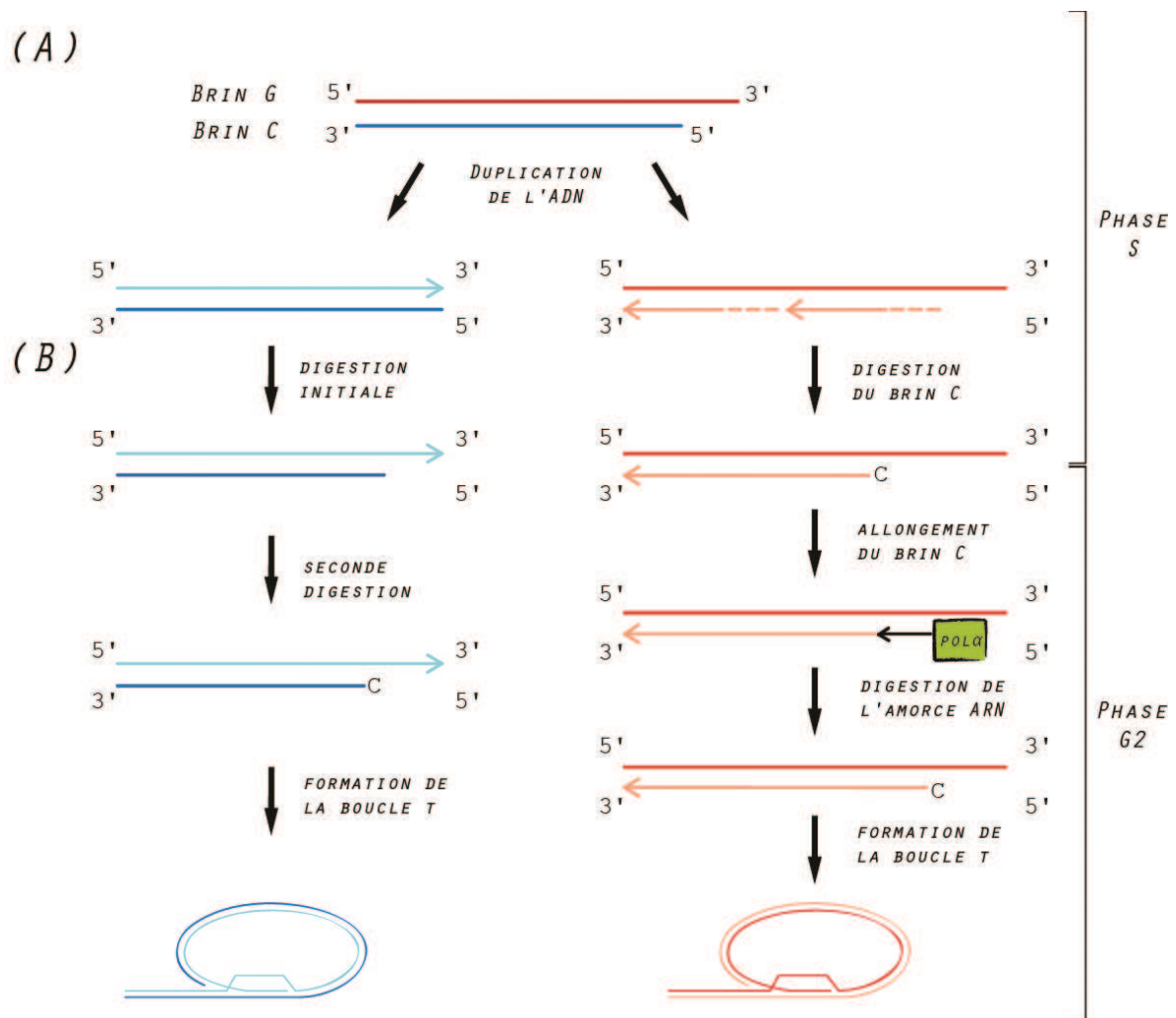
Une activité exonucléasique à l'origine de l'extrémité 3' simple brin

La mesure de la longueur des extrémités simple brin des télomères a apporté deux informations : premièrement la longueur de cette protrusion varie au cours du cycle, et

Figure 6. Modèle de réplication des télomères.

(A) Lors de la phase S, l'ADN est répliqué dans le sens 3' vers 5'. Au niveau des télomères, le brin C, ou brin avancé (bleu), est complètement répliqué, générant un nouveau télomère aux extrémités franches. Le brin G, ou brin retardé (rouge), est répliqué partiellement. En effet, la copie de l'extrémité 3' commence quelques nucléotides à partir du bord, et l'amorce d'ARN la plus distale (en pointillés) n'est pas remplacée après dégradation.

(B) Les télomères néoformés subissent ensuite plusieurs modifications, différentes selon le brin d'origine. Le télomère formé à partir du brin C (bleu) est raccourci à l'extrémité 5' en fin de phase S, afin d'obtenir un court fragment 3' simple brin. Une seconde phase de digestion a lieu en G2, donnant le télomère mature dont l'extrémité 5' se finit par la séquence -ATC et capable de former une boucle t. Le télomère formé à partir du brin G (rouge) est également digéré à l'extrémité 5' en fin de phase S. La polymérase α intervient en début de phase G2 pour allonger cette extrémité. Finalement, une exonucléase dégrade l'amorce ARN et l'extrémité 5', qui se termine par la séquence -ATC. Le télomère est ainsi capable de former une boucle t. (modifié d'après Xai D. et al, *The EMBO Journal*, 2010)



deuxièmement deux types de traitements post-réplicatifs sont observés selon que le brin répliqué est le brin G ou le brin C (Dai, Huang et al. 2010). Les télomères formés après réplication du brin G possèdent déjà une courte extrémité 3' simple brin due à l'espace laissé après la réplication. Le brin néoformé est légèrement dégradé depuis son extrémité 5' en phase S, puis il est allongé en phase G2 grâce à une autre polymérase, et à nouveau légèrement dégradé. Les télomères formés à partir du brin C ont quant à eux une extrémité franche. Une courte extrémité simple brin est mesurée en phase S ce qui indique une première étape de digestion enzymatique. Une seconde digestion intervient ensuite en G2/M. Finalement, les deux extrémités des chromosomes peuvent se retrouver avec une extrémité 3' simple brin nécessaire pour la formation de la boucle t.

L'intervention d'une exonucléase a été confirmée par séquençage. Il a été montré que 80% des télomères commencent par la séquence 5'-CTA (Sfeir, Chai et al. 2005). Cette uniformité suggère bien l'intervention d'une activité enzymatique. Toutefois, le mécanisme précis et les acteurs restent à déterminer. Au moins trois enzymes candidates ont été proposées. Le complexe MRN, jouant un rôle dans les premières étapes de la réponse aux cassures double brin, pourrait être impliqué puisque l'inhibition de Mre11, Rad50 ou Nbs1 réduit la longueur de l'extrémité simple brin (Chai, Sfeir et al. 2006). Autre exemple, chez la levure, l'endonucléase Sae2 est impliquée dans la dégradation du brin C même si cela n'a pas encore été observé pour son orthologue humain CTIP (Bonetti, Martina et al. 2009). Enfin, plus récemment, TRF2 a été montré comme recrutant la nucléase Apollo au niveau des télomères. Le défaut d'interaction entre les deux protéines ou l'inhibition de l'activité nucléasique d'Apollo altère la formation de l'extrémité 3' simple brin et induit des fusions télomériques indiquant un défaut de formation de la boucle t (Lam, Akhter et al. 2010; Wu, van Overbeek

et al. 2010). Apollo étant une 5' exonucléase, il est possible que la protéine agisse sur la dégradation du brin C.

Les autres acteurs impliqués dans la génération de l'extrémité 3' simple brin.

D'autres protéines régulent la formation de l'extrémité 3' simple brin. La protéine TRF2 est nécessaire puisque l'utilisation d'un dominant négatif ou son inhibition par un ARNi prévient la formation, entraînant en conséquence des fusions télomériques (van Steensel, Smogorzewska et al. 1998). Cette observation pourrait toutefois être liée à son rôle dans le recrutement de la kinase Apollo citée précédemment. L'activité de la DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) pourrait être aussi nécessaire. En effet, dans des cellules de souris déficientes pour la sous-unité catalytique DNA-PKcs, on observe des fusions chromosomiques après la réplication, comme après inhibition de TRF2. En faisant le parallèle entre les deux protéines, les auteurs ont proposé que la DNA-PK soit impliquée dans le processus de formation de l'extrémité 3' simple brin, bien qu'aucune évidence directe n'ait été avancée (Bailey, Cornforth et al. 2001).

Le rôle du stress oxydatif dans le raccourcissement des télomères.

Le stress oxydatif joue aussi un rôle dans le raccourcissement des télomères. En effet, le taux d'oxydation de l'ADN mesuré par la libération de 8-oxoguanine augmente dans les fibroblastes sénescents (Chen, Fischer et al. 1995). De plus, la mise en culture des cellules dans un environnement hypoxique repousse le nombre de divisions cellulaires que peuvent subir les cellules avant d'entrer en sénescence (Packer and Fuehr 1977). De même, l'utilisation de l'antioxydant N-tert-butyl-alpha-phénylnitron (PBN) augmente la durée de vie des cellules. A l'inverse, la mise en culture de fibroblastes en conditions hyperoxiques (40% d'O₂) accélère la vitesse de raccourcissement des télomères et diminue le nombre de divisions avant l'entrée en sénescence (von Zglinicki, Saretzki et al. 1995). Il a été proposé

que le stress oxydatif induise des cassures simple brin responsable de la diminution rapide de la longueur des télomères. Lors de la réplication des télomères, la polymérase stoppe au niveau de la cassure, générant un télomère de longueur normale et un autre plus court dans les cellules filles.

Le signal d'entrée en sénescence

Finalement, après plusieurs cycles de raccourcissements, les télomères atteignent une longueur critique et la cellule enclenche le programme de sénescence répllicative (Allsopp, Chang et al. 1995). Un seul télomère trop court est suffisant pour activer l'entrée en sénescence. Par exemple, l'introduction dans une souche de levure d'un chromosome avec un télomère tronqué accélère l'entrée en sénescence (Abdallah, Luciano et al. 2009). Toutefois, le signal à l'origine de cette induction reste obscur. En effet, on détecte toujours la présence de répétitions télomériques dans les cellules sénescents indiquant que ce n'est pas la disparition totale du télomère qui est nécessaire (Harley, Futcher et al. 1990). L'évènement responsable pourrait être la disparition de l'extrémité 3' simple brin. En effet, plusieurs groupes ont décrit un rapport de proportionnalité entre la longueur totale des télomères et la taille du fragment simple brin, proposant que la longueur critique des télomères correspond au moment où la longueur de l'extrémité simple brin est insuffisante pour former la boucle t qui protège habituellement l'extrémité du chromosome (Stewart, Ben-Porath et al. 2003; Rahman, Forsyth et al. 2008). Toutefois, il n'est pas certain que cette extrémité disparaisse totalement, puisque d'autres travaux ont montré qu'elle persiste même dans les cellules sénescents (Keys, Serra et al. 2004; Chai, Shay et al. 2005). Ces dernières études se basent sur le calcul d'une longueur moyenne, ainsi il est possible que l'extrémité 3' simple brin soit totalement rognée pour un des télomères sans que cela soit détecté. Puisqu'un télomère est suffisant pour

activer l'entrée en sénescence, cela pourrait expliquer qu'on observe encore des extrémités simple brin dans les cellules sénescents.

Globalement, le signal à l'origine de l'entrée en sénescence n'est donc pas encore clairement déterminé. Il est toutefois admis que lorsque le télomère devient trop court, les protéines télomériques, en particulier TRF2, ne peuvent se regrouper pour former le télosome (Karlseder, Smogorzewska et al. 2002). Ce modèle est principalement issu des expériences utilisant un allèle muté de TRF2 appelé TRF2^{ΔBΔM} (van Steensel, Smogorzewska et al. 1998). Ce mutant est privé de son domaine Basique amino-terminal, impliqué dans son interaction avec des partenaires protéiques, et de son domaine Myb carboxy-terminal, responsable de l'interaction avec l'ADN. Il conserve les domaines de dimérisation et de localisation nucléaire. TRF2^{ΔBΔM} forme ainsi un hétérodimère inactif avec la protéine TRF2 sauvage, incapable de se lier à l'ADN. En conséquence, TRF2 disparaît des télomères et s'accumule dans le nucléoplasme. L'expression de TRF2^{ΔBΔM} dans les fibroblastes diploïdes entraîne l'entrée en sénescence dépendante de p53 et p16 (Smogorzewska and de Lange 2002). Les cellules entrées en sénescence répliquative et les cellules exprimant TRF2^{ΔBΔM} subissent les mêmes modifications morphologiques et expriment les mêmes marqueurs cellulaires (qui seront décrits dans la suite de cette introduction). L'expression de TRF2^{ΔBΔM} est par conséquent considérée comme un modèle très pertinent et très utilisé d'étude des voies de signalisation de la sénescence liée au raccourcissement des télomères.

L'expression de TRF2^{ΔBΔM} entraîne la formation de fusions télomériques (van Steensel, Smogorzewska et al. 1998). Ces fusions sont le reflet de l'activation des voies de réparation par NHEJ et recombinaison homologue (Figure 4). Ces expériences soulignent le rôle de TRF2 dans la répression de ces mécanismes lorsque les télomères sont correctement protégés,

et elles mettent en évidence le fait que les télomères non stabilisés, et par analogie les télomères trop courts, sont reconnus comme des dommages de l'ADN.

1.1.5. LA SENESENCE REPLICATIVE EST UNE REPOSE AUX DOMMAGES DE L'ADN

Des protéines de la DDR s'accumulent au niveau des télomères.

Deux grandes voies de signalisation des cassures de l'ADN (DDR : *DNA damage response*) existent pour détecter les dommages et activer d'une part l'arrêt du cycle cellulaire et d'autre part les processus de réparation. Tout d'abord, la voie ATM (*Ataxia telangiectasia Mutated*) est impliquée dans la signalisation des cassures double brin, et permet l'arrêt du cycle cellulaire via la kinase CHK2 (*Checkpoint kinase 2*) et la protéine p53, et l'activation des voies de réparation par NHEJ et recombinaison homologue (**Figure 7**). Ensuite, la voie ATR (*ATM and RAD3-related*) est retrouvée lors de cassures simple brin ou de blocages des fourches de réplication de l'ADN, et active la kinase CHK1 qui conduit à l'arrêt du cycle cellulaire via CDC25 (*Cell Division Cycle 25C*) (**Figure 8**).

Lors de l'entrée en sénescence répllicative, plusieurs protéines impliquées dans la voie ATM sont observées au niveau des télomères : l'histone H2AX phosphorylée (γ H2AX), les protéines MDC1 (*Mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) et NBS1 (*Nijmegen Breakage Syndrome 1*) et la kinase 53BP1 (*TP53 binding protein*) (d'Adda di Fagagna, Reaper et al. 2003). Ces protéines colocalisent au niveau de foyers appelés TIFs (*Telomeres dysfunction induced foci*) dont le nombre augmente alors que les cellules atteignent la sénescence. Une autre étude a montré la présence au sein des TIFs d'autres protéines des voies DDR : MRE11 (*Meiotic Recombination 11*), et les formes activées de RAD17 (*Radiation-sensitive Mutation 17*), ATM, CHK1 et CHK2 (Herbig, Jobling et al. 2004). Globalement, ces observations révèlent que la voie ATM principalement et dans un second

Figure 7. Signalisation des cassures double brin par la kinase ATM.

(A) Reconnaissance des cassures double brin. Après la formation de cassures double brin, le complexe MRN, composé de MRE11, RAD50 et NBS1, se lie à l'ADN au niveau de la cassure. MRN recrute ensuite la kinase ATM qui est activée par auto-phosphorylation sur la sérine 1981 (You, Chahwan et al. 2005). Phospho-ATM a trois actions. (1) Phosphorylation du complexe MRN, ce qui stabilise l'interaction avec ATM (Lavin 2007). (2) Phosphorylation des histones H2AX à proximité de la cassure (Rogakou, Pilch et al. 1998). H2AX phosphorylée sur la sérine 139, ou γ H2AX, est un élément clé de la signalisation des cassures double brin puisqu'elle sert de plateforme pour de nombreuses protéines impliquées dans cette voie (Paull, Rogakou et al. 2000). (3) Phosphorylation de la kinase CHK2 sur la thréonine 68 (Matsuoka, Rotman et al. 2000). Phospho-CHK2 est impliquée dans l'inhibition du cycle cellulaire en réponse aux cassures double brin.

(B) Amplification du signal. Les histones γ H2AX sont reconnues par la protéine MDC1 (Stewart, Wang et al. 2003). L'interaction entre γ H2AX et MDC1 permet le recrutement d'autres protéines MRN et ATM, et l'augmentation de la quantité de γ H2AX de part et d'autre de la cassure.

(C) Modification de la structure chromatinienne. MDC1 recrute également RNF8 au niveau des cassures. RNF8 est une E3 ubiquitine ligase qui catalyse la polyubiquitination des histones H2A, H2B et H2AX. L'activité de RNF8 est régulée par une autre E3 ubiquitine ligase, RNF168, et une enzyme E2 de conjugaison de l'ubiquitine, UBC13. Les chaînes d'ubiquitines permettent une relaxation de la chromatine, démasquant certaines modifications post-traductionnelles des histones (Huen, Grant et al. 2007; Mailand, Bekker-Jensen et al. 2007).

(D) Initiation des voies de réparation. Les marques d'histones démasquées deviennent accessibles aux protéines BRCA1 et 53BP1. BRCA1 joue un rôle important dans la réparation par recombinaison homologue en permettant l'accumulation de RAD51 (v. Figure 4) (West 2003). 53BP1 est quant à elle nécessaire à la réparation des cassures par NHEJ (Xie, Hartlerode et al. 2007). Elle reconnaît les histones modifiées H3K79Me et H4K20Me2, devenues accessibles grâce à l'addition des chaînes d'ubiquitines. (modifié d'après la thèse de Delphine Larrieu, Institut Albert Bonniot, 2010)

Figure 7. Signalisation des cassures double brin par la kinase ATM (suite).

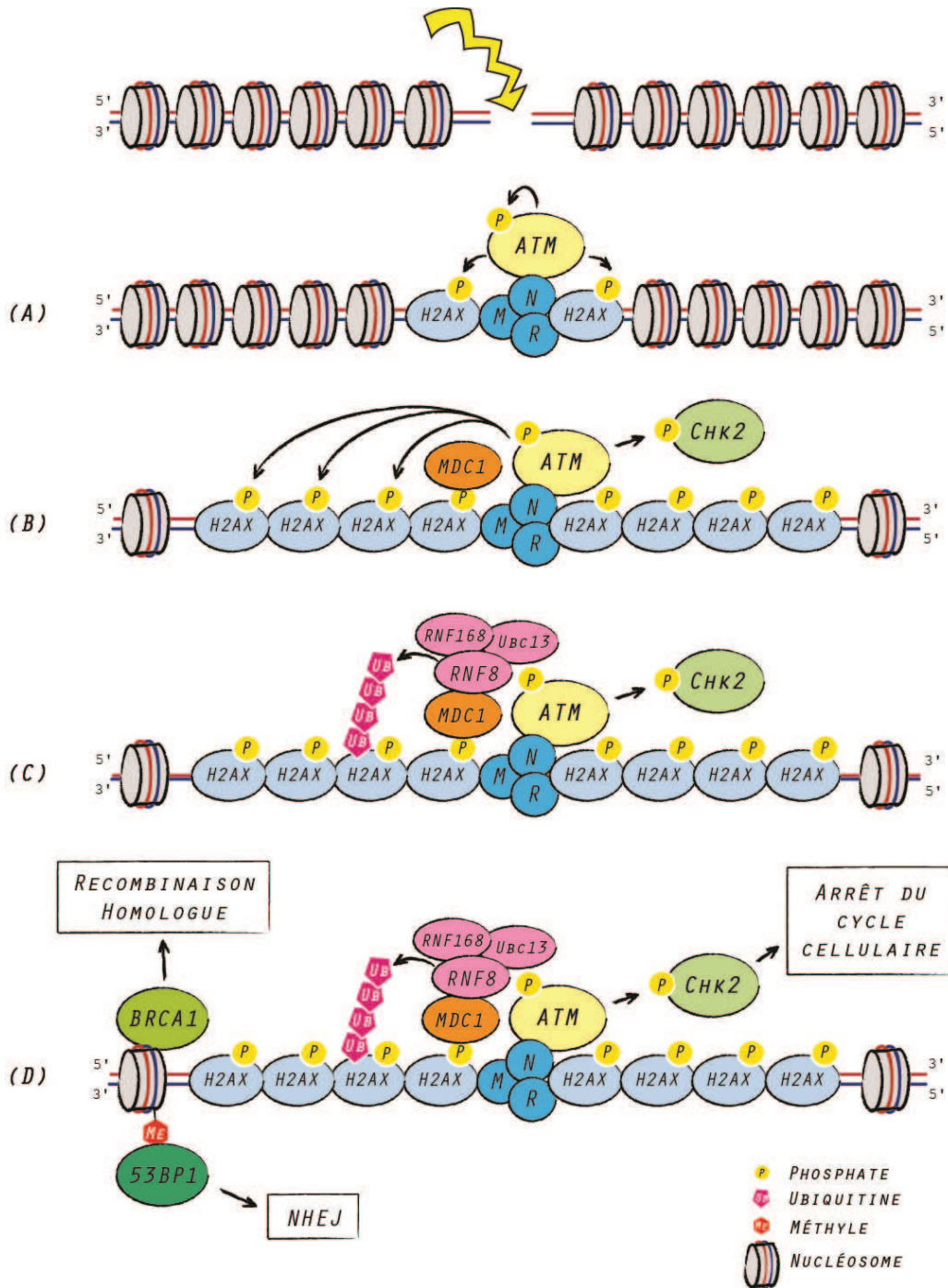


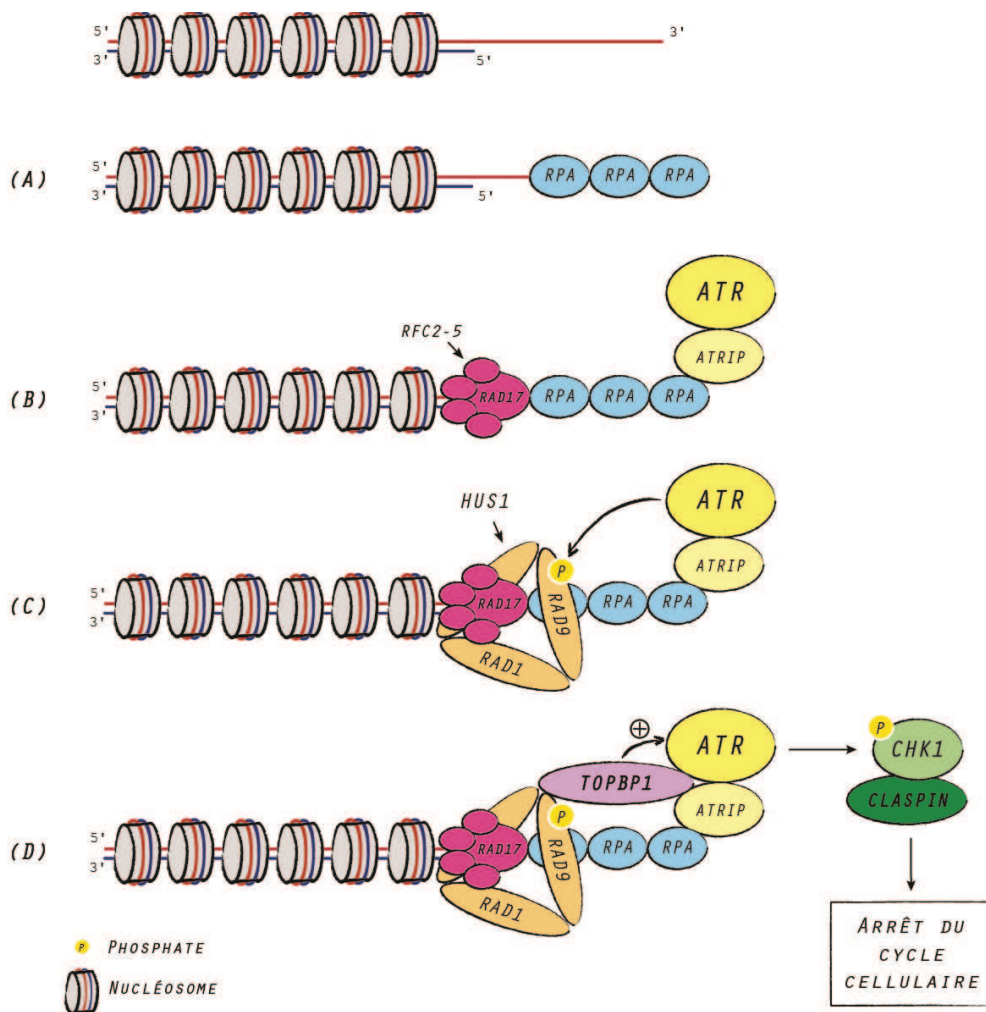
Figure 8. Signalisation des dommages à l'ADN par la voie ATR.

(A) Lors de cassures simple brin (causées par un problème de réplication de l'ADN ou induites par des rayonnements), la protéine RPA (Réplication protéin A) se lie au niveau de l'ADN simple brin.

(B) Le complexe RPA-ADN simple brin sert de plate-forme pour la fixation d'ATRIP (ATR-interacting protein) et de la kinase ATR (Ball, Myers et al. 2005). Cette interaction est insuffisante pour initier la réponse au dommage et nécessite d'autres facteurs protéiques. Au niveau de la jonction entre l'ADN simple et double brin, le complexe RAD17 se lie également à RPA (Zou, Liu et al. 2003). Ce complexe est constitué de cinq protéines : RAD17 et RFC2 à 5.

(C) Le complexe RAD17 recrute le complexe 9-1-1 (RAD9, RAD1, et HUS1) (Zou, Cortez et al. 2002). Ce complexe forme un anneau autour de l'ADN. RAD9 est une cible de la kinase ATR.

(D) La phosphorylation de RAD9 permet la fixation de TOPBP1 (Topoisomerase Binding Protein 1). TOPBP1 se lie également à ATRIP et ATR. La liaison de TOPBP1 active ATR dont l'une des cibles est la kinase CHK1 sur plusieurs résidus. La phosphorylation de CHK1 est dépendante de la Claspin. ATR cible également TOPBP1 sur la sérine 1131 ce qui stabilise son interaction avec ATRIP. (modifié d'après Shiotani et Zou, JCS, 2009)



temps la voie ATR sont activées lorsque les télomères deviennent trop courts. D'autres évidences du recrutement de ces voies proviennent d'études reposant sur la déstabilisation des télomères avec TRF2^{ABΔM}. En effet, 53BP1, MRE11, phospho-ATM, γ -H2AX, et phospho-RAD17 sont retrouvés également au niveau des télomères déficients en TRF2 (Takai, Smogorzewska et al. 2003).

Rôle des voies DDR dans le processus de sénescence répllicative

Le recrutement et l'activation de ces protéines est le reflet de la reconnaissance des télomères comme dommages à l'ADN. C'est une étape essentielle au processus de sénescence. En effet, l'inhibition de CHK2 grâce à une forme mutante non activable retarde l'entrée en sénescence répllicative dans des fibroblastes humains (Gire, Roux et al. 2004). Un résultat similaire est observé en utilisant un ARN interférent. De même, la microinjection de combinaisons de plasmides exprimant des formes inactives d'ATM et ATR d'une part, et CHK1 et CHK2 d'autre part, dans des fibroblastes sénescents restaure la capacité à proliférer pour 15% et 12% des cellules, respectivement (d'Adda di Fagagna, Reaper et al. 2003). Ces données indiquent que l'activation constante des voies DDR est nécessaire pour maintenir les cellules en sénescence.

Au niveau des cassures intrachromosomiques, les voies DDR ont pour conséquence l'arrêt du cycle cellulaire pour permettre la réparation des dommages. Au niveau des télomères, l'inhibition de TRF2 dans des fibroblastes de souris entraîne l'activation de la voie NHEJ ce qui a pour conséquence des fusions télomériques (van Steensel, Smogorzewska et al. 1998). Ces fusions peuvent être empêchées en inhibant l'expression de la DNA Ligase IV, confirmant l'implication de la voie NHEJ (Celli and de Lange 2005). Au cours de la sénescence répllicative, aucune évidence n'a été apportée à ce jour montrant l'intervention de

la NHEJ. La principale fonction des voies DDR identifiée dans la sénescence réplivative est l'activation de la voie p53/p21 et l'arrêt du cycle cellulaire.

1.1.6. L'INHIBITION DU CYCLE CELLULAIRE

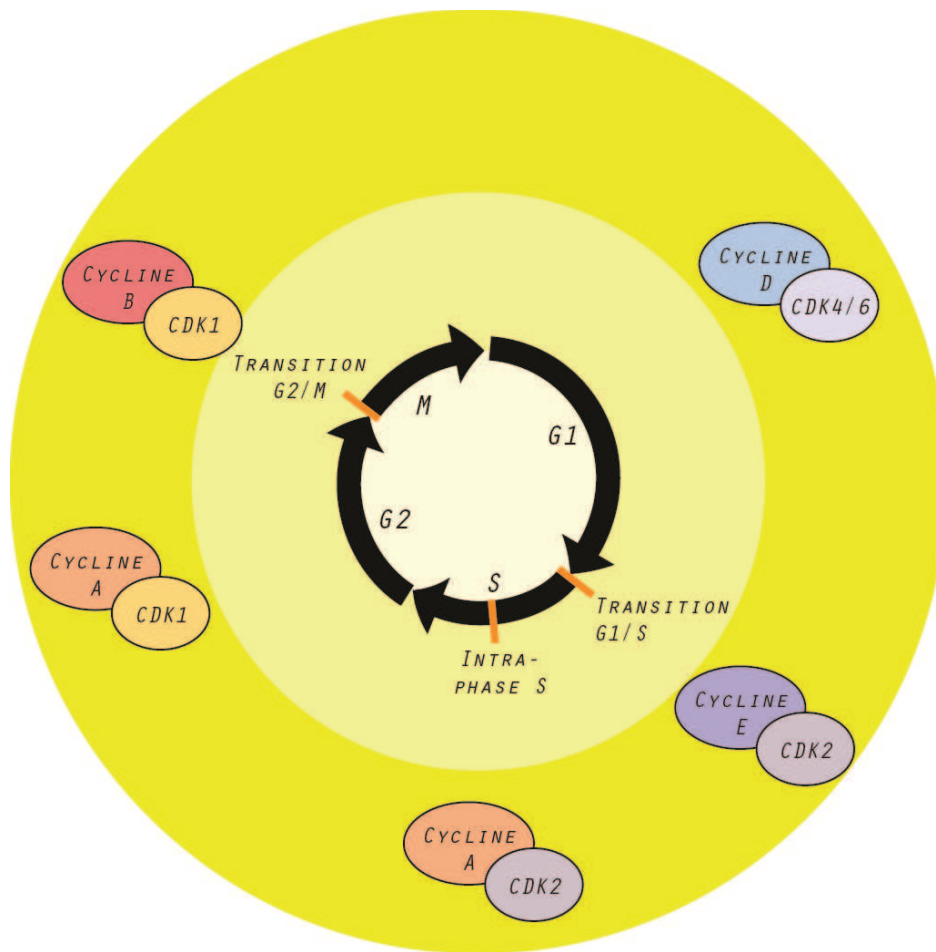
L'une des cibles de la voie ATM est le facteur de transcription p53. C'est une protéine clé du processus de sénescence car elle fait le lien entre la voie de détection des dommages et les protéines de régulation du cycle cellulaire. Une fois activé, p53 induit l'expression de l'inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines p21/WAF1. L'expression de p21/WAF1 a pour conséquence la capture et l'inhibition d'un autre facteur de transcription : E2F1. L'expression des gènes cibles d'E2F1 est nécessaire pour la progression des cellules en phase S du cycle cellulaire. Ainsi, l'inactivation d'E2F1 entraîne un arrêt des cellules au niveau de la transition G1-S, caractéristique des cellules sénescents (**Figure 9**).

La protéine suppressive de tumeur p53

La protéine p53 a été identifiée simultanément par plusieurs groupes en 1979 comme interagissant avec l'antigène grand T du virus simien SV40 (Kress, May et al. 1979; Lane and Crawford 1979; Linzer and Levine 1979; Melero, Stitt et al. 1979; Smith, Smith et al. 1979). Le SV40 est un virus à ADN capable d'induire la transformation tumorale des cellules infectées. A l'époque, il était proposé que des antigènes produits par ce type de virus, comme l'antigène grand T, interagissaient avec des protéines de la cellule-hôte afin d'induire l'expression d'oncoprotéines potentielles responsables de la transformation tumorale. C'est dans ce contexte que le complexe entre p53 et l'antigène grand T a été identifié. Dans les premiers temps, *TP53* (gène codant pour p53) était considéré comme un nouvel oncogène potentiel. En effet, la protéine a été trouvée fortement exprimée dans plusieurs types de tumeurs alors que son niveau était faible dans le tissu sain (Rotter 1983). De plus, le clonage à

Figure 9. Le cycle cellulaire eucaryote.

Le cycle cellulaire eucaryote est composé de quatre phases : une phase de division cellulaire, la mitose (M), une phase de duplication de l'ADN (S) et deux phases de transition (G1 et G2) (cercle noir). Tout au long du cycle, des points de contrôle ont pour but de vérifier la viabilité de la cellule et d'en arrêter la progression si les conditions de viabilité ne sont pas remplies (cercle jaune clair). Ces points de contrôle sont régulés par des complexes cyclines-CDK spécifiques. L'inhibition de ces complexes entraîne un défaut de progression du cycle cellulaire (cercle jaune vif).



la fois de l'ADNc et du gène de *TP53* a permis de mettre en évidence après transfection que p53 peut coopérer avec l'oncoprotéine HRAS pour transformer des cellules primaires en culture (Eliyahu, Raz et al. 1984; Parada, Land et al. 1984) et même augmenter la tumorigénicité de cellules p53-null *in vivo* (Wolf, Harris et al. 1984). Ces résultats ont été réévalués lorsque les premières mutations inactivatrices de *TP53* ont été identifiées chez la souris (Mowat, Cheng et al. 1985). Finalement, les ADNc de p53 obtenus à partir de cellules tumorales et ayant des propriétés transformantes étaient porteurs de mutations (Eliyahu, Goldfinger et al. 1988; Finlay, Hinds et al. 1988; Halevy, Rodel et al. 1991). A l'inverse, la forme sauvage de p53 est incapable d'induire la transformation tumorale. Corroborant ces résultats, il a été montré que le gène *TP53* est fréquemment muté et/ou perdu dans les cancers colorectaux (Vogelstein, Fearon et al. 1988; Baker, Fearon et al. 1989). Ces propriétés sont caractéristiques d'un gène suppresseur de tumeur. De plus, à l'opposé des ADNc de p53 issus de cellules tumorales, l'expression de la forme sauvage de *TP53* inhibe la prolifération cellulaire et peut supprimer la transformation des fibroblastes de rat par l'oncogène *HRAS* (Eliyahu, Michalovitz et al. 1989; Finlay, Hinds et al. 1989). On estime aujourd'hui que plus de 50% des cancers humains impliquent une mutation de perte de fonction de la protéine p53, ce qui en fait le gène le plus fréquemment muté chez l'Homme.

Sénescence et p53

Selon le type cellulaire, l'activation de p53 conduit soit à la mort cellulaire par apoptose, soit à l'entrée en sénescence. L'implication de p53 dans ces deux processus passe par l'activation transcriptionnelle de la protéine pro-apoptotique BAX (Miyashita and Reed 1995) ou de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 (el-Deiry, Tokino et al. 1993), respectivement. Dans le cas de la sénescence cellulaire dont il est question ici, l'implication de la protéine p53 a été initialement observée à partir d'expériences impliquant l'antigène grand T du SV40 ou la

protéine E6 du papillomavirus humain HPV (Shay, Pereira-Smith et al. 1991). Depuis les expériences de 1979, il a été découvert que l'interaction entre ces protéines virales et p53 inhibait ses fonctions transactivatrices et/ou entraînait sa dégradation. Dans des fibroblastes infectés par l'un ou l'autre virus, l'inactivation de p53 corrèle avec l'échappement au programme de sénescence (Shay, Pereira-Smith et al. 1991). De plus, la restauration conditionnelle de l'activité de p53 dans des cellules *p53-null* entraîne un arrêt du cycle cellulaire (Baker, Markowitz et al. 1990; Michalovitz, Halevy et al. 1990). Au niveau mécanistique, il a plus tard été montré qu'en réponse au raccourcissement des télomères comme après des dommages à l'ADN, p53 est phosphorylé sur la sérine 15, ce qui est une marque de stabilisation (Webley, Bond et al. 2000). En conséquence, son activité transcriptionnelle est augmentée permettant la surexpression de p21.

Régulation du facteur de transcription p53

La protéine p53 a une demi-vie très courte, inférieure à 30 minutes (Oren, Maltzman et al. 1981). Le principal inhibiteur de p53 est l'ubiquitine ligase MDM-2 (Mouse Double Minute 2), qui agit de deux façons. En absence d'activation, p53 est ciblé par MDM-2. L'ubiquitylation de p53 entraîne sa dégradation par le protéasome (Honda, Tanaka et al. 1997). De plus, la liaison avec MDM2 au niveau du domaine de transactivation de p53 inhibe son activité de facteur de transcription (Oliner, Pietenpol et al. 1993). A l'inverse, en réponse à des dommages de l'ADN ou en conséquence du raccourcissement des télomères, MDM-2 ne peut se lier à p53. En effet, ATM phosphoryle p53 sur le résidu sérine 15 (Banin, Moyal et al. 1998; Canman, Lim et al. 1998; Khanna, Keating et al. 1998) et la kinase CHK2 cible la sérine 20 (Hirao, Kong et al. 2000). Ces phosphorylations empêchant l'interaction avec MDM2, ce qui stabilise p53. Le facteur de transcription s'accumule ainsi dans les cellules et se lie sur le promoteur de ses gènes cibles au niveau d'une séquence consensus constituée de

deux décanucléotides **PurPurPurC (A/T) (T/A)GPyrPyrPyr** (**Pur** : purine, **Pyr** : Pyrimidine) espacés de 0 à 13 bases (El-Deiry, Kern et al. 1992). P53 interagit avec l'ADN *via* sa partie centrale qui contient un domaine de liaison à l'ADN. Cette activité est régulée par les acétyltransférases CBP/p300 (*CREB-binding protein*) et PCAF (*P300/CBP associated factor*), qui acétylent les résidus lysine 382 et 320, respectivement (Gu and Roeder 1997; Liu, Scolnick et al. 1999). Ces acétylations sont nécessaires pour l'activation transcriptionnelle du principal gène cible de p53 dans les cellules sénescents : *p21/WAF1* (Scolnick, Chehab et al. 1997).

L'inhibiteur des CDK : p21

La protéine p21, codée par le gène *CIP1/WAF1/SDI1*, est un inhibiteur des kinases dépendantes de cyclines (CDKI) identifié en 1993 dans deux articles publiés dans la même édition du journal *Cell*. D'un côté, Harper *et al.* ont identifié la protéine p21/*CIP1* (*CDK interacting protein 1*) en utilisant la méthode du double-hybride chez la levure (Harper, Adami et al. 1993). p21/*CIP1* interagit *in vitro* avec les cyclines A, D1, E et la kinase CDK2. En parallèle, le gène *WAF1* (*Wildtype p53-activated fragment 1*) a été identifié par hybridation soustractive entre des cellules de glioblastome exprimant soit le gène *TP53* sauvage, soit le gène muté, et traitées avec de la dexaméthasone pour activer p53 (el-Deiry, Tokino et al. 1993). p21/*WAF1* est induit spécifiquement après expression de la protéine p53 sauvage et cette surexpression est liée à une inhibition de la croissance cellulaire. P21 a été pour la première fois associé à la sénescence comme le gène *SDI1* (*Senescent cell-derived inhibitor 1*) (Noda, Ning et al. 1994). p21/*SDI1* a été mis en évidence lors d'un criblage visant à identifier des inhibiteurs de la synthèse d'ADN dans les fibroblastes sénescents. Cette même étude a montré que p21/*SDI1* est surexprimé de manière permanente dans les cellules sénescents, tandis que son expression est transitoire dans les cellules quiescentes (la

quiescence est un arrêt de la prolifération cellulaire réversible) (Noda, Ning et al. 1994). Ce résultat illustre le rôle de p21 dans le caractère irréversible du phénotype sénescence. P21 est également essentiel pour la mise en place de ce phénotype. En effet, son inactivation entraîne un retard de sénescence et une extension de la durée de vie des fibroblastes (Brown, Wei et al. 1997).

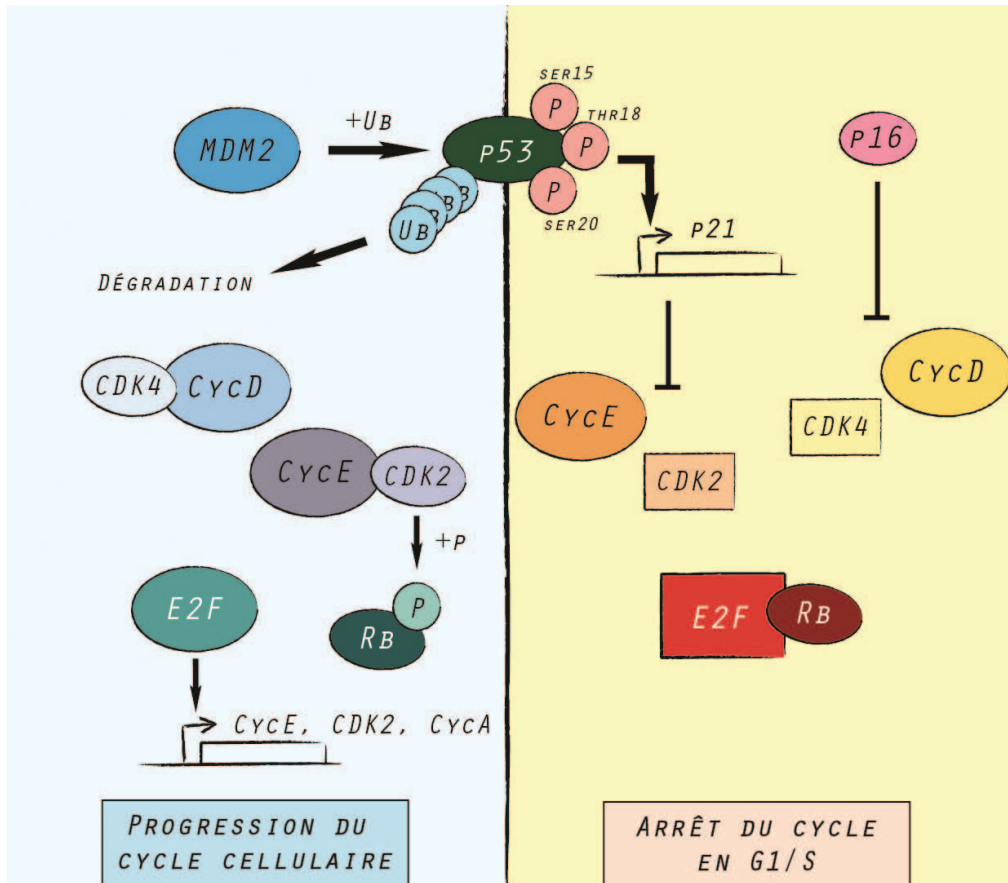
D'un point de vue mécanistique, p21 se lie avec CDK2, empêchant la formation du complexe Cycline E-CDK2 (Harper, Adami et al. 1993). P21 se lie également à CDK4 avec une affinité plus faible. En l'absence de cycline, les CDK n'exercent pas leur activité kinase. Ainsi, de par sa spécificité d'interaction avec CDK2 et dans une moindre mesure CDK4, p21 est un inhibiteur spécifique de la transition G1-S (**Figure 10**). Cette spécificité explique le fait que les cellules entrant en sénescence s'accumulent majoritairement en phase G1 du cycle cellulaire.

La protéine pRB

L'inhibition des complexes cycline/CDK par p21 a pour conséquence l'hypophosphorylation de la protéine pRB codée par le gène du rétinoblastome *Rb1* (Figure 10) (Stein, Beeson et al. 1990). pRB est un régulateur négatif du cycle cellulaire. Pour permettre la progression des cellules en phase S du cycle cellulaire, pRB est inactivé par phosphorylation ce qui empêche son interaction avec le facteur de transcription E2F1. La forme libre d'E2F1 se lie ainsi à l'ADN au niveau des promoteurs des gènes nécessaires à l'entrée en phase S du cycle cellulaire tels que les cyclines D1 et E (Ohtani, DeGregori et al. 1995). A l'inverse, en réponse à un stress qui active la voie p53/p21, pRB est hypophosphorylée et capte E2F1. Le complexe pRB-E2F1 est un répresseur transcriptionnel. En conséquence, les protéines de la transition G1-S ne sont pas exprimées, empêchant la progression du cycle cellulaire (Zhang, Postigo et al. 1999).

Figure 10. Acteurs protéiques de la transition G1/S.

Lors de la transition G1/S, les kinases dépendantes des cyclines (CDK) sont activées et phosphorylent la protéine RB1. Cette phosphorylation abolit l'interaction entre RB et E2F. Ainsi, le facteur de transcription E2F active l'expression de gènes nécessaires à la progression vers la phase S. Sous l'effet d'un stress, p53 est stabilisé et p21 surexprimé, inhibant les CDK. RB hypophosphorylée capte E2F, inhibant son activité transcriptionnelle, bloquant ainsi les cellules au niveau de la transition G1/S.



Comme p53, le rôle de pRB dans la sénescence avait été évoqué à partir d'expériences impliquant l'antigène T de SV40 ou la protéine E7 de HPV, qui interagissent avec pRB (Shay, Pereira-Smith et al. 1991). *RBI* est essentiel puisque la délétion du gène prévient l'entrée en sénescence (Wei, Herbig et al. 2003).

Un autre inhibiteur des CDK : p16

Un autre CDKI est impliqué dans le processus de sénescence répllicative : p16/*INK4A* (*Inhibitor of CDK4*). La protéine p16 a été identifiée à partir d'un test de double-hybride utilisant CDK4 comme appât (Serrano, Hannon et al. 1993). L'expression de p16 peut induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G1, de manière dépendante de pRB (Lukas, Parry et al. 1995). La protéine s'accumule dans les cellules sénescents, et interagit avec CDK4 et CDK6 (Alcorta, Xiong et al. 1996; Hara, Smith et al. 1996; Wong and Riabowol 1996). Contrairement à p21, p16 n'est pas sous le contrôle de p53. Elle est régulée par la voie RAS-RAF-MEK. Plus précisément le gène *INK4A* est sous le contrôle des facteurs de transcription ETS1 et ETS2 (Ohtani, Zebedee et al. 2001). Parallèlement, ETS1 et ETS2 sont inactivés par ID1. Dans les cellules sénescents, l'expression d'ETS1 est augmentée tandis qu'ID1 diminue, pouvant expliquer l'accumulation de p16. L'expression de p16 et p21 a été mesurée par western blot au cours de l'entrée en sénescence (Alcorta, Xiong et al. 1996; Stein, Drullinger et al. 1999; Dulic', Beney et al. 2000). La surexpression de p16 intervient après l'activation de p21 et l'arrêt de prolifération, insistant sur le rôle essentiel de p21. Quant à la protéine p16, elle semble être associée au maintien de l'arrêt de prolifération et du phénotype de sénescence cellulaire.

1.2. LA SÉNESCENCE CELLULAIRE PRÉMATURÉE

Les cellules murines possèdent des télomères significativement plus longs que les télomères humains, pourtant ces cellules entrent en sénescence après un très faible nombre de divisions cellulaires (inférieur à 10 pour des MEF en culture). Cette énigme suggère que d'autres inducteurs de sénescence existent, entraînant un arrêt de prolifération prématuré. Dans les cellules humaines, nombre de modèles de sénescence prématurée ont été proposés. Ils sont classés en deux catégories : les SIPS (*Stress-induced premature senescence*) et les OIS (*Oncogene-induced senescence*).

1.2.1. LA SÉNESCENCE PRÉMATURÉE INDUITE PAR UN STRESS (SIPS)

Le stress oxydatif

Comme cela a été évoqué précédemment, le stress oxydatif contribue au phénotype de sénescence, et la diminution du taux d'oxygène augmente la durée de vie des cellules (voir paragraphe 1.1.4). A l'inverse, un environnement hyperoxique induit une entrée en sénescence prématurée. Il a été observé que cette entrée en sénescence est corrélée à un raccourcissement accéléré des télomères (von Zglinicki, Saretzki et al. 1995). Au niveau moléculaire, p53, p21 et la forme hypophosphorylée de pRB s'accumulent lors de la sénescence induite par un stress oxydatif (Chen, Bartholomew et al. 1998). Expérimentalement, le stress oxydatif est fréquemment utilisé. L'exposition de fibroblastes à une dose subléthale de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (200µM pendant 2h) provoque l'entrée en sénescence prématurée (Chen and Ames 1994).

La sénescence prématurée induite par des dommages à l'ADN

Dès 1983, il avait été observé que l'exposition de fibroblastes aux rayons X (4Gy) entraînait une accumulation des cellules en phase G1 du cycle cellulaire (Nagasawa, Latt et al.

; Nagasawa and Little 1983). Cet effet n'était pas observé dans des cellules issues de patients atteints d'ataxia telangiectasia, une maladie génétique impliquant une mutation d'ATM, suggérant un rôle de la kinase ATM dans l'arrêt de prolifération. L'irradiation induit également l'activation de p53 puisque la délétion de p53 prévient l'arrêt en G1 (Kastan, Onyekwere et al. 1991; Kastan, Zhan et al. 1992; Kuerbitz, Plunkett et al. 1992). De plus, l'accumulation de la cycline A est inhibée par les rayons X, et les CDK nécessaires au passage en phase S sont inactivées (Dulic, Kaufmann et al. 1994). Enfin, pRB n'est plus phosphorylée. Globalement, l'induction de dommages à l'ADN par irradiation aux rayons X induit le même type de réponse cellulaire que le raccourcissement des télomères.

1.2.2. LA SENESCENCE PREMATUREE INDUITE PAR UN ONCOGENE

La dernière grande catégorie est la sénescence induite par un oncogène, ou OIS. L'exemple le plus étudié est la famille des protéines RAS (*Rat sarcoma*). Ce sont des guanosines triphosphatases jouant principalement le rôle de transducteur de signaux intracellulaires (Wennerberg, Rossman et al. 2005). Les trois protéines Ras sont très proches structurellement et fonctionnellement, et les trois ont été associées à de l'OIS, mais dans des types cellulaires différents. Les protéines RAS sont à l'origine de la cascade de phosphorylations RAF/MEK/ERK (Moodie, Willumsen et al. 1993) mais ont aussi été associées à la voie PI3K/AKT. La forme activée RAS^{G12V} entraîne l'entrée en sénescence dans des fibroblastes murins et humains, d'une manière dépendante des voies de p53 et/ou de p16, en fonction de la lignée cellulaire (Serrano, Lin et al. 1997).

L'OIS peut aussi être induite par l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur tel que PTEN (*Phosphatase and tensin homologue*). La phosphatase PTEN est un inhibiteur de la voie PI3K/AKT. L'inactivation de PTEN entraîne l'arrêt de la croissance cellulaire *via*

l'activation de la voie p53 et d'une manière dépendante de la voie PI3K/AKT (Chen, Trotman et al. 2005; Kim, Lee et al. 2007). Il est intéressant de noter que l'activation d'AKT seule n'a pas la même intensité de réponse, montrant que l'inhibition de PTEN agit sur d'autres voies de signalisation.

L'OIS est liée aux voies de réponses aux dommages de l'ADN comme le montre la formation de foyers de γ -H2AX. Néanmoins, le lien entre les oncogènes et la voie ATM/CHK2 n'a été exploré que récemment (Bartkova, Rezaei et al. 2006; Di Micco, Fumagalli et al. 2006). L'activation oncogénique entraîne une phase de réplication accélérée qui induit *in fine* un stress réplicatif et crée des cassures sur l'ADN. L'inhibition d'ATM suffit pour prévenir l'entrée en sénescence.

In vivo, l'existence de l'OIS dans les premières étapes du développement tumoral a été proposée du fait de la corrélation entre l'activation d'oncogènes ou l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs, et l'expression de marqueurs de la sénescence cellulaire. On trouve les exemples de PTEN dans les tumeurs de la prostate chez la souris (Chen, Trotman et al. 2005), NRAS dans les lymphomes (Schmitt, Fridman et al. 2002) ou encore BRAF dans le mélanome (Michaloglou, Vredeveld et al. 2005). L'activation du programme de sénescence en réponse à une activation oncogénique soutient son rôle dans la suppression tumorale, puisque l'inhibition supplémentaire des voies contrôlant la sénescence est nécessaire pour la transformation cellulaire : inactivation de p53 ou de p16. Les éléments supportant l'existence de la sénescence cellulaire dans les premières étapes du développement tumoral sont détaillés plus loin (voir paragraphe 1.4.1).

1.3. LES AUTRES CARACTERISTIQUES DES CELLULES SENESCENTES

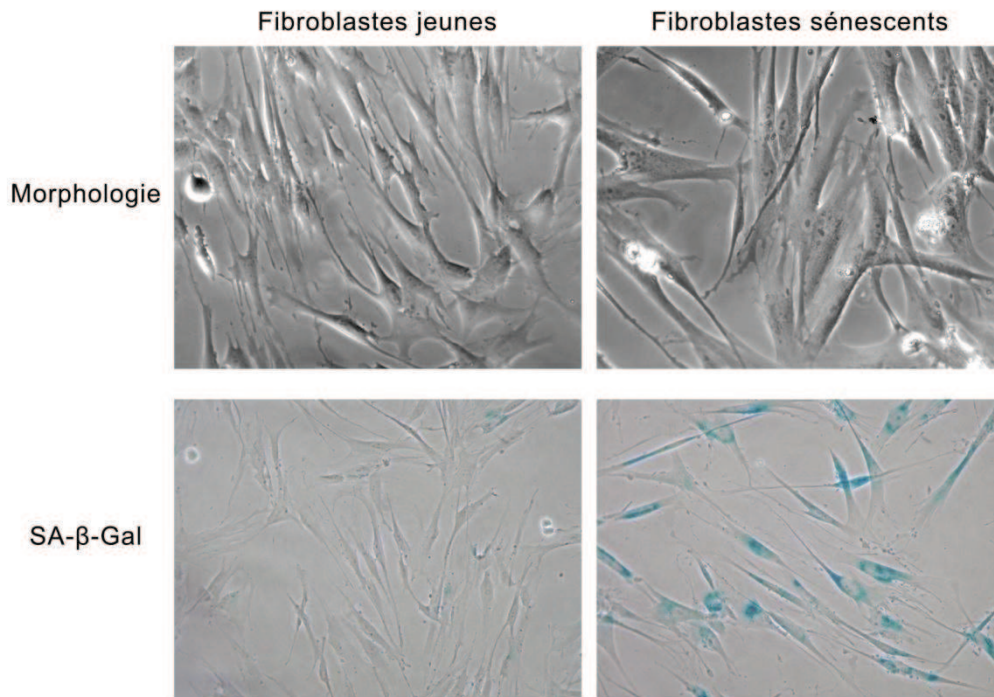
Mises à part les protéines qui contrôlent la progression du cycle cellulaire, d'autres voies de signalisation sont activées ou réprimées au cours de la sénescence et participent à la mise en place du phénotype.

1.3.1. MORPHOLOGIE

D'un point de vue morphologique, une cellule entrant en sénescence devient plus étalée, avec un noyau plus large et un volume cytoplasmique accru (**Figure 11**). Des modifications du cytosquelette sont à l'origine de cette morphologie caractéristique (Kelley, Trotter et al. 1980). L'origine de ce changement n'est pas clairement établie. La première hypothèse suppose une augmentation générale de la synthèse protéique. En effet, certaines équipes ont montré une augmentation de l'activation de la protéine mTOR (*Target of rapamycin*) qui contrôle l'initiation de la traduction protéique *via* la phosphorylation de 4EBP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1*) et la libération de facteur d'initiation eIF4E. L'activation de cette voie est impliquée dans l'accroissement de la synthèse protéique globale (Mamane, Petroulakis et al. 2006). De plus, l'utilisation d'un mutant de 4EBP1 capable de capter eIF4E de manière constitutive entraîne une diminution du volume cellulaire, allant dans le sens d'un rôle de la synthèse protéique (Fingar, Salama et al. 2002). La seconde hypothèse concerne le cytosquelette. La vimentine, un filament intermédiaire, est surexprimée au cours de la sénescence et forme des faisceaux épais et longs tandis qu'elle se structure normalement en filaments fins et courts dans les cellules en division. Il a été montré qu'une conséquence de la surexpression de la vimentine est l'augmentation de l'étalement des cellules (Nishio, Inoue et al. 2001). Plusieurs rapports ont également fait mention de variations de niveau d'expression et/ou d'organisation de l'actine et des microtubules

Figure 11. Modifications morphologiques des fibroblastes sénescents.

Observés au microscope, les fibroblastes sénescents apparaissent plus étalés et avec un plus gros noyau que les fibroblastes jeunes en division (ligne supérieure). D'autre part, le test enzymatique de détection de l'activité β -galactosidase à pH acide permet de visualiser les cellules sénescents par une coloration cytoplasmique bleue (ligne inférieure). (Photos réalisées au laboratoire)



(Chen, Tu et al. 2000; Nishio and Inoue 2005; Oender, Trost et al. 2008). Toutefois, l'origine de ces modifications reste à définir.

1.3.2. L'ACTIVITE B-GALACTOSIDASE SPECIFIQUE DE LA SENESCENCE (SA-BGAL)

Hormis l'accroissement de taille, une autre caractéristique phénotypique des cellules sénescents est l'augmentation du nombre et du volume des lysosomes (Lee, Han et al. 2006). Les lysosomes sont des vésicules intracytoplasmiques contenant une réserve d'hydrolases acides actives à un pH compris entre 3,5 et 5, et capables de dégrader les différents constituants cellulaires : nucléases, protéases, osidases et lipases. Ils ont un rôle important pour l'élimination et le recyclage des molécules/organites non fonctionnels ou surnuméraires. La β -galactosidase est naturellement présente dans les lysosomes. Bien que son activité soit optimale à pH 4, il a été proposé qu'une activité résiduelle existe à pH 6. Ainsi, du fait de l'augmentation de la quantité de lysosomes, donc de β -galactosidase, cette activité devient détectable dans les cellules sénescents. Les groupes travaillant sur la sénescence cellulaire utilisent par conséquent un test enzymatique qui utilise du X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside), substrat de la β -galactosidase qui apparaît bleu lorsqu'il est clivé (Dimri, Lee et al. 1995; Itahana, Campisi et al. 2007). Ainsi à pH 6, seules les cellules sénescents montrent une coloration bleue (**Figure 11**). Loin d'être directement corrélée au processus de sénescence, la spécificité du test SA- β Gal a été plusieurs fois remise en cause (Severino, Allen et al. 2000; Yang and Hu 2005). En effet, un marquage positif a été observé par exemple lorsque des fibroblastes ont été maintenus en culture avec une faible concentration de sérum, ou après une longue période à confluence. Néanmoins, il s'agit encore aujourd'hui d'une méthode efficace pour détecter la présence de cellules sénescents dans une population cellulaire hétérogène *in vitro* et *in vivo*, qui est très largement acceptée

dans la communauté scientifique lorsqu'elle est couplée à une autre technique, comme la détection de l'activation de la voie p53/p21 par exemple. Récemment, une variante du test enzymatique a été publiée, utilisant directement les propriétés des lysosomes, et révélant l'activité enzymatique par fluorescence, permettant une quantification plus précise et plus sensible des cellules sénescentes (Debacq-Chainiaux, Erusalimsky et al. 2009).

1.3.3. LES FOYERS D'HÉTÉROCHROMATINE ASSOCIÉS À LA SÉNESCENCE (SAHF)

Les protéines impliquées dans la formation des SAHF.

Au niveau nucléaire, l'utilisation d'un marqueur de l'ADN tel que le DAPI (4'6'-diamidino-2-phénylindole) montre l'apparition dans les cellules sénescentes de foyers de chromatine condensée. Ces foyers sont appelés SAHF (*senescence-associated heterochromatin foci*) (Narita, Nunez et al. 2003). Le terme hétérochromatine définit les zones de chromatine, c'est-à-dire l'ADN et les protéines qui lui sont associées, condensées et considérées comme étant transcriptionnellement inactives. Les SAHF sont des régions d'hétérochromatine dite facultative car elle est induite au cours de la sénescence, au contraire de l'hétérochromatine constitutive retrouvée par exemple au niveau des centromères. Les SAHF contiennent des protéines caractéristiques de l'hétérochromatine : HP1 (*heterochromatin protein 1*), le variant d'histone macroH2A et l'histone 3 méthylée sur la lysine 9 (H3K9m) (Zhang, Poustovoitov et al. 2005). La formation des SAHF est contrôlée par les régulateurs de la chromatine HIRA (*Histone cell cycle regulation defective A*) et ASF1a (*Anti-silencing function 1*) et nécessite la présence des corps nucléaires PML (*inducer of acute promyelocytic leukemia*). Les corps PML sont des complexes multiprotéiques contenant au moins la protéine PML et nécessaires à l'entrée en sénescence (Ferbeyre, de Stanchina et al. 2000; Pearson, Carbone et al. 2000). Séquentiellement, au cours de l'entrée en

sénescence, la voie WNT2/ β -caténine est d'abord inhibée permettant l'accumulation de la kinase GSK3 β (Ye, Zerlanko et al. 2007). GSK3 β phosphoryle la protéine HIRA sur le résidu sérine 697. Cette phosphorylation est nécessaire pour permettre la localisation de HIRA dans les corps PML. HP1 est également recruté dans les corps PML. Le recrutement de HIRA corrèle avec l'apparition du variant d'histone macroH2A au niveau des SAHF. Cette redistribution de macroH2A est dépendante de l'interaction entre HIRA et ASF1a. Enfin, HP1 quitte progressivement les PML et s'accumule dans les SAHF.

Rôle des SAHF dans l'arrêt du cycle cellulaire.

Narita *et al.* ont montré que la protéine RB1 jouait un rôle important dans la formation des SAHF (Narita, Núñez et al. 2003). Comme décrit précédemment, RB1 est un inhibiteur du facteur de transcription E2F1. Lors de l'entrée en sénescence, RB1 est hypophosphorylée et capte la protéine E2F1 qui ne peut pas activer ses gènes cibles. Puisque les gènes cibles d'E2F1 sont nécessaires pour le passage en phase S du cycle cellulaire, les cellules s'accumulent alors au niveau de la transition G1-S. Dans un modèle de sénescence prématurée induite par l'oncogène HRAS^{G12V}, l'utilisation d'un ARNi spécifique de RB1 ne prévient pas l'arrêt du cycle cellulaire, mais abolit la formation des SAHF ainsi que l'inhibition des gènes cibles d'E2F1 (Narita, Núñez et al. 2003). Les auteurs concluent que RB1 contribue aux modifications de l'hétérochromatine au cours de l'entrée en sénescence, entraînant l'accumulation d'hétérochromatine au niveau des promoteurs des gènes cibles d'E2F1 afin d'inhiber leur transcription.

1.3.4. LA RESISTANCE A L' APOPTOSE

Les cellules sénescents expriment des protéines anti-apoptotiques.

Une autre caractéristique importante des cellules sénescents est qu'elles sont résistantes à la mort programmée par apoptose. Cette propriété fut initialement décrite par Eugenia Wang (Wang 1995). E. Wang avait observé que les fibroblastes WI38 mourraient par apoptose après quatre semaines de culture à forte densité et en conditions de privation de sérum. Dans les mêmes conditions, les fibroblastes sénescents survivent à plus de 80%. Cette différence fut associée à une augmentation d'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*) dans les cellules sénescents qui persiste même après deux semaines de privation de sérum (Wang 1995). D'autres travaux ont montré l'implication d'une autre protéine anti-apoptotique, BCL-xL (*BCL-2-related protein, long isoform*). Après irradiation avec des UVB, le niveau de BCL-xL diminue dans les fibroblastes jeunes (*population doubling level* (PDL) 10) tandis qu'il augmente dans les fibroblastes âgés (PDL37), mais non sénescents (Rochette and Brash 2008). Cette dernière observation suggère que la résistance à l'apoptose est une conséquence du vieillissement cellulaire, mais pas de l'entrée en sénescence.

Le choix entre sénescence et apoptose.

A l'instar de son rôle dans la sénescence, le facteur de transcription p53 est également une protéine clé de l'apoptose, en activant l'expression des gènes impliqués dans la régulation de la mort cellulaire, tels que TNFRSF10b, TNFRSF6 et PUMA (Jackson and Pereira-Smith 2006). Dans les cellules sénescents, p53 cible préférentiellement les gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, n'activant pas les gènes de l'apoptose. Cette préférence serait associée à des modifications post-traductionnelles spécifiques de la sénescence. En effet, Jackson et Pereira-Smith ont observé que dans les cellules entrant en sénescence, p53 est

phosphorylé sur les résidus sérines 15 et 18, et hypophosphorylé sur les sérines 37, 46 et 392, tandis que les cellules traitées à la doxorubicine arborent une protéine p53 phosphorylée sur tous ces résidus, plus les sérines 6, 9 et 20. L'acétylation des lysines 373 et 382 est également spécifiquement décrite dans les cellules traitées (Jackson and Pereira-Smith 2006). Cette combinaison de modifications post-traductionnelles pourrait être une signature de l'activité pro-apoptotique ou pro-sénescence de p53, en sélectionnant ses gènes cibles.

1.4. LA SÉNESCENCE CELLULAIRE – *IN VIVO*

In vivo, la sénescence cellulaire possède plusieurs propriétés antagonistes. En effet, bien qu'il s'agisse d'un mécanisme de suppression tumorale protégeant l'organisme de l'émergence de cancers, l'accumulation de cellules sénescents pourrait jouer un rôle d'une part dans le vieillissement de l'organisme en affectant le bon fonctionnement des tissus, d'autre part dans le développement tumoral en stimulant la prolifération cellulaire à partir du stroma. Le but de ce chapitre est de faire le point sur les évidences qui appuient chacune de ces propriétés.

1.4.1. LA SÉNESCENCE EST UN MECANISME DE SUPPRESSION TUMORALE

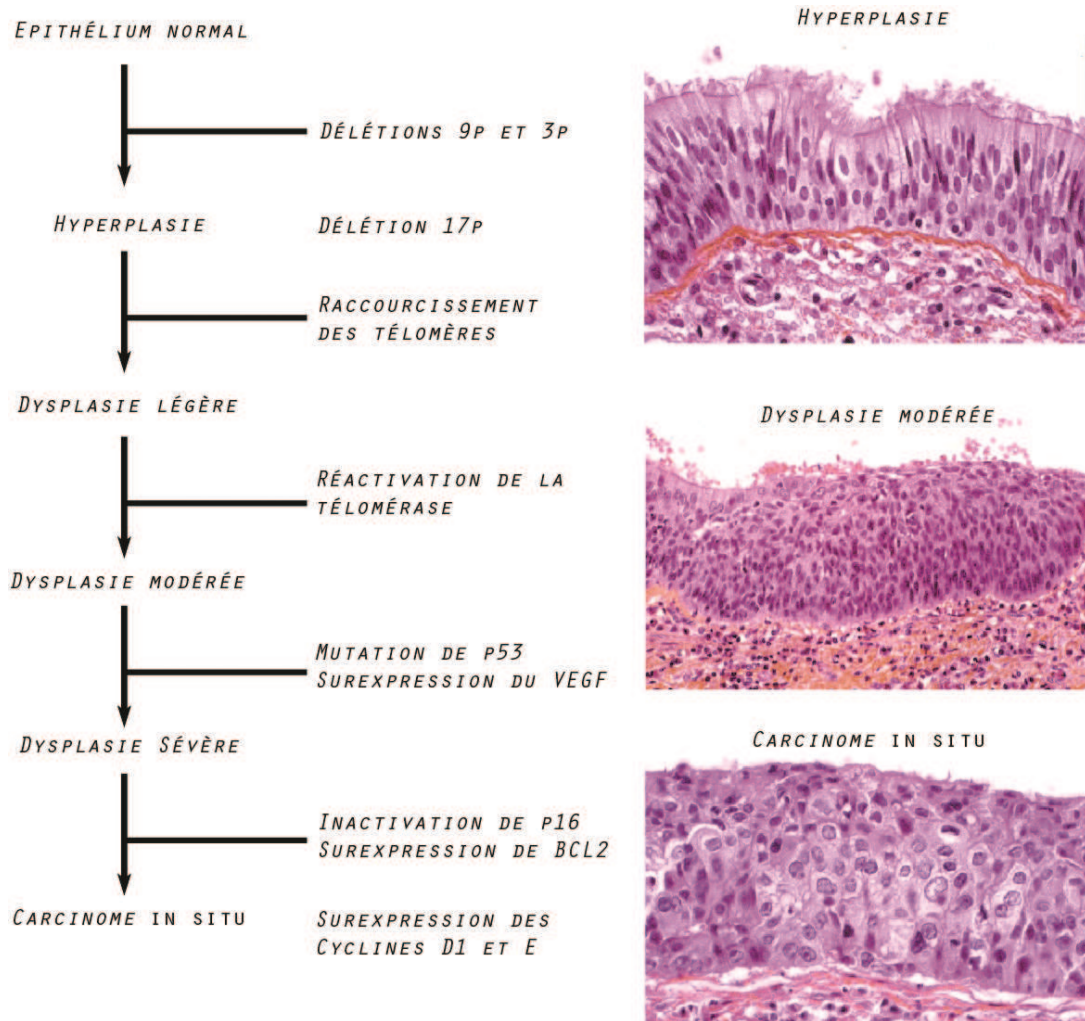
Le rôle potentiel de la sénescence dans la suppression tumorale découle des observations réalisées sur les cellules en culture. Tout d'abord, la sénescence est un arrêt de prolifération irréversible pouvant ainsi empêcher la multiplication d'une cellule tumorale. Ensuite, les stress capables d'induire l'entrée en sénescence sont tous liés à la transformation tumorale : dommages sur l'ADN après raccourcissement télomérique ou cassures, activation oncogénique. Enfin, l'analyse des marqueurs de sénescence *in vivo* a mis en évidence l'accumulation de cellules sénescents dans les lésions préneoplasiques, alors qu'elles sont

absentes dans les tumeurs (Braig, Lee et al. 2005; Chen, Trotman et al. 2005; Collado, Gil et al. 2005; Michaloglou, Vredeveld et al. 2005). Plusieurs modèles d'activation des oncogènes de la famille *RAS* chez la souris ont montré que les tumeurs induites dans les poumons, le pancréas ou la peau se développent d'abord sous la forme de lésions précancéreuses exprimant des marqueurs de sénescence, avant d'évoluer en tumeur proliférative (Collado, Gil et al. 2005; Dhomen, Reis-Filho et al. 2009). De la même façon, l'inhibition de la protéine suppressive de tumeurs PTEN ou l'activation d'AKT dans la prostate induit la formation des lésions néoplasiques appelées PIN (*prostate intraepithelial neoplasia*) exprimant des marqueurs de sénescence (Chen, Trotman et al. 2005; Majumder, Grisanzio et al. 2008). Ces caractéristiques sont retrouvées chez l'Homme, puisque les PIN expriment également des marqueurs de sénescence (Acosta, O'Loughlen et al. 2008). Ces observations suggèrent qu'il est nécessaire d'inhiber les voies qui contrôlent l'entrée en sénescence afin de permettre le développement tumoral, insistant sur son rôle de suppresseur de tumeur.

Je me suis intéressé au cours de ma thèse au modèle du cancer du poumon de type non à petites cellules (CPNPC). Les CPNPC se distinguent en deux principaux sous-types histologiques, les carcinomes à cellules squameuses (SCC) et les adénocarcinomes (ADK). SCC et ADK ont des origines cellulaires et moléculaires différentes. Les CPNPC se développent de manière séquentielle. Le modèle actuel est que l'épithélium bronchique devient hyperplasique suite à des réarrangements chromosomiques (**Figure 12**). L'hyperplasie cède la place à une dysplasie légère avant la réactivation de la télomérase. On parle alors de dysplasie modérée. Lorsque p53 subit une mutation, la lésion évolue au stade de dysplasie sévère. Puis les points de contrôle du cycle cellulaire sont levés, *via* l'inhibition de p16 et l'activation de cyclines. L'expression de BCL-2 inhibe la mort cellulaire par apoptose et la préneoplasie évolue en carcinome *in situ*.

Figure 12. Développement des lésions préneoplasiques dans le cancer du poumon.

La carcinogénèse bronchique est un processus multiétapes qui dépend de l'accumulation séquentielle de lésions. Avant la réactivation de la télomérase (hyperplasie et dysplasie légère), il est supposé que les lésions préneoplasiques s'enrichissent en cellules sénescentes et apoptotiques, dernières barrières contre le développement tumoral. (D'après Lantuejoul S et al., Histopathology, 2009)



Les cellules hyperplasiques accumulent des marqueurs des dommages de l'ADN : γ -H2AX, 53BP1, phospho-CHK2, et p53 (Gorgoulis, Vassiliou et al. 2005). Ces marqueurs ont pu être détectés dans des biopsies de patients. Aucune donnée sur l'expression de marqueurs de la sénescence n'a été à ce jour publiée, tandis que le taux d'apoptose est corrélé à l'expression des marqueurs de dommages à l'ADN. D'autres modèles permettent toutefois de supposer que les cellules sénescents s'accumulent dans les lésions préneoplasiques dans le poumon. Dans des biopsies de préneoplasies coliques, l'expression de marqueurs des dommages à l'ADN corrèle avec la SA- β -Gal et l'accumulation de p16/INK4A (Bartkova, Rezaei et al. 2006). D'autre part, dans un modèle de xénogreffes de cellules PDVC57 (cellules murines) injectées en sous-cutané, les tumeurs se développent d'abord sous la forme de préneoplasies exprimant la SA- β -Gal et HP1 γ d'une manière dépendante d'ATM, illustrant le lien entre la voie DDR et la sénescence cellulaire dans les lésions précancéreuses.

Une autre évidence de l'accumulation de cellules sénescents dans les lésions préneoplasiques bronchiques provient de modèles de souris transgéniques exprimant l'oncogène KRAS^{G12V}. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour exprimer la protéine mutée et éteindre le gène sauvage dans des souris adultes (Fisher, Wellen et al. 2001; Jackson, Willis et al. 2001; Johnson, Mercer et al. 2001). Dans cette étude, le modèle de souris transgénique mis au point par Guerra *et al.* en 2003 a été utilisé (Guerra, Mijimolle et al. 2003; Collado, Gil et al. 2005). La mutation sur le codon 12 est introduite par recombinaison avec le locus sauvage et placée sous le contrôle d'un STOP transcriptionnel. Ce STOP n'est enlevé que chez l'animal adulte afin de prévenir des problèmes de développement embryonnaire. Les souris hétérozygotes KRAS^{+/G12V} obtenues développent des tumeurs essentiellement localisées dans les poumons. Ces tumeurs se développent graduellement et Collado *et al.* ont analysé l'expression de marqueurs de la sénescence cellulaire dans les adénomes, ou

lésions précancéreuses et montré l'accumulation de cellules sénescents dans ces lésions. Ces marqueurs disparaissent ensuite dans les tumeurs malignes.

1.4.2. EFFETS NEFASTES DE L'ACCUMULATION DE CELLULES SENESCENTES

Sénescence et vieillissement

Le lien entre sénescence cellulaire et vieillissement n'est pas prouvé mais est soutenu par un certain nombre d'observations. Tout d'abord, les cellules sénescents s'accumulent dans les tissus avec l'âge. Chez les primates, le pourcentage de fibroblastes du derme contenant des TIF ou exprimant la SA- β -Gal augmente en fonction de l'âge de l'animal (Pendergrass, Lane et al. 1999; Herbig, Ferreira et al. 2006). Dans la peau humaine, la positivité à la SA- β -Gal est observée plus fréquemment chez les individus âgés (Dimri, Lee et al. 1995). La même corrélation a été obtenue lors de l'analyse de p16 (Ressler, Bartkova et al. 2006). L'expression de marqueurs de sénescence a également été détectée au niveau des cellules endothéliales de cornée et des chondrocytes articulaires chez des sujets âgés (Martin and Buckwalter 2001; Mimura and Joyce 2006). En 1991, Hastie *et al.* montraient que la longueur des télomères dans le sang et la muqueuse colique diminuait avec l'âge (Hastie, Dempster et al. 1990). La seconde observation est que les fibroblastes primaires mis en culture ont une capacité de prolifération inversement corrélée à l'âge du donneur (Goldstein, Littlefield et al. 1969; Martin, Sprague et al. 1970), bien que cette idée ait été également contredite (Cristofalo, Allen et al. 1998). De plus, pour le même âge, les cellules prélevées chez un individu atteint d'un syndrome de vieillissement prématuré entrent plus rapidement en sénescence que chez un individu sain (Goldstein, Littlefield et al. 1969; Martin, Sprague et al. 1970). Ensuite, il a été décrit qu'il existait un lien entre la durée de vie d'une espèce et la capacité de prolifération des fibroblastes prélevés chez celle-ci (Rohme 1981). Enfin, l'accumulation de cellules

sénescentes a été associée avec certaines pathologies liées à l'âge, comme l'athérosclérose, l'ostéoarthrite et la cirrhose (Price, Waters et al. 2002; Wiemann, Satyanarayana et al. 2002; Minamino and Komuro 2007).

Les conséquences de l'accumulation de cellules sénescentes sur le vieillissement restent à définir. La définition du vieillissement est l'accumulation de dysfonctionnements au niveau des différents organes d'un individu. Les cellules sénescentes pourraient être impliquées dans ces détériorations à deux niveaux. Premièrement, en affectant les cellules souches et progénitrices. Ce sont des cellules multipotentes présentes dans certains tissus et capables de se différencier en plusieurs types cellulaires, participant ainsi au renouvellement tissulaire. Les cellules souches se divisent peu, entrant dans un état de quiescence, c'est-à-dire d'arrêt de prolifération réversible, entre chaque division. Elles se divisent de manière asymétrique, de façon à générer une nouvelle cellule, la cellule progénitrice, et une seconde cellule fille identique à la cellule mère. La cellule progénitrice subit ensuite de nombreuses mitoses et différentes étapes de différenciation et est à l'origine d'un lignage cellulaire. Les cellules souches expriment également la télomérase. Il a été proposé que les cellules souches vieillissent. Par exemple, lors de greffes de moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques (HSC - *Hematopoietic stem cells*) prélevées chez une souris âgée sont moins efficaces pour recoloniser la moelle de la souris receveuse (Morrison, Wandycz et al. 1996; Chen, Astle et al. 1999). Chez l'Homme, l'augmentation de l'âge du donneur est un facteur de risque pour la mortalité du receveur (Kollman, Howe et al. 2001). Cette perte d'efficacité s'accompagne d'une augmentation du niveau d'expression de p16 avec l'âge (Janzen, Forkert et al. 2006), bien que le lien entre les deux observations soit discuté (Attema, Pronk et al. 2009). D'autre part, il a été montré que la transplantation de HSC d'un donneur jeune dans un environnement composé de cellules ayant des télomères dysfonctionnels

limitait la prise de greffe et altérait la mise en place de la nouvelle fonction hématopoïétique (Ju, Jiang et al. 2007). Des facteurs intrinsèques et extrinsèques pourraient ainsi détériorer la capacité des cellules-souches à régénérer les tissus, participant au vieillissement de l'organisme.

Sénescence et promotion tumorale

Les observations réalisées à partir de l'étude des niches des HSC mettent en évidence un rôle de la sénescence cellulaire dans le microenvironnement, c'est-à-dire l'ensemble des constituants, cellulaires et non cellulaires, qui entourent une cellule ou un groupe de cellules et interagissent avec elles afin d'influencer son devenir. S'il est important pour la protection des cellules souches, le microenvironnement a été montré comme étant un constituant prépondérant du développement tumoral. Appelé stroma tumoral, il est constitué de la matrice extracellulaire, de cellules immunitaires, des réseaux vasculaires sanguin et lymphatique et de fibroblastes. La matrice extracellulaire (ECM *Extracellular matrix*) est constituée de macromolécules telles que les collagènes, la laminine, la fibronectine et les protéoglycanes (Kalluri 2003). Une partie spécialisée de l'ECM est la membrane basale, qui sépare l'épithélium du stroma. Le rôle principal de l'ECM est de maintenir les contacts intercellulaires *via* des molécules d'adhérence comme les intégrines et la E-cadhérine. Dans le développement des tumeurs, ces interactions sont rompues grâce à un remodelage de l'ECM par des enzymes matricielles comme les MMP (*Matrix metalloproteinase*) (Kessenbrock, Plaks et al. 2010). L'inflammation et le recrutement de cellules immunitaires participent également au développement tumoral. Les cellules immunitaires majoritaires dans le stroma sont les macrophages associés à la tumeur (TAM *Tumor-associated macrophages*). Les TAM peuvent tuer les cellules cancéreuses sous l'effet de l'interleukine 2 (IL-2), l'interféron ou l'IL-12 (Brigati, Noonan et al. 2002; Tsung, Dolan et al. 2002). A l'inverse, ils produisent des

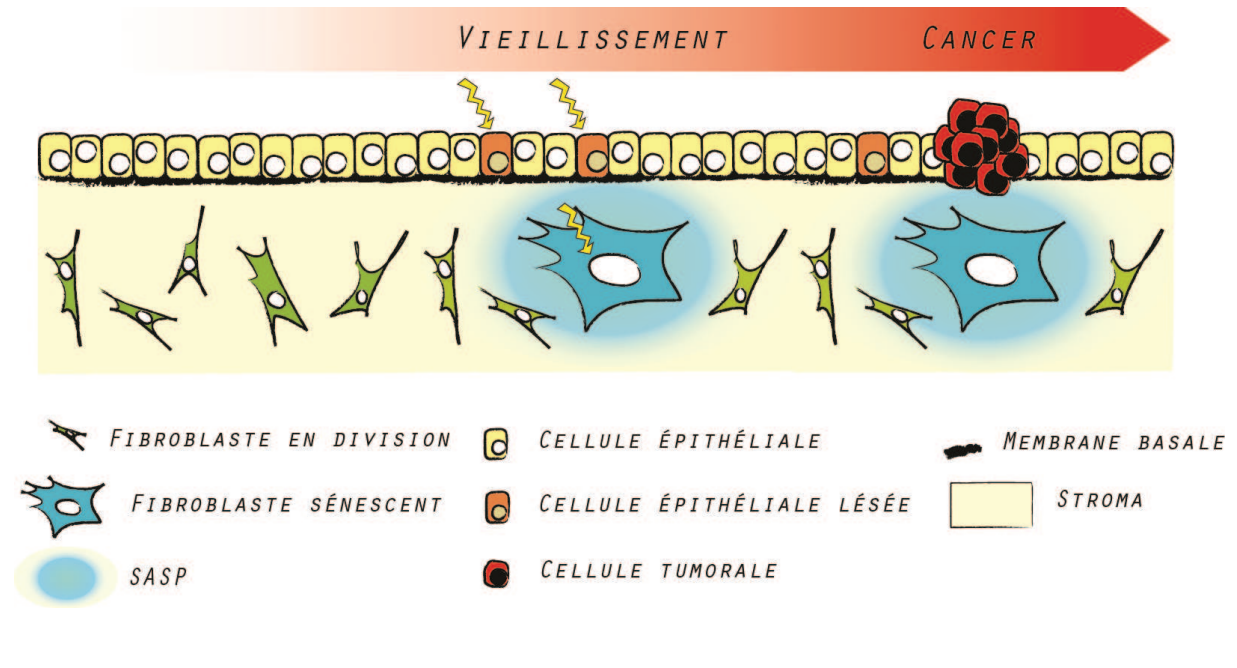
facteurs angiogéniques, facteurs de croissance, cytokines et protéases qui vont stimuler la croissance tumorale, en particulier en stimulant l'angiogenèse (Torisu, Ono et al. 2000; Schoppmann, Birner et al. 2002). Les neutrophiles, éosinophiles et lymphocytes T participent également au développement tumoral *via* la production de facteurs solubles (Coussens and Werb 2002). Ensuite, un réseau vasculaire se développe autour de la tumeur. A partir d'une certaine taille, elle a besoin de s'alimenter elle-même en nutriments et en oxygène (Hanahan and Folkman 1996). Deux mécanismes peuvent générer ces nouveaux vaisseaux : l'angiogenèse, qui crée des capillaires à partir de vaisseaux existants, et la vasculogenèse, qui utilisent des cellules progénitrices circulantes (Rafii, Lyden et al. 2002; Carmeliet 2003). Le recrutement de ces vaisseaux est soumis à l'influence de facteurs pro-angiogéniques dont le plus décrit est le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) (Folkman 1995) et anti-angiogéniques comme l'angiostatine (Kirsch, Strasser et al. 1998). Le VEGF est produit par les cellules tumorales hypoxiques grâce à l'expression du facteur de transcription HIF1 α (*Hypoxia-inducible factor*). Enfin, les cellules prépondérantes dans le stroma sont les fibroblastes associés au cancer (CAF *Cancer-associated fibroblast*) appelés aussi myofibroblastes car ils expriment l'actine de muscle lisse α SMA (*α Smooth muscle actin*) (Östman and Augsten 2009). L'origine des CAF n'est pas clairement définie, puisqu'il a été décrit qu'ils peuvent être issus de fibroblastes, préadipocytes, cellules musculaires lisses ou cellules dérivées de la moelle osseuse (Haviv, Polyak et al. 2009). Les CAF expriment de nombreux facteurs solubles, stimulant en autocrine et en paracrine la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et le recrutement de cellules immunitaires. Il a par ailleurs été montré que des CAF prélevés dans une tumeur prostatique peuvent stimuler la transformation de cellules épithéliales non-tumorigéniques lorsqu'elles sont co-injectées dans une souris immunodéprimée (Olumi, Grossfeld et al. 1999). Globalement, tous ces éléments qui

contrôlent la formation et le développement tumoral sont autant de pistes de développements thérapeutiques pour stopper voire prévenir l'apparition des cancers.

Les fibroblastes sénescents pourraient être un autre élément important du stroma tumoral. En effet, en réalisant des expériences de xénogreffes chez la souris *nude*, Krtolica *et al.* ont observé que la co-injection de cellules préneoplasiques avec des fibroblastes sénescents stimulait la vitesse d'apparition et de croissance des tumeurs (Krtolica, Parrinello *et al.* 2001). De plus, une population mixte de fibroblastes en division contenant uniquement 10% de cellules sénescents est suffisante pour observer ce résultat. Ces expériences ont permis d'illustrer une hypothèse émise dès 1997 par Judith Campisi (**Figure 13**). Elle avait proposé que les cellules sénescents jouent un rôle dans la promotion tumorale *via* la sécrétion de facteurs de croissances ou de cytokines ou en agissant sur la matrice extracellulaire (Campisi 1997; Campisi 2005). Le premier facteur proposé fut MMP3. La sécrétion de MMP3 par les fibroblastes sénescents a été montrée stimulant la prolifération de cellules épithéliales mammaires dans un modèle de culture en trois dimensions et affectant leur différenciation n favorisant un phénotype migratoire et invasif (Parrinello, Coppe *et al.* 2005). Depuis, l'effet promoteur de la tumorigenèse a été confirmé par d'autres équipes (Bavik, Coleman *et al.* 2006), et d'autres facteurs sécrétés par les fibroblastes sénescents ont été identifiés, formant le SMS (*Senescence-messaging secretome*) (Liu and Hornsby 2007; Kuilman and Peeper 2009), ou SASP (*Senescence-associated secretory phenotype*) (Young and Narita 2009). Confirmant l'hypothèse de Judith Campisi, le SASP comprend des cytokines (IL-6, IL-8), des facteurs de croissance (IGFBP7) et des modulateurs de la matrice extracellulaires (PAI-1) (Kortlever, Higgins *et al.* 2006; Acosta, O'Loughlen *et al.* 2008; Kuilman, Michaloglou *et al.* 2008; Wajapeyee, Serra *et al.* 2008). Toutefois ces facteurs ont été principalement étudiés dans le cadre de la mise en place du phénotype de sénescence, et seules les interleukines IL-6 et IL-8

Figure 13. Sénescence cellulaire et promotion tumorale.

Au cours du vieillissement, les cellules sont soumises à des stress exogènes (e.g. rayonnements) et endogènes (e.g. stress réplicatif, stress oxydatif). En conséquence, les cellules sénescentes s'accumulent dans les tissus. Ces cellules possèdent un sécrétome spécifique, nommé SASP, constitué de facteurs de croissance, de cytokines et d'enzymes matricielles. Le SASP modifie le microenvironnement, et pourrait stimuler des cellules préneoplasiques proches pour favoriser l'émergence d'une tumeur. (Modifié d'après Campisi J., Cell, 2005)



ont été associées à une augmentation du caractère invasif et à des phénomènes de transition épithélio-mésenchymateuse caractéristiques de l'agressivité tumorale (Coppé, Patil et al. 2008).

1.4.3. UTILISATION DES CELLULES SÉNESCENTES EN CLINIQUE

Utilisation des marqueurs de sénescence dans le diagnostic et le pronostic

Ces différents éléments soulèvent l'importance des marqueurs des cellules sénescences dans le diagnostic des cancers. Si l'accumulation de cellules sénescences est caractéristique des lésions précancéreuses, on comprend l'intérêt de mettre au point des outils de détection de ces cellules pour identifier les patients à risques. Néanmoins certaines limitations existent encore. Premièrement les marqueurs existants sont indirects, c'est-à-dire qu'ils permettent d'identifier des voies de signalisations prenant part au processus de sénescence, mais pas seulement. Ainsi seule la somme de marqueurs de l'hétérochromatine, des voies DDR, de l'arrêt du cycle cellulaire et la SA- β -Gal permettent de conclure sur la présence de cellules sénescences. Deuxièmement, les marqueurs aujourd'hui disponibles nécessitent des méthodes invasives telles que la biopsie pour être utilisés, afin de réaliser des marquages immunologiques sur coupes tissulaires. La stratégie actuelle, faisant également l'objet de ce travail de thèse, est d'identifier des marqueurs solubles, détectables dans les fluides biologiques, et dont la concentration serait liée à l'accumulation de cellules sénescences.

Applications thérapeutiques

Les traitements chimiothérapeutiques conventionnels ont pour but de stopper la prolifération cellulaire *via* des dommages à l'ADN. Que ce soit en bloquant les topoisomérases (Irinotecan, doxorubicin), en créant des ponts entre deux nucléotides avec des agents alkylants (cyclophosphamides) ou en utilisant des nucléotides modifiés (5-

fluorouracile), des cassures sont créées qui ne peuvent être réparées par la cellule. La majorité des cellules entre par conséquent en apoptose. En 1999, Chang *et al.* décrivaient pour la première fois dans plusieurs lignées cellulaires l'apparition d'une sous-population de cellules tumorales sénescents en réponse à un traitement chimiothérapeutique à une faible dose (Chang, Broude et al. 1999). La même observation était faite dans un modèle de souris transgéniques E μ -myc développant des lymphomes non-Hodgkiniens humains. Lorsque ces souris sont traitées avec des cyclophosphamides, une proportion des cellules tumorales entre en sénescence (Schmitt, Fridman et al. 2002). Enfin chez l'Homme, l'expression de marqueurs de la sénescence a été corrélée à l'administration de traitements par carboplatin et taxol dans les cancers bronchiques (Roberson, Kussick et al. 2005) ou cyclophosphamides, adriamycine et 5-fluorouracil dans le cancer du sein (de Poele, Okorokov et al. 2002). La sénescence cellulaire contribuerait ainsi à l'arrêt de la croissance tumorale.

Mais l'apparition de cellules tumorales sénescents pourrait avoir un effet secondaire néfaste. L'activation des voies de résistance à l'apoptose dans ces cellules diminue leur sensibilité aux traitements. Dans les souris E μ -myc, certaines échappent à la sénescence et recommencent à proliférer, tout en conservant cette propriété de résistance. Ainsi, les cellules tumorales sénescents pourraient être à l'origine d'une rechute avec la formation de tumeurs résistantes aux agents chimiothérapeutiques (Schmitt, Fridman et al. 2002; Roberson, Kussick et al. 2005).

2. LES PROTEINES WNT

La présente étude s'est intéressée au rôle de la protéine WNT16B dans la sénescence cellulaire. Les WNT, pour *Wingless-type MMTV integration site*, sont des protéines de signalisation extracellulaires. Elles jouent un rôle prépondérant dans la communication intercellulaire, régulant ainsi l'homéostasie des tissus. Sécrétées, les protéines WNT interagissent avec des récepteurs membranaires, principalement de la famille Frizzled (FZ). Cette interaction initie l'activation de voies de signalisation intracellulaire pour induire l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la survie, la motilité, le contrôle des jonctions intercellulaires. Ainsi, la famille des protéines WNT est associée à de nombreux processus cellulaires *via* la transcription de nombreux gènes cibles, en particulier dans le développement embryonnaire, et plus récemment dans le maintien des cellules souches. La dérégulation des voies de signalisation WNT est souvent létale, ou à l'origine du développement tumoral chez l'adulte.

2.1. LES MEMBRES DE LA FAMILLE WNT CHEZ L'HOMME

2.1.1. DECOUVERTE DE WNT1

WNT1 fut découvert chez la souris comme le site d'intégration du virus MMTV (*Mammary mouse tumor virus*) (Nusse and Varmus 1982). Le MMTV est un rétrovirus capable d'induire des adénocarcinomes de la glande mammaire. Du fait de son incapacité à transformer des cellules en culture et de la période de latence observée avant l'apparition des adénocarcinomes chez la souris, il a été supposé que le virus active un oncogène dans la cellule-hôte. L'ADN viral a été retrouvé inséré dans le génome des cellules-hôtes préférentiellement au niveau d'un locus sur le chromosome 15 appelé *int1*. A partir de ce locus, les chercheurs isolèrent un ARN polyadénylé de 2,6kb uniquement dans les tumeurs,

suggérant la présence d'un gène surexprimé après insertion de l'ADN viral. Ce nouvel oncogène potentiel, baptisé *int1*, fut retrouvé chez l'Homme (van 't Veer, van Kessel et al. 1984; van Ooyen, Kwee et al. 1985), et chez la Drosophile où il correspond au gène de polarité segmentaire *Wingless*. Par conséquent, *INT1* fut remplacé par la dénomination mixte *WNT1* (Rijsewijk, Schuermann et al. 1987; Nusse, Theunissen et al. 1990; Nusse, Brown et al. 1991). Le rôle d'*INT1/WNT1* comme oncogène a été soutenu par des expériences de surexpression dans des cellules mammaires cuboïdales RAC311C (Rijsewijk, van Deemter et al. 1987). Ces cellules ne sont initialement pas tumorigènes mais l'activation d'*INT1/WNT1* entraîne leur transformation. En parallèle, d'autres gènes *int2* et *int3* avaient été identifiés comme activés après insertion de l'ADN proviral du MMTV (Peters, Brookes et al. 1983; Gallahan, Kozak et al. 1987). Toutefois, ces gènes ne sont pas liés à *int1* puisque *int2* code pour un membre de la famille du FGF et *int3* pour une protéine membre de la famille Notch (Jhappan, Gallahan et al. 1992).

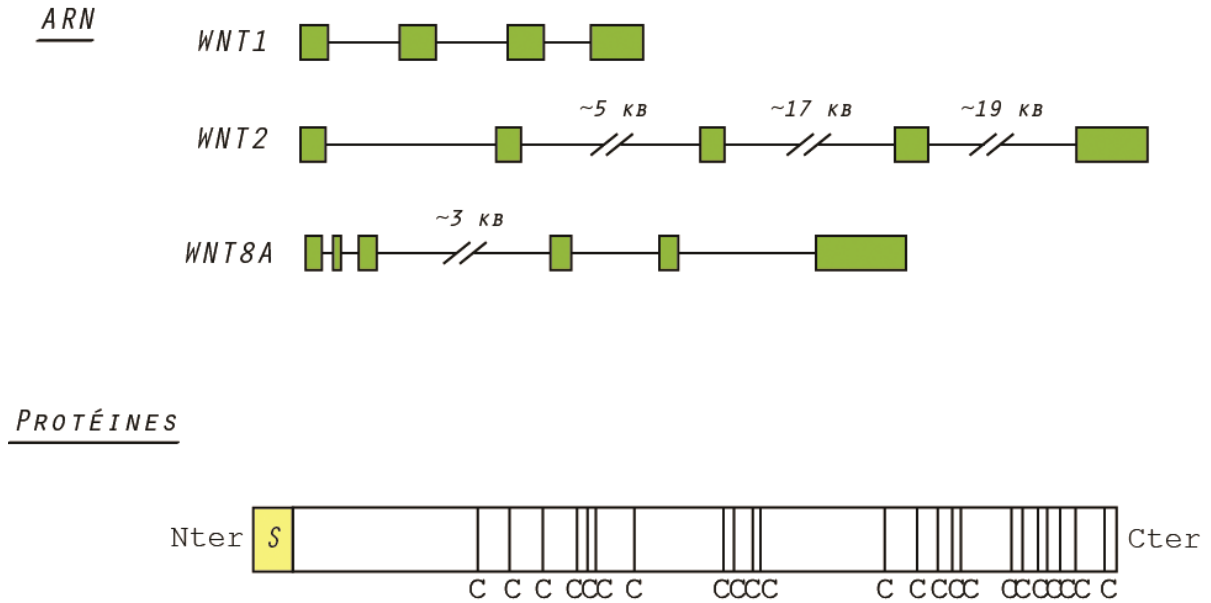
WNT2 a ensuite été identifié à partir d'une banque d'ADNc de poumons humains (Wainwright, Scambler et al. 1988). Comme *WNT1*, la surexpression de *WNT2* dans des cellules épithéliales mammaires entraîne leur transformation (Blasband, Schryver et al. 1992). A ce jour, 19 gènes *WNT* ont été identifiés chez l'Homme (**Tableau 1**).

2.1.2. CARACTERISTIQUES GENERALES DES PROTEINES WNT

Les protéines WNT contiennent un squelette de vingt-et-un à vingt-trois résidus cystéines dont la distribution est très conservée (**Figure 14**). Elles possèdent également un peptide signal à leur extrémité amino-terminale qui est nécessaire pour leur sécrétion. La purification d'une grande quantité de protéines WNT a longtemps été reportée comme difficile en raison de leur faible solubilité. En cause, des modifications post-traductionnelles telles que la

Figure 14. Structure des ARN et protéines WNT.

Les ARN WNT sont fréquemment constitués de quatre (e.g. WNT1) ou cinq exons (e.g. WNT2) espacés d'introns de longueur variable, à l'exception de WNT8A et WNT8B. Quelle que soit la structure nucléaire, les protéines WNT partagent deux caractéristiques : la présence d'un peptide signal (S) à l'extrémité amino-terminale permettant la sécrétion, et un squelette de 21 à 23 résidus de cystéines.



palmitoylation qui sont nécessaires pour la sécrétion (Willert, Brown et al. 2003). La conséquence est qu'aucune protéine WNT n'a encore été cristallisée à ce jour, ainsi leur structure exacte de même que le rôle des cystéines restent inconnus.

Tableau 1. Les gènes WNT chez l'Homme.

Gène	Nom initial	Autres noms	Chromosome	RefSeq IDs	Nombre d'exons
WNT1	INT1		12q13	NM_005430	4
WNT2	INT1L1	IRP	7q31	NM_003391	5
WNT2B	WNT13	XWNT2	1p13	NM_004185	5
WNT3	INT4	MGC131950, MGC138321, MGC138323	17q21-q22	NM_030753	4
WNT3A			1q42	NM_033131	4
WNT4		WNT-4	1p36.23-p35.1	NM_030761	5
WNT5A		hWNT5A	3p21-p14	NM_003392	5
WNT5B			12p13.3	NM_030775	4
WNT6			2q35	NM_006522	4
WNT7A			3p25	NM_004625	4
WNT7B			22q13	NM_058238	4
WNT8A		WNT8D	5q31	NM_058244	6
WNT8B			10q24	NM_003393	6
WNT9A	WNT14		1q42	NM_003395	4
WNT9B	WNT15	WNT14B	17q21	NM_003396	4
WNT10A			2q35	NM_025216	4
WNT10B		WNT-12, SHFM6	12q13	NM_003394	4
WNT11			11q13.5	NM_004626	5
WNT16			7q31	NM_057168	4

Historiquement, la qualité de proto-oncogènes de WNT1 et WNT2 avait été caractérisée à partir de leur capacité à induire la transformation des cellules épithéliales mammaires murines C57MG. Selon ce modèle, les autres protéines WNT ont été classées selon deux catégories : WNT1, WNT2, WNT3, WNT3A et WNT11 induisent la transformation des C57MG, tandis que WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7B et WNT9B n'en sont pas ou peu capables (Wong, Gavin et al. 1994; Shimizu, Julius et al. 1997; Naylor, Smalley et al. 2000). Plus tard, ces deux groupes ont pu être associé à deux voies de signalisation : les protéines WNT

transformantes activent les voie de la β -caténine, tandis que les WNT non transformantes activent des voies non canoniques.

2.2. LES VOIES DE SIGNALISATION WNT

2.2.1. LES RECEPTEURS

Une fois sécrétées, les ligands WNT se lient à un récepteur au niveau de la membrane cellulaire composé des protéines Frizzled (FZ) et LRP. Les FZ sont une famille de dix récepteurs couplés à des protéines G, à sept domaines transmembranaires (Bhanot, Brink et al. 1996). Tous les FZ possèdent une région conservée de 120 acides aminés incluant un motif de dix cystéines (*Cysteine-rich domain* CRD). Ce domaine CRD est nécessaire et suffisant pour la liaison avec le ligand WNT (Dann, Hsieh et al. 2001). LRP5 et LRP6 (*Low density lipoprotein receptor-related protein*) sont des protéines possédant un seul domaine transmembranaire, étant nécessaire à l'activation de la voie de la β -caténine (Tamai, Semenov et al. 2000; Wehrli, Dougan et al. 2000). Une protéine LRP6 ne possédant pas de domaine cytoplasmique bloque la voie WNT de manière dominante-négative (Tamai, Zeng et al. 2004). A l'inverse, l'absence du domaine extracellulaire active cette voie de manière constitutive. En effet, ce domaine sert de récepteur à l'inhibiteur extracellulaire Dickkopf1 (DKK1) (Mao, Wu et al. 2001; Mao, Wang et al. 2001). Alors que la présence de LRP5/6 est nécessaire pour activer la voie de la β -caténine, le récepteur FZ peut être suffisant pour d'autres voies.

Finalement, d'autres récepteurs des WNT ont été mis en évidence, ROR2 et RYK qui sont des récepteurs à activité tyrosine kinase. ROR2 possède un domaine CRD extracellulaire. Il a été montré comme interagissant avec WNT5A pour induire la voie WNT/JNK et inhiber la voie de la β -caténine (Oishi, Suzuki et al. 2003; Mikels and Nusse 2006). RYK possède un

domaine extracellulaire similaire à l'inhibiteur des WNT appelé WIF1 (*WNT inhibitory factor 1*) (Patthy 2000). RYK possède également un domaine tyrosine kinase dans sa partie cytosolique (Halford and Stacker 2001). Toutefois, certains résidus manquent pour que ce domaine montre une activité. RYK a été montré interagissant avec WNT1 et WNT3A et étant nécessaire pour l'activation de la voie WNT1/ β -caténine (Lu, Yamamoto et al. 2004). RYK semble former un complexe avec FZ8 et WNT1. D'autre part, RYK coimmunoprécipite avec Dishevelled (DVL) *via* un domaine d'interaction protéine-protéine PDZ. L'inhibition de DVL abolit l'activation de la voie de la β -caténine par le complexe RYK-WNT3A. Ainsi, RYK agit comme co-récepteur avec FZ pour activer la voie canonique.

Chaque ligand WNT n'est pas spécifique d'un récepteur. Ainsi, la protéine WNT5A a été décrite liée à FZ5 seul ou au couple FZ4/LRP5, activant ainsi la voie β -caténine, mais peut aussi interagir avec ROR2, inhibant la voie β -caténine dans ce cas (Mikels and Nusse 2006). Ainsi, l'identité du couple ligand/récepteur, plutôt que la protéine WNT seule, semble être associée à une voie de signalisation spécifique. Certaines des associations WNT/récepteur ayant été définies chez l'Homme sont spécifiées dans le **Tableau 2**.

2.2.2. LES INHIBITEURS EXTRACELLULAIRES

Puisque les protéines WNT agissent selon un mode paracrine ou autocrine, une partie des régulateurs des voies WNT sont également sécrétés et inhibent les interactions entre les ligands et leurs récepteurs. Les trois principales familles d'inhibiteurs extracellulaires sont les sFRP, les DKK et WIF1.

Les protéines sFRP-1 à 5 (*Soluble Frizzled-related proteins*) possèdent dans leur partie amino-terminale un domaine CRD ressemblant à celui présent sur la partie extracellulaire des récepteurs FZ (Melkonyan, Chang et al. 1997). Les sFRP peuvent interagir soit avec les

ligands WNT, soit avec les récepteurs FZ sans activer de voie de signalisation (Lin, Wang et al. 1997; Bafico, Gazit et al. 1999). Ainsi, les sFRP empêchent l'interaction entre WNT et FZ.

Tableau 2. Les interactions WNT/récepteur décrites chez l'Homme.

WNT	Récepteur	Voie 1	Voie 2	Références
WNT1	Fz8, Ryk, Ror2	β -caténine	-	(Lu, Yamamoto et al. 2004; Billiard, Way et al. 2005)
WNT2	Fz9	β -caténine	E-cadhérine	(Karasawa, Yokokura et al. 2002; Wang, Tekpetey et al. 2009)
WNT3	Fz1, Fz7,LRP6	β -caténine	-	(Gazit, Yaniv et al. 1999; Kim, Lee et al. 2008)
WNT3A	Fz8/LRP6, Fz1	β -caténine	PI3K/AKT	(Sonderegger, Haslinger et al. 2010)
WNT4	Fz6	β -caténine	P38/ERK	(Chang, Sonoyama et al. 2007)
WNT5A	Fz3, Fz5, Ror2, Fz2	Calcium (PKC)	ERK, JNK	(Almeida, Han et al. 2005; Dissanayake, Wade et al. 2007; O'Connell, Fiori et al. 2010)
WNT5B	Ror2, Ryk	Indépendant de la β -caténine (ERK5/PPAR γ ?)	Calcium	(Morioka, Tanikawa et al. 2009; Lin, Baye et al. 2010)
WNT7A	Fz9, Fz5/LRP6	ERK5/PPAR γ	JNK, E-cadhérine, β -caténine	(Winn, Marek et al. 2005; Winn, Van Scoyk et al. 2006)
WNT11	Fz7, Ryk	PKC	E-cadhérine	(Kim, Her et al. 2008)

La famille Dickkopf comprend quatre membres, DKK1 à DKK4. Ils contiennent deux motifs CRD (Glinka, Wu et al. 1998). DKK1 se lie aux récepteurs LRP5/6 (Bafico, Liu et al. 2001; Mao, Wu et al. 2001). Cette interaction prévient la formation du complexe FZ/LRP6 (Seménov, Tamai et al. 2001). DKK1 a également été montré interagissant avec les protéines transmembranaires Kremen1 (KRM1) et 2. DKK1, KRM1 et LRP5/6 forment un complexe qui est internalisé par endocytose, limitant la quantité de LRP5/6 à la membrane et inhibant ainsi la signalisation WNT (Mao, Wu et al. 2002).

Une autre protéine, WIF1 (*WNT inhibitory factor*), se lie aux protéines WNT et inhibe leur signalisation en empêchant l'interaction ligand-récepteur (Hsieh, Kodjabachian et al. 1999). WIF1 possède dans sa partie amino-terminale un domaine WIF spécifique, conservé parmi les espèces, et retrouvé dans la protéine RYK (Patthy 2000).

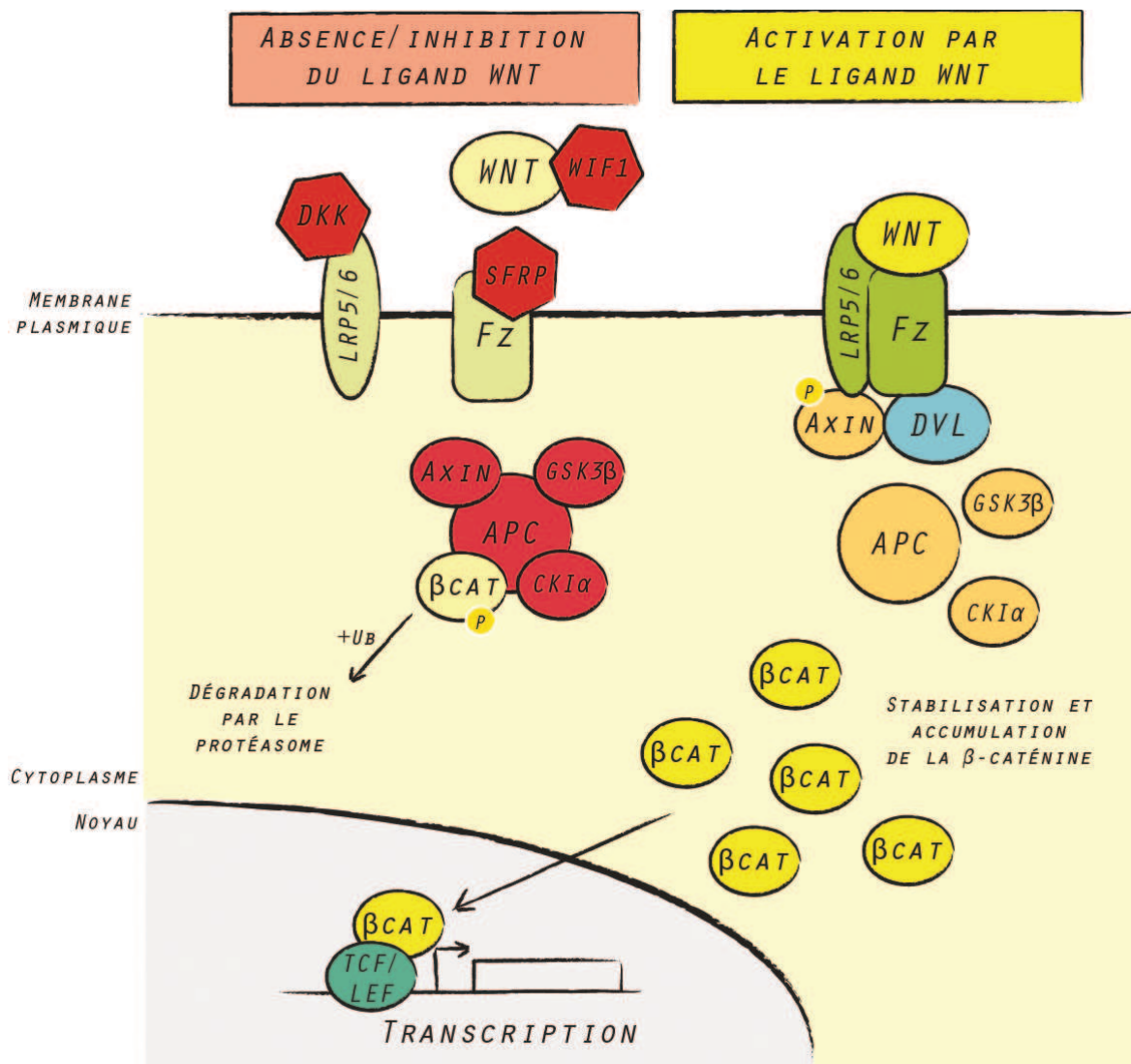
2.2.3. LA VOIE WNT/ β -CATENINE

La voie WNT/ β -caténine, ou « voie canonique », est la plus fréquemment associée aux ligands WNT et est conservée au cours de l'évolution. En l'absence de stimulation, la protéine β -caténine, localisée dans le cytoplasme, est rapidement dégradée par un complexe Axin/APC/GSK3 β (**Figure 15**) (Kimelman and Xu 2006). D'autres protéines interviennent pendant le processus de dégradation, comme CKI α et la protéine phosphatase PP2A. L'Axin est la protéine cœur du complexe qui relie les différents acteurs grâce à plusieurs domaines d'interaction. Une fois la β -caténine séquestrée dans le complexe *via* l'Axin, les kinases CKI α puis GSK3 β phosphorylent son extrémité amino-terminale. La β -caténine phosphorylée est prise en charge par la protéine APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) et est poly-ubiquitinylée par une E2 ligase, puis dégradée dans le protéasome.

Lorsqu'un ligand WNT active les co-récepteurs FZ et LRP, le complexe APC n'est plus capable d'induire la dégradation de la β -caténine. Le mécanisme d'action reste inconnu. Il semble impliquer le recrutement de l'Axin au niveau du co-récepteur LRP, *via* sa phosphorylation, déstabilisant ainsi le complexe. Une protéine appelée Dishevelled (DVL) apparaît également jouer un rôle important puisque la surexpression de DVL est capable d'activer la β -caténine en l'absence de ligand. DVL interagirait notamment avec l'Axin (Kishida, Yamamoto et al. 1999). Stabilisée, la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme et dans le noyau, où elle se lie avec les facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (Gordon and Nusse 2006). Initialement éléments de complexes répresseurs, les facteurs de transcription TCF/LEF deviennent activateurs de l'expression de gènes dont les exemples caractéristiques sont *c-MYC* et *cyclin D*.

Figure 15. La voie WNT/ β -caténine.

En l'absence d'interaction entre un ligand WNT et le complexe récepteur FZ/LRP5-6, la β -caténine est phosphorylée par le complexe APC et dégradée par le protéasome. L'activation du récepteur conduit à la déstabilisation du complexe APC et la stabilisation de la β -caténine. La protéine s'accumule dans le noyau et participe à la transcription de gènes. Plusieurs types d'inhibiteurs extracellulaires peuvent empêcher l'interaction entre le ligand et son récepteur, en bloquant soit la protéine WNT (WIF1), soit le récepteur (SFRP), soit le co-récepteur (DKK).



Alternativement, l'augmentation de la concentration de β -caténine peut entraîner son accumulation au niveau membranaire (Nelson and Nusse 2004). La β -caténine est un composant des jonctions adhérentes dont le rôle est de faire le lien entre les cadhérines et le cytosquelette d'actine. Par exemple, l'expression de WNT16B dans des cellules de leucémies entraîne l'accumulation de β -caténine au niveau des jonctions adhérentes et de la N-cadhérine (Nygren, Døsen-Dahl et al. 2009). Autre exemple, WNT7A a été associé à une activation de la voie WNT/ β -caténine et une forte expression de la E-cadhérine (Ohira, Gemmill et al. 2003). Les cellules exprimant la E-cadhérine sont peu mobiles et peu invasives. Ainsi, l'expression de WNT7A est fréquemment perdue dans les tumeurs bronchiques.

En plus de la β -caténine, d'autres voies de signalisation WNT ont été identifiées (Semenov, Habas et al. 2007). Par analogie avec ce qui était connu notamment chez la drosophile, ces voies de signalisation « non-canoniques » ont été catégorisées comme la voie de polarité planaire ou PCP, et la voie calcique (**Figure 16**).

2.2.4. LA VOIE DE POLARITE PLANAIRE

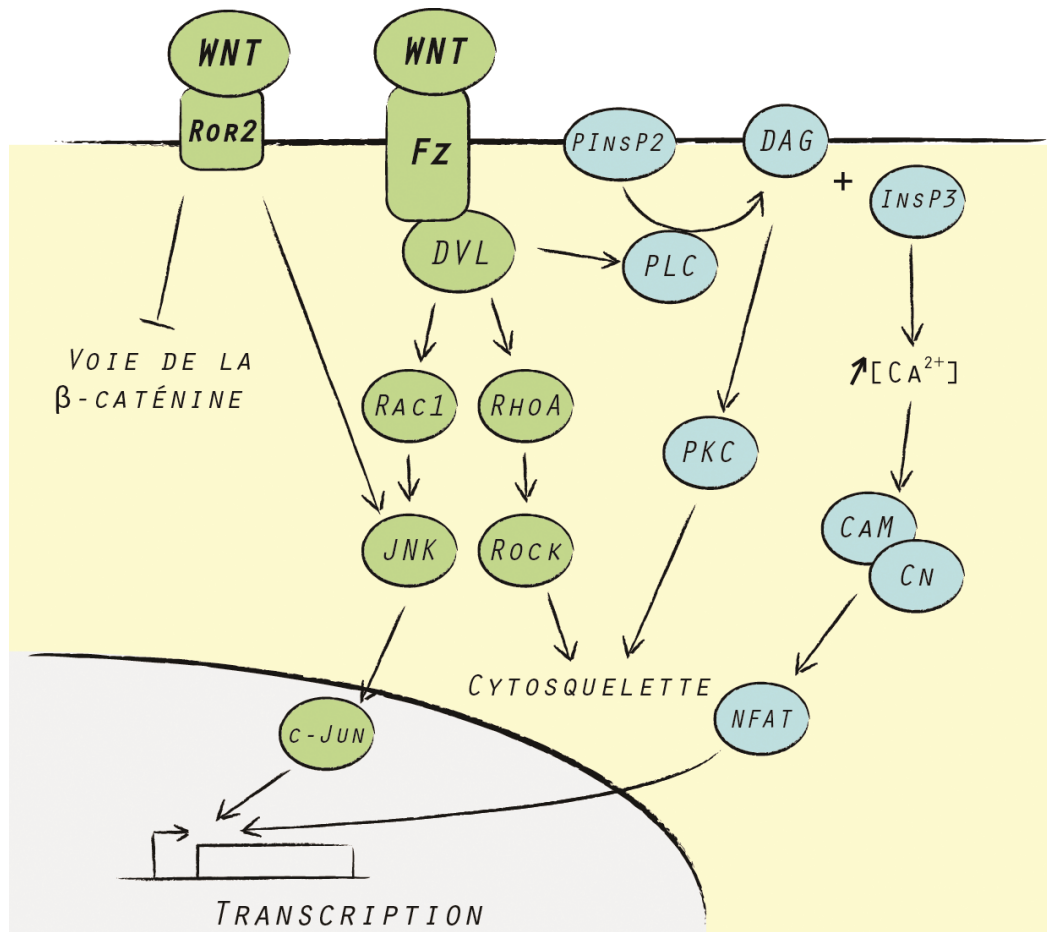
La notion de PCP fait référence à l'acquisition d'une polarité cellulaire dans le plan d'un épithélium, par opposition à une polarisation selon un axe apical/basal. Cette polarité planaire est importante notamment pour la gastrulation, une étape du développement embryonnaire au cours de laquelle le troisième feuillet, le mésoderme, s'insère entre l'ectoderme et l'endoderme. Cette étape nécessite la migration des cellules du mésoderme selon un mouvement appelé extension convergente. La voie WNT/PCP est primordiale pour permettre ce mouvement (Veeman, Axelrod et al. 2003). Elle est activée par l'interaction WNT/FZ et ne nécessite pas de récepteur LRP5/6. L'activation du récepteur permet le recrutement de DVL, auquel se lie ensuite la protéine adaptatrice DAAM1 (*Dishevelled-associated activator of*

Figure 16. Voies de signalisation WNT non canoniques.

Les ligands WNT peuvent activer les voies PCP (Polarity cell pathway) (vert) et WNT/Ca²⁺ (bleu).

La voie PCP possède deux branches principales : la cascade JNK et la cascade des protéines RHO. La première induit l'expression de gènes via le facteur de transcription C-JUN. La seconde agit sur la régulation du cytosquelette

La voie WNT/Ca²⁺ implique plusieurs protéines sensibles au taux de calcium intracellulaire. Le calcium est libéré à partir du réticulum endoplasmique grâce à l'inositol triphosphate. Finalement, le facteur de transcription NFAT est activé, entraînant l'expression de gènes. En parallèle, la protéine kinase C peut aussi être activée, agissant au niveau du cytosquelette.



morphogenesis) (Habas, Kato et al. 2001). L'interaction entre DVL et DAAM1 modifie la structure de cette dernière et l'active (Higgs 2005; Liu, Sato et al. 2008). Finalement, ce complexe lie la GTPase RHO-A. C'est une protéine régulatrice du cytosquelette et de l'expression de gènes qui existe soit sous forme active lorsqu'elle est liée au GTP, soit sous forme inactive liée au GDP (Hall 1998). RHO-A est activé par l'interaction avec DVL et DAAM1 *via* le recrutement d'un facteur d'échange de guanine, le WGEF (*Weak similarity guanine nucleotide exchange factor*). Alors sous la forme RHO-GTP, elle active la kinase ROCK1 (*Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase*). Cette sérine-thréonine kinase phosphoryle et active la kinase LIM, laquelle phosphoryle et inactive la cofiline qui possède une activité de dépolymérisation de l'actine (Maekawa, Ishizaki et al. 1999). Ainsi, la voie WNT/DVL/RHO-A agit sur le contrôle du cytosquelette, et par conséquent sur la motilité cellulaire.

DVL peut aussi activer la cascade de la JNK (*c-Jun NH2-terminal kinase*), aussi appelée SAPK1 (*Stress-activated protein kinase*). JNK appartient à la famille des MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*), des sérine-thréonines kinases impliquées dans des cascades de phosphorylation. DVL active la JNK soit directement (Li, Yuan et al. 1999), soit par l'intermédiaire de la GTPase RAC (Habas, Dawid et al. 2003). Activée, la JNK phosphoryle et active les facteurs de transcription c-Jun et ATF2 (Minden and Karin 1997). La voie DVL/JNK a été récemment impliquée dans la régulation de la stabilité des microtubules, agissant ainsi sur le cytosquelette (Ciani and Salinas 2007). La JNK peut aussi être activée par l'interaction WNT5A/ROR2, de manière dépendante de DVL et RAC (Nishita, Itsukushima et al. 2010).

En accord avec les modifications observées au niveau du cytosquelette, l'activation de la voie WNT/PCP a été associée avec une augmentation de l'invasion tumorale et du caractère

métastatique des cancers. Par exemple, WNT5A, qui active RAC et JNK, a été montré activant les métastases dans les mélanomes, les cancers gastriques et les cancers du sein (Weeraratna, Jiang et al. 2002; Kurayoshi, Oue et al. 2006; Pukrop, Klemm et al. 2006). WNT/PCP pourrait également jouer un rôle dans l'angiogénèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. En effet, l'inhibition de la voie WNT/PCP affecte la croissance, la polarité et la migration des cellules endothéliales (Cirone, Lin et al. 2008). La migration de ces cellules est une étape essentielle dans la formation des nouveaux vaisseaux. La voie WNT/PCP apparaît par conséquent importante dans deux mécanismes impliqués dans la progression et l'agressivité tumorale. Pourtant, quelques exemples suggèrent également un rôle dans la suppression tumorale. WNT5A est perdu dans plusieurs modèles tumoraux (Liang, Chen et al. 2003; Kremenevskaja, von Wasielewski et al. 2005). De plus, l'inhibition de WNT5A par ARNi induit la transformation de cellules épithéliales mammaires (Olson and Gibo 1998). L'activité suppressive de tumeur de WNT5A passerait par l'inactivation de la β -caténine, puisque les expressions des deux protéines sont inversement corrélées. Globalement, la voie WNT/PCP aurait plusieurs rôles dans le développement tumoral selon l'étape considérée : dans les étapes précoces, elle agit comme suppressive de tumeur en inhibant la β -caténine, tandis que dans les étapes tardives elle promeut la progression tumorale en stimulant l'invasion, les métastases et l'angiogénèse.

2.2.5. LA VOIE DU CALCIUM

La stimulation par des ligands WNT peut modifier le taux de calcium intracellulaire. Cette voie fut principalement décrite *via* XWNT5A (issu du xénope) et le récepteur RFZ2 (issu du rat). L'expression des deux protéines dans des embryons de zebrafish augmente la relargage de calcium *via* les phosphatidylinositols (Slusarski, Corces et al. 1997). L'expression de DVL

et l'activité des petites protéines G semblent être nécessaires pour ce relargage. La voie des phosphatidylinositols est contrôlée par la phospholipase C (PLC) qui pourrait jouer un rôle dans la voie WNT/Ca⁺⁺. En effet, La PLC dégrade le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate en diacylglycérol (DAG) et l'inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3). L'InsP3 se lie à un récepteur sur le réticulum endoplasmique et provoque le relargage de calcium dans le cytoplasme. Le DAG active la PKC de manière dépendante du taux de calcium intracellulaire (Aris, Basta et al. 1993; Ekinci and Shea 1999). L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium active également la calmoduline et la CAMKII (*Ca⁺⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II*) (Kühl, Sheldahl et al. 2000; Kühl, Sheldahl et al. 2000; Sheldahl, Slusarski et al. 2003). En aval, la voie WNT/Ca⁺⁺ active le facteur de transcription NF-AT (*Nuclear factor of activated t-cells*) (Saneyoshi, Kume et al. 2002). Cette activation consiste en la déphosphorylation par la calcineurine, l'entrée de la protéine dans le noyau et l'augmentation de son affinité pour l'ADN (Rao, Luo et al. 1997). Dans les cancers chez l'Homme, l'activation de la voie WNT/Ca⁺⁺ a été associée à la survie (Gregory, Phang et al. 2010), au remodelage du cytosquelette et la motilité (Wang, Symes et al. 2010). Elle peut être inhibée par les voies de la β -caténine et PCP puis que les kinases GSK3 β et JNK peuvent phosphoryler NF-AT, inhibant son activation (Rao, Luo et al. 1997).

2.2.6. LES AUTRES VOIES DE SIGNALISATION INDEPENDANTES DE LA B-CATENINE.

Chez l'Homme, au moins huit membres de la famille WNT ont été associés à des voies de signalisation indépendantes de la β -caténine. Loin de connaître tous les éléments pouvant caractériser ces voies, il conviendrait davantage de considérer les protéines réellement activées par les ligands WNT.

WNT4 et WNT5A ont été associées avec les kinases p38 et ERK1/2 (Almeida, Han et al. 2005; Chang, Sonoyama et al. 2007). Ces protéines font partie d'une des deux voies des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) et régulent divers processus cellulaires : prolifération, migration, différenciation, survie. Dans le cas de WNT4 et WNT5A, cette voie est nécessaire pour la différenciation ostéoblastique des cellules souches mésenchymateuses et pour la survie cellulaire, respectivement.

WNT5A, comme WNT11, a aussi été associé aux protéines kinases C (PKC). Les PKC sont des kinases sensibles aux augmentations du taux de calcium intracellulaire. Les PKC régulent le facteur de transcription NFAT. Dans le mélanome, WNT5A active PKC *via* le récepteur ROR2 et augmente les propriétés invasives et métastatiques des cellules tumorales (Dissanayake, Wade et al. 2007; O'Connell, Fiori et al. 2009).

WNT5B et WNT7A activent la voie ERK5/PPAR γ . PPAR γ (*Proliferation-activated receptor γ*) est un récepteur nucléaire activant la transcription. Le couple WNT7A/Fz9 active PPAR γ de manière dépendante d'ERK5 dans les cellules tumorales bronchiques. Cette voie participe, avec la voie JNK, aux propriétés suppressives de tumeurs de WNT7A (Winn, Van Scoyk et al. 2006).

WNT3A a été décrit comme régulant la voie PI3K/AKT (**Figure 17**). Plus précisément, WNT3A peut activer à la fois la β -caténine et AKT *via* des récepteurs distincts (Sonderegger, Haslinger et al. 2010). Le rôle principal de cette autre cascade de phosphorylations est d'inhiber la mort cellulaire par apoptose. (Nicholson and Anderson 2002). La voie AKT est aussi responsable de l'activation de la protéine mTOR et des cascades qu'elle contrôle. La protéine mTOR agit sur le contrôle de la traduction protéique.

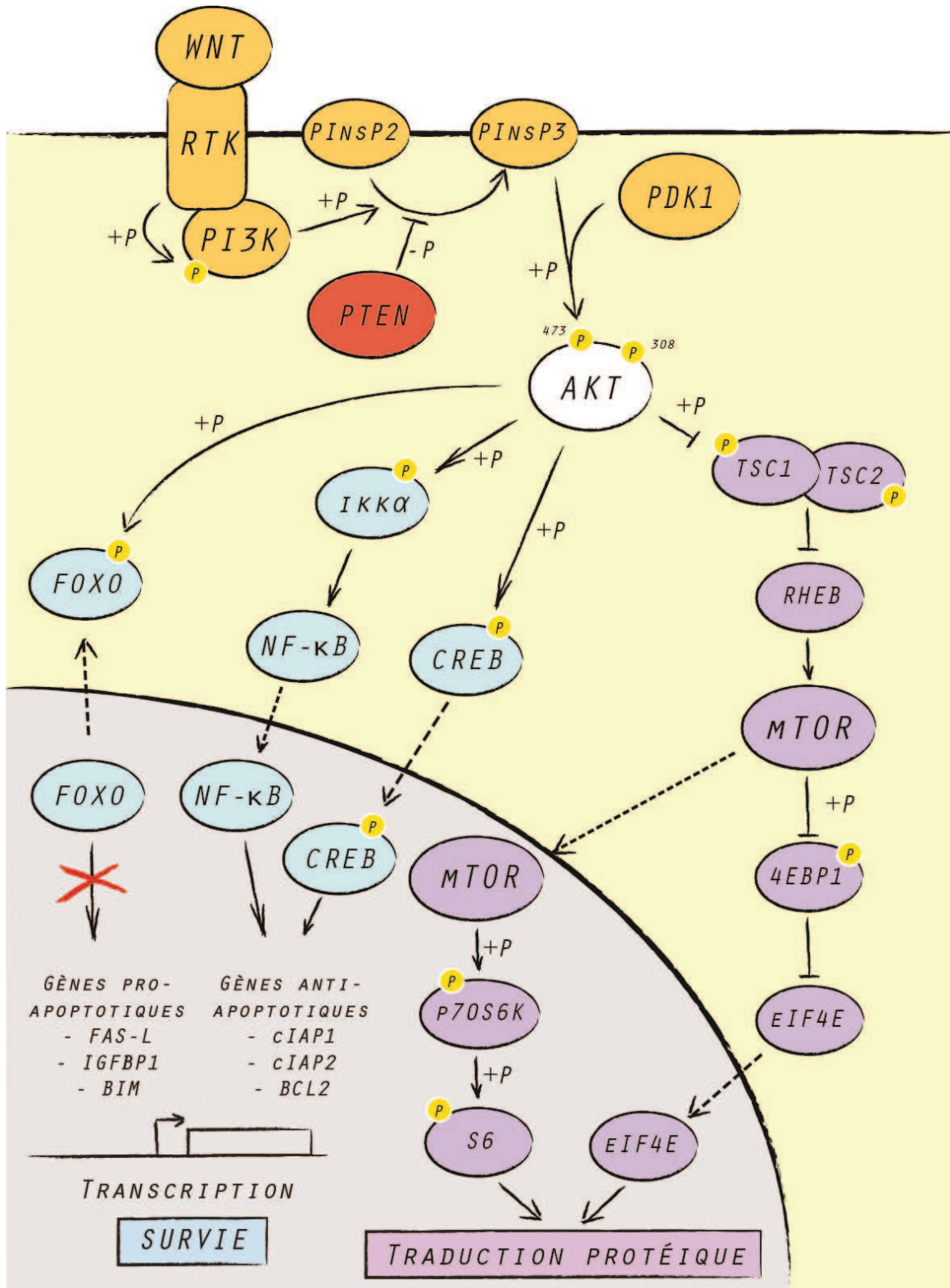
Figure 17. La voie PI3K/AKT.

Suite à l'activation du récepteur tyrosine kinase (RTK) après liaison du ligand, la PI3K est activée par phosphorylation. PI3K catalyse la transformation de PInsP2 en PInsP3. Le PInsP3 sera ensuite utilisé par la PDK1 pour phosphoryler et donc activer AKT sur la thréonine 308. La phosphatase PTEN est un inhibiteur de la voie AKT puisqu'elle catalyse le retour du PInsP3 sous la forme PTInsP2.

La première fonction d'AKT est l'inhibition de l'apoptose (bleu). Parmi les cibles d'AKT, on trouve la famille des facteurs de transcription Forkhead FOXO1A, FOXO3A et FOXO4. En l'absence de phosphorylation, les protéines Forkhead activent la transcription de gènes pro-apoptotiques tels que FAS-Ligand, IGFBP1 et BIM. Une fois phosphorylés, les FOXO sont exclus du noyau et séquestrés dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3, limitant ainsi l'expression des gènes précédents (Biggs, Meisenhelder et al. 1999; Brunet, Bonni et al. 1999). AKT a également été décrit comme interagissant avec la voie IKK/I κ B/NF- κ B (Romashkova and Makarov 1999). En phosphorylant IKK α , AKT provoque la dégradation d'I κ B, inhibiteur de NF- κ B. Le facteur de transcription NF- κ B est ainsi activé, et on rencontre parmi ses cibles transcriptionnelles des gènes de survie comme c-IAP-1 et c-IAP-2. Autre facteur de transcription phosphorylé par AKT. La phosphorylation de CREB corrèle avec l'expression du gène anti-apoptotique BCL-2 (Pugazhenti, Nesterova et al. 2000). Mais la protéine AKT est aussi capable de cibler directement des protéines clé dans la cascade apoptotique. AKT phosphoryle la protéine BAD sur le résidu sérine 136, induisant sa séquestration dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 (Datta, Dudek et al. 1997; Peso, Gonzalez-Garcia et al. 1997). AKT phosphoryle et inactive également la kinase ASK1, bloquant ainsi la voie de signalisation des SAPK impliquée dans l'induction de l'apoptose (Kim, Khursigara et al. 2001).

La seconde fonction d'AKT est l'activation de la voie mTOR (violet). AKT inhibe l'activité du complexe TSC1/2. En conséquence, RHEB active la kinase mTOR. mTOR contrôle deux cascades responsables de l'augmentation de la traduction protéique. D'une part, le facteur d'élongation eIF4E s'accumule dans le noyau sous l'effet de 4EBP1. D'autre part, mTOR permet l'accumulation de la protéine du ribosome S6.

Figure 17. La voie PI3K/AKT (suite).



Cette liste des différentes signalisations WNT établit la complexité et l'importance des WNT dans la régulation des processus cellulaires. Ces voies peuvent également interférer. Par exemple, la voie WNT5A/JNK inhibe l'accumulation nucléaire de la β -caténine. Alternativement activateur ou inhibiteur de la prolifération cellulaire, cela suppose que l'interaction de WNT5A avec ses différents récepteurs est précisément régulée en fonction du type cellulaire. De même, l'activation non contrôlée de l'une ou l'autre voie peut avoir des conséquences dramatiquement différentes sur le développement tumoral.

2.3. WNT16

2.3.1. LE GENE *WNT16*

Le gène *WNT16* est localisé dans la région 7q31. Il compte 5 exons et deux promoteurs (**Figure 18**). Le promoteur P1 contrôle l'expression du variant WNT16B (aussi identifié comme variant 1, NCBI #NM_057168), composé des exons 1b, 2, 3 et 4. Le promoteur P2 contrôle l'expression du variant WNT16A (ou variant 2, NCBI #NM_016087) composé des exons 1a, 2, 3 et 4. Chaque variant possédant son propre promoteur et sa propre région 5' non traduite (5' UTR), cela suggère que leurs expressions sont régulées indépendamment (**Tableau 3**). En effet, la recherche d'éléments de réponse pour des facteurs de transcription *via* l'outil TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) et la base de données TRANSFAC réalisée par Fear *et al.* et complétée au laboratoire montre que l'expression de chaque variant peut être contrôlée par des facteurs de transcription différents (Computational Biology Research Center ; Heinemeyer, Wingender *et al.* 1998; Fear, Kelsell *et al.* 2000).

Tableau 3. Synthèse bibliographique des variants de WNT16 étudiés dans les différents travaux.

Référence	Journal	Isoformes étudiés
(McWhirter, Neuteboom et al. 1999)	PNAS	Isoformes non différenciés
(Fear, Kelsell et al. 2000)	Biochem. Biophys. Res. Commun.	WNT16A et WNT16B
(Müschen, Lee et al. 2002)	PNAS	?
(Lu, Zhao et al. 2004)	PNAS	Isoformes non différenciés
(Ross, Zhou et al. 2003)	Blood	WNT16A et WNT16B
(Katoh and Katoh 2005)	Onc. Rep.	WNT16B
(Mazieres, You et al. 2005)	Oncogene	WNT16A et WNT16B
(Benhaj, Akcali et al. 2006)	Onc. Rep.	Isoformes non différenciés
(Casagrande, te Kronnie et al. 2006)	Haematologica	WNT16B
(Teh, Blaydon et al. 2007)	J. Cell Sc.	WNT16A et WNT16B
(Reischl, Schwenke et al. 2007)	J. Invest Dermatol.	Isoformes non différenciés
(Román-Gómez, Cordeu et al. 2007)	Blood	Isoformes non différenciés
(Dell'accio, De Bari et al. 2008)	Arthritis Rheum.	Isoformes non différenciés
(Shen, Zhou et al. 2009)	J. Cell Biochem.	?
(Nygren, Døsen-Dahl et al. 2009)	Exp. Hematology	WNT16B
(Sercan, Pehlivan et al. 2010)	Leuk. Res.	Isoformes non différenciés

2.3.2. LES PROTEINES WNT16

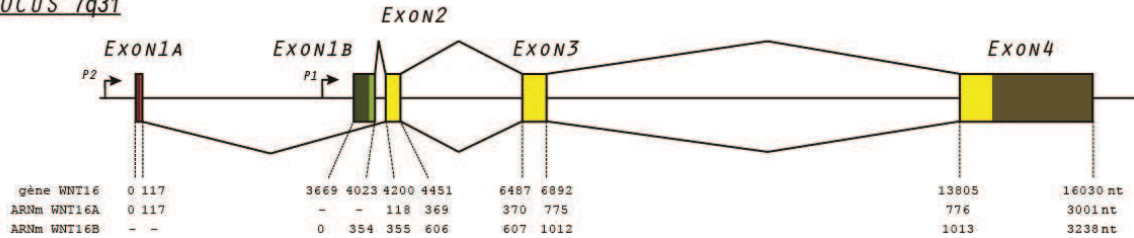
Les séquences peptidiques de WNT16A (NCBI #NP_057171) et WNT16B (NCBI #NP_476509) sont identiques à 90%. Elles possèdent le squelette de vingt-trois cystéines caractéristique des protéines WNT. Leurs poids moléculaires théoriques sont très proches, respectivement 41 et 42 kDa.

Au moment de rédiger cette thèse, seul le variant WNT16B avait pu être détecté au niveau protéique. L'expression de la protéine WNT16A reste hypothétique comme le suggèrent des expériences de traduction *in vitro* (Teh, Blaydon et al. 2007). Si on analyse les séquences

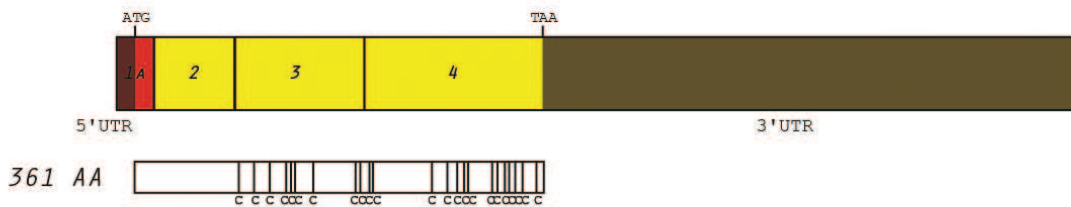
Figure 18. Le gène WNT16.

Le gène codant pour la protéine WNT16 possède deux promoteurs, P1 ou P2. Chacun code pour un ARN messager : WNT16A (exons 1a, 2, 3 et 4) et WNT16B (exons 1b, 2, 3 et 4). Chaque ARN possède également sa propre région 5' non traduite. La traduction des ARN produit deux protéines, qui ne diffèrent que par leur extrémité 5'. Seule WNT16B posséderait un peptide signal nécessaire à la sécrétion.

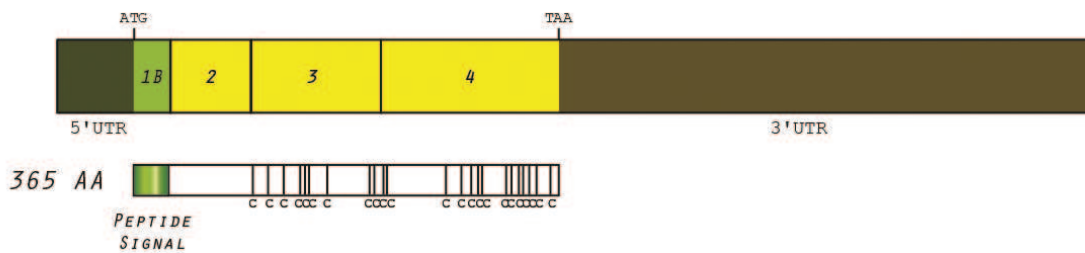
LOCUS 7q31



WNT16A (1175 NT)



WNT16B (1204 NT)



protéiques primaires théoriques, on observe que la différence essentielle entre les deux variants réside dans la présence d'un peptide signal uniquement chez WNT16B. Ce peptide signal est retrouvé à l'extrémité amino-terminale de la majorité des protéines qui sont sécrétées par les cellules, dont les protéines de la famille WNT. L'absence de cette séquence chez WNT16A peut limiter sa stabilité expliquant que la protéine n'ait jamais été détectée. Néanmoins cela n'explique pas l'absence de traduction.

2.3.3. ORTHOLOGUES ET PARALOGUES

Le gène *WNT16* a été étudié notamment chez la souris (*Mus musculus*), le rat (*Rattus norvegicus*), le poulet (*Gallus gallus*) et le poisson zèbre (*Danio rerio*). La présence d'un promoteur alternatif n'est retrouvée que chez l'Homme. Dans les autres espèces, la protéine WNT16 possède un peptide signal identique à celui du variant WNT16B humain. L'absence d'un orthologue de WNT16A renforce l'idée que ce variant a un rôle secondaire.

Au sein de la famille des WNT chez l'Homme, la séquence de WNT16B est fortement similaire aux séquences de WNT7A et WNT7B (McWhirter, Neuteboom et al. 1999; Fear, Kelsell et al. 2000; Katoh and Katoh 2005; Fokina and Frolova 2006).

2.3.4. EXPRESSION *IN VIVO*

L'ARN messager de WNT16B est exprimé dans la majorité des tissus chez l'Homme (McWhirter, Neuteboom et al. 1999; Fear, Kelsell et al. 2000). WNT16A n'a été détecté que dans le pancréas. Au niveau protéique, Teh *et al.* ont analysé l'expression de WNT16B dans la peau par immunohistochimie. Cette unique étude sur l'expression de la protéine *in vivo* a montré que WNT16B est exprimé dans les tissus en prolifération : la couche suprabasale, la papille dermique et le bulbe du poil. Cette même étude décrivait une forte expression de

WNT16B en périphérie des tumeurs des cellules basales, au niveau de la zone d'expansion de la tumeur (voir paragraphe sur WNT16 et cancer).

2.3.5. WNT16 DANS LE TISSU HEMATOPOÏETIQUE

Le gène codant pour la protéine WNT16 a été mis en évidence dans des cellules de leucémie lymphoblastoïde aigüe (ALL, *acute lymphoblastoid leukemia*) à cellules pré-B caractérisées par une translocation t(1:19) (McWhirter, Neuteboom et al. 1999). La translocation crée la protéine de fusion E2A-PBX1. PBX1 est un facteur de transcription dont l'une des cibles est le gène *WNT16*. E2A est également un facteur de transcription ayant une forte affinité pour l'ADN. La fusion du domaine transactivateur fort d'E2A avec le domaine de liaison à l'ADN de PBX1 accroît l'expression des gènes cibles de PBX1, dont *WNT16*.

Le rôle de WNT16 dans ces lignées reste à définir. En effet, dans les cellules hématopoïétiques humaines, WNT16 n'est exprimé que dans les lymphocytes T (Sercan, Pehlivan et al. 2010) et aucune donnée n'est disponible concernant l'effet de la surexpression de WNT16 dans les lymphocytes B. A l'inverse, trois groupes ont montré que la suppression directe ou indirecte, grâce à un ARNi spécifique de E2A-PBX1, de l'expression de WNT16B augmente le taux d'apoptose dans les lignées cellulaires t(1:19) pre-B ALL testées (Mazieres, You et al. 2005; Casagrande, te Kronnie et al. 2006). Finalement, il a aussi été montré que WNT16B régule l'accumulation de β -caténine au niveau des jonctions adhérentes et de la N-cadhérine, jouant un rôle non pas dans la survie mais dans l'interaction avec le stroma (Nygren, Døsen-Dahl et al. 2009).

WNT16 pourrait jouer un rôle dans la mise en place des lignées hématopoïétiques au cours du développement embryonnaire chez la souris. En effet, l'ARN de WNT16 est spécifiquement enrichi au stade où les cellules souches hématopoïétiques apparaissent

(Corrigan, Dobbin et al. 2009). Chez l'Homme, WNT16 est retrouvé dans les cellules progénitrices B, à l'origine des lymphocytes B (Müschen, Lee et al. 2002; Døsen, Tenstad et al. 2006). Il semble que ces cellules expriment également fortement le facteur de transcription PBX1, pouvant expliquer la surexpression de WNT16. WNT16 semble donc jouer un rôle prépondérant dans la lymphomagenèse B, de même que dans la leukémogenèse B, puisque en plus des données sur les lignées t(1:19) pré-B ALL, deux études ont décrit une forte expression de WNT16B dans les leucémies lymphoblastiques chroniques (CLL *chronic lymphoblastoid leukemia*) dérivées des cellules B (Memarian, Hojjat-Farsangi et al. 2009; Wu, Zierold et al. 2009).

2.3.6. AUTRES ROLES DANS LE DEVELOPPEMENT ET LES CANCERS

WNT16 est également impliqué dans la formation des articulations des membres dans les embryons de souris (Guo, Day et al. 2004; Witte, Dokas et al. 2009) ou de la face chez le poulet (Geetha-Loganathan, Nimmagadda et al. 2009). Chez l'Homme adulte, l'expression de WNT16 et de la β -caténine sont fortement augmentées après une lésion dans un cartilage, sans savoir si cette voie intervient dans le processus de réparation (Dell'accio, De Bari et al. 2008). WNT16 est associé à des défauts cardiaques congénitaux dans un modèle de développement fœtal murin (Nath, Krauthammer et al. 2009).

Hormis les leucémies, WNT16 est exprimé dans les tumeurs basocellulaires de la peau (Teh, Blaydon et al. 2007). Le marquage immunohistochimique montre une accumulation de WNT16 à la périphérie de la tumeur, ce que les auteurs considèrent être la zone d'expansion tumorale. En parallèle, la surexpression de WNT16B dans des kératinocytes accroît la prolifération cellulaire. A l'inverse, l'expression de WNT16 diminue dans plusieurs lignées

cellulaires de cancers du sein, comparées à des cellules épithéliales mammaires HMEC (Benhaj, Akcali et al. 2006).

2.3.7. VOIES DE SIGNALISATION ACTIVEES PAR WNT16

Selon le type cellulaire, WNT16 active au moins deux voies de signalisation différentes. Dans les lignées cellulaires t(1:19) pré-B ALL, la forte expression de WNT16B corrèle avec une accumulation de plusieurs acteurs de la voie de la β -caténine : Dishevelled 2, β -caténine et Survivine (Mazieres, You et al. 2005). La perte d'expression de la Survivine, facteur anti-apoptotique, lorsque WNT16B est inhibée a été proposée comme explication pour l'augmentation du taux d'apoptose. Il est à noter que les auteurs n'avaient pas regardé spécifiquement l'accumulation nucléaire de la β -caténine, ni son activité transcriptionnelle. Plus tard, une autre étude a décrit que l'accumulation de la β -caténine a lieu au niveau membranaire et colocalise avec la N-cadhérine dans les jonctions adhérentes (Nygren, Døsen-Dahl et al. 2009). Dans les kératinocytes, la surexpression de WNT16B n'affecte pas la β -caténine mais la voie JNK (Teh, Blaydon et al. 2007). Aucune information sur un récepteur de WNT16 n'est disponible.

Globalement, la protéine WNT16 possède des fonctions variables selon le type cellulaire et est capable d'activer différentes voies de signalisation.

3. OBJECTIF ET STRATEGIE DE L'ETUDE

Etant donné l'importance des cellules sénescents dans la détection des lésions précancéreuses et leur potentiel rôle sur la progression tumorale, notre objectif était d'identifier de nouveaux marqueurs solubles de la sénescence cellulaire, dont les caractéristiques pourraient expliquer les aspects protumoraux des cellules sénescents.

Dans ce but, une analyse par puces à ADN de l'expression des gènes dans des fibroblastes diploïdes en divisions et en sénescence réplivative a été réalisée. Le(s) gène(s) sélectionné(s) ont été étudié(s) dans plusieurs modèles de sénescence afin de confirmer son(leur) rôle de marqueur et d'analyser leur fonction dans ce processus. Dans un deuxième temps, Ce(s) gène(s) ont été analysé(s) dans les tumeurs de CPNPC afin de mettre en évidence son(leur) rôle dans la progression tumorale.

RESULTATS

1. MISE EN EVIDENCE DES FONCTIONS DE WNT16B DANS LA REGULATION DE L'ENTREE EN SENESCENCE

1.1. WNT16B EST UN NOUVEAU MARQUEUR DE LA SENESCENCE CELLULAIRE

Afin d'identifier de nouveaux marqueurs de la sénescence cellulaires, une analyse comparative des transcriptomes de fibroblastes diploïdes humains MRC5 en division (PDL26) et entrés en sénescence réplivative (PDL64) a été réalisée par puces à ADN. Parmi les gènes surexprimés dans les fibroblastes sénescents, plusieurs éléments des voies WNT ont été identifiés. De plus, le gène le plus fortement surexprimé dans nos conditions est le gène *WNT16*.

Afin de confirmer le résultat des puces à ADN, l'expérience a été reproduite et l'expression de WNT16A et WNT16B, les deux isoformes de WNT16, a été analysée à la fois au niveau transcriptionnel par PCR semi-quantitative et au niveau protéique par western blot. Nous avons ainsi observé que WNT16B, et non WNT16A, est surexprimé dans les cellules en sénescence réplivative. Cette expression est dépendante des voies de signalisation qui contrôlent l'entrée en sénescence, puisque l'expression de la télomérase d'une part, et l'utilisation d'un ARNi dirigé contre p53 d'autre part préviennent l'entrée en sénescence réplivative et la surexpression de WNT16B.

Plusieurs modèles de sénescence cellulaire prématurée ont été mis en place. Dans un premier modèle, des fibroblastes MRC5 ont été irradiés avec des rayons X à une dose de 20Gy. Pour le second modèle, les fibroblastes ont été exposés à 200nM de peroxyde d'hydrogène pendant deux heures afin d'induire un stress oxydatif. Enfin, le dernier modèle utilisé est une sénescence induite par un oncogène. Les MRC5 ont été infectées afin d'exprimer l'oncogène muté HRAS^{G12V}. Chacun de ces modèles a été validé par l'analyse de la SA-β-Gal, et l'activation de la voie p53/p21 *via* la surexpression du CDKI. Nous avons ainsi observé que WNT16B, et non WNT16A, est surexprimé dans tous les modèles de sénescence cellulaire testés. Enfin, l'expression de WNT16 a été investiguée en immunohistochimie dans des coupes d'adénomes pulmonaires de souris. Les adénomes sont des lésions préneoplasiques enrichies en cellules sénescents (Collado, Gil et al. 2005). Les marquages ont montré une coexpression de WNT16 avec les marqueurs de sénescence p16/INK4A et p19/ARF. A la lumière de ces résultats, WNT16B apparaît comme un nouveau marqueur des cellules sénescents *in vitro* et *in vivo*.

1.2. WNT16B EST NECESSAIRE POUR L'ENTREE EN SENESCENCE REPLICATIVE

En utilisant un ARNi dirigé contre WNT16B, nous avons inhibé l'expression de la protéine de manière stable quelques PDL avant l'entrée en sénescence répliative. Un ARNi dirigé contre p53 a été utilisé comme contrôle positif. Les fibroblastes MRC5-WNT16kd et MRC6-p53kd continuent de se multiplier au-delà du PDL64. De plus, l'expression de la SA-β-Gal augmente peu par rapport aux cellules témoins. Ces observations montrent que l'inhibition de WNT16B prévient l'entrée en sénescence, autrement dit WNT16B est nécessaire pour l'entrée en sénescence répliative.

Au niveau moléculaire, nous avons analysé l'expression transcriptionnelle de gènes cibles du facteur de transcription p53. L'expression des gènes p21, WIG1, PERP et PAI-1 est réduite dans les cellules MRC5-WNT16Bkd par rapport aux fibroblastes sénescents, montrant un défaut d'activation de p53. Le défaut d'accumulation de la protéine p21 a été confirmé par western blot. Ainsi, l'inhibition de WNT16B dans les fibroblastes MRC5 prévient l'activation du facteur de transcription p53 et l'entrée en sénescence répllicative.

Afin de déterminer si l'expression de WNT16B est suffisante pour induire un phénotype de sénescence prématurée, nous avons induit son expression stable dans des fibroblastes en division (PDL29). La prolifération des cellules MRC5-WNT16B est ralentie mais n'est pas arrêtée. L'expression de p53 et p21 n'est pas augmentée, alors que nous avons observé une légère accumulation d'un autre inhibiteur du cycle cellulaire, p16/INK4A. La surexpression de WNT16B est donc insuffisante pour induire l'entrée en sénescence prématurée.

1.3. WNT16B REGULE L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DE P53

A la suite des résultats avec les MRC5-WNT16Bkd, d'autres investigations ont été réalisées sur la relation entre WNT16B et p53. Nous avons utilisé des fibroblastes exprimant la télomérase MRC5-hTERT. L'exposition de ces cellules à 200 μ M d'H₂O₂ ou à une irradiation aux rayons X (20Gy) induit l'activation de la voie p53/p21 et l'expression de la SA- β -Gal. En inhibant transitoirement l'expression de WNT16B, nous avons observé que l'induction de p21 est réduite dans les cellules siWNT16B après exposition à l'H₂O₂ ou aux rayons X par rapport aux cellules contrôles. Ce résultat est similaire, quoique moins intense, à ce qui est observé lorsqu'on inhibe p53. Au niveau protéique, l'irradiation X induit la phosphorylation de p53 sur la sérine 15. Cette phosphorylation est une marque d'activation en réponse à un stress. Dans les cellules siP53, on observe un défaut d'accumulation de phospho-

p53(ser15) et de p21. Après inhibition de WNT16B, phospho-p53(ser15) s'accumule de la même manière dans les cellules, alors que la quantité de p21 est réduite. Globalement, les analyses réalisées avec les cellules MRC5-hTERT montrent que l'inhibition de WNT16B empêche l'activation transcriptionnelle de p21 bien que p53 soit correctement activé en réponse à un stress.

1.4. WNT16B ACTIVE LA VOIE PI3K/AKT

Les WNT sont des protéines de signalisation extracellulaires. Une fois sécrétées, les protéines WNT se lient à un récepteur membranaire afin d'activer des voies de signalisation intracellulaires. Nous avons entrepris d'identifier la voie activée par WNT16B au cours de la sénescence cellulaire. Dans les MRC5 sénescents, on note l'accumulation de la protéine phospho-AKT(ser473). La phosphorylation est une marque d'activation d'AKT. Dans les cellules MRC5-WNT16kd, AKT est hypophosphorylée, suggérant que son activation est dépendante de WNT16B. Dans les fibroblastes jeunes, la surexpression de WNT16B est suffisante pour induire l'activation d'AKT. En utilisant un inhibiteur spécifique de la PI3K, le LY294002, on abolit l'accumulation de la forme phosphorylée d'AKT dans les cellules surexprimant WNT16B. L'expression de WNT16B au cours de la sénescence répliquative active donc la kinase AKT d'une manière dépendante de la PI3K.

CONCLUSION

Nous avons identifié la protéine WNT16B comme un nouveau marqueur et acteur de la sénescence cellulaire *in vitro* et *in vivo*. WNT16B peut par conséquent être utilisé conjointement avec l'expression de la SA- β -Gal ou les inhibiteurs du cycle cellulaire p21 et p16 pour valider le phénotype sénescents. D'autre part, son implication dans le mécanisme d'entrée en sénescence en fait un nouveau membre du SMS ou SASP, les protéines sécrétées

qui participent à l'arrêt du cycle cellulaire. Nos résultats suggèrent que tout comme PAI-1 (Kortlever, Higgins et al. 2006), WNT16B est sécrétée par les cellules sénescents et agit en autocrine pour activer des voies de signalisation intracellulaires participant à la mise en place ou au maintien du phénotype. Deux protéines ont ici été identifiées comme étant régulées par WNT16B. Premièrement, la kinase impliquée dans la résistance à l'apoptose AKT. Deuxièmement, le facteur de transcription p53. Ces deux associations supposent que WNT16B ait deux fonctions dans les cellules sénescents : activer une voie de survie cellulaire et induire et/ou maintenir l'arrêt du cycle cellulaire.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication intitulée *WNT16B Is a New Marker of Cellular Senescence That Regulates p53 Activity and the Phosphoinositide 3-Kinase/AKT Pathway*, parue en décembre 2009 dans le journal *Cancer Research*.

PUBLICATION N°1

WNT16 IS A NEW MARKER OF CELLULAR SENESCENCE THAT REGULATES p53 ACTIVITY AND THE PHOSPHOINOSITIDE 3-KINASE/AKT PATHWAY.

Romuald Binet, Damien Ythier, Ana I. Robles, Manuel Collado, Delphine Larrieu, Claire Fonti, Elisabeth Brambilla, Christian Brambilla, Manuel Serrano, Curtis C. Harris and Rémy Pedoux.

Cancer Research, December 15, 2009 69; 9183

WNT16B Is a New Marker of Cellular Senescence That Regulates p53 Activity and the Phosphoinositide 3-Kinase/AKT Pathway

Romuald Binet,¹ Damien Ythier,¹ Ana I. Robles,² Manuel Collado,³ Delphine Larrieu,¹ Claire Fonti,¹ Elisabeth Brambilla,¹ Christian Brambilla,¹ Manuel Serrano,³ Curtis C. Harris,² and Rémy Pedoux¹

¹Centre de Recherche Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale/UJF-U823, Institut Albert Bonniot, La Tronche, Grenoble, France; ²Laboratory of Human Carcinogenesis, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland; and ³Spanish National Cancer Research Centre, Madrid, Spain

Abstract

Senescence is a tumor suppression mechanism that is induced by several stimuli, including oncogenic signaling and telomere shortening, and controlled by the p53/p21^{WAF1} signaling pathway. Recently, a critical role for secreted factors has emerged, suggesting that extracellular signals are necessary for the onset and maintenance of senescence. Conversely, factors secreted by senescent cells may promote tumor growth. By using expression profiling techniques, we searched for secreted factors that were overexpressed in fibroblasts undergoing replicative senescence. We identified WNT16B, a member of the WNT family of secreted proteins. We found that WNT16B is overexpressed in cells undergoing stress-induced premature senescence and oncogene-induced senescence in both MRC5 cell line and the *in vivo* murine model of K-Ras^{V12}-induced senescence. By small interfering RNA experiments, we observed that both p53 and WNT16B are necessary for the onset of replicative senescence. WNT16B expression is required for the full transcriptional activation of p21^{WAF1}. Moreover, WNT16B regulates activation of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT pathway. Overall, we identified WNT16B as a new marker of senescence that regulates p53 activity and the PI3K/AKT pathway and is necessary for the onset of replicative senescence. [Cancer Res 2009;69(24):9183–91]

Introduction

Replicative senescence is a tumor suppression mechanism characterized by an irreversible growth arrest (1). This phenomenon, first observed after extended culture *in vitro* by Leonard Hayflick and Paul Moorhead in 1961, is due to telomere shortening (2). When telomeres become too short, DNA damage sensor proteins are recruited, inducing the stabilization and activation of the p53 tumor suppressor protein and its effector p21^{WAF1} (CDKN1A), an inhibitor of cell cycle progression (3). Several other stress-inducing factors can initiate a similar process independently of telomere shortening. This process, termed stress-induced premature senescence (SIPS), can be induced by events such as DNA damage (4), oxidative stress (5), epigenetic modifications (6), or cytokine stimulation (7). Moreover, premature senescence can be initiated in response to oncogenic stress. For example, the so-called oncogene-induced senescence (OIS) can occur in response to the activating G12V mutation in Ras proteins (8). Depending on the type of inducer, cellular senescence is initiated through two complementary tumor suppressor pathways, p53 or p16^{INK4A}, both pathways leading to irreversible cell cycle arrest (9).

More recently, it has been established that secreted factors also contribute to the induction and maintenance of senescence. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is required to induce replicative senescence in fibroblasts in an autocrine fashion (10). Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5, IGFBP-7, interleukin (IL)-8, IL-6, and CXC chemokine receptor 2 were also described as having a role in senescence (7, 11–14). IL-8 and IL-6 are part of an inflammatory network induced by B-RAF^{V600E} oncogene activation that stimulates the senescent cells in a cell-autonomous manner for the maintenance of senescence. In the absence of one of these factors, cells bypass senescence. Thus, activation of both intracellular and extracellular signals is necessary for the induction and maintenance of cellular senescence.

Although they are characterized by growth arrest, senescent cells remain metabolically active and acquire specific properties, such as resistance to apoptosis and altered gene expression (15). They express specific markers that allow for their identification both *in vitro* and *in vivo*. The senescence-associated β -galactosidase activity (SA- β -Gal) assay, based on the lysosomal β -galactosidase enzyme that is active at pH 6 in senescent cells, is generally accepted as a marker of senescence (16, 17).

As a tumor suppression mechanism, senescence is associated with the early stage of tumor development. Indeed, it was shown that senescent cells accumulate in premalignant lesions (18). Hence, development of tools to detect the accumulation of senescent cells *in vivo* may allow for the identification of neoplasia at an early stage. The specificity of SA- β -Gal staining for senescent cells is underscored by the requirement of invasive detection techniques. PAI-1, IL-6, and IL-8 are candidate biomarkers of senescence because they are soluble factors overexpressed by senescent cells. However, their expression is not specific to senescence and is related to inflammation or other stimuli.

In the present study, we identified WNT16B as a new secreted factor overexpressed in cells undergoing senescence using two models: fibroblastic cell lines and the *in vivo* OIS model of K-Ras^{V12}-induced premalignant lesions. In fibroblasts, WNT16B inhibition prevented activation of the AKT pathway and abrogated p53 transcriptional activity to delay replicative senescence.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Current address for R. Pedoux: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U917 and EFS Bretagne, IFR140, Faculté de Médecine, Université de Rennes1, 35043 Rennes Cedex, France.

Requests for reprints: Rémy Pedoux, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U917-MICA, Faculté de Médecine, Room 117, Building 2, 2 Avenue du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes, France. Phone: 33-2-23-23-47-02; Fax: 33-2-23-23-49-58; E-mail: remy.pedoux@univ-rennes1.fr.

©2009 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1016

Thus, WNT16B is a newly uncovered factor secreted by senescent cells *in vitro* and *in vivo* that regulates the onset of replicative senescence.

Materials and Methods

Cell culture and retroviral gene transfer. MRC5 fibroblasts and Phoenix-ampho cells (Nolan Lab, Stanford University) were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum at 37°C. For retroviral gene transfer, the packaging cell line Phoenix-ampho was transfected with Lipofectamine reagent in combination with PLUS Reagent (Invitrogen) for 3 h according to the manufacturer's instructions. The medium containing the viral particles was recovered, filtered through 0.45- μ m low-binding protein filters (Pall Corp.), and used to infect MRC5 fibroblasts in the presence of hexadimethrine bromide (Sigma). MRC5-infected cells were selected with G418 (800 μ g/mL; Invitrogen) or puromycin (1 μ g/mL; Sigma) for 5 to 7 d. WNT16B was cloned from Human Placenta Marathon-Ready cDNA (Clontech) into the pBabe.puro vector. For gene-specific knockdown, WNT16B short hairpin RNA (shRNA), p53 shRNA (p53^{sh}), and control shRNA were all cloned into pSuper.Retro.Puro (OligoEngine). The respective sequences have all been previously described (19, 20). The telomerase-immortalized MRC5-hTERT cell line was obtained by infection with pLXSN-hTERT, a vector featuring the human telomerase catalytic subunit, as previously described (21, 22).

Premature senescence and SA- β -Gal assays. To induce premature senescence, MRC5 fibroblasts were either exposed to 200 mmol/L hydrogen peroxide (H₂O₂; Sigma), infected with the retroviral vector pBabe.puro.H-Ras^{V12} (8, 23), or irradiated with X-rays (25 Gy). SA- β -Gal activity was detected in fibroblasts and in K-Ras^{V12}-induced lung adenomas as previously described (16, 17).

Immunohistochemistry. Analysis of the expression of WNT16B in mouse tumor samples was performed by immunohistochemical staining of lungs from activated 7- to 9-mo-old K-Ras^{+G12V_{geo}} mice (18). Lungs were dissected, fixed in 10% buffered formalin (Sigma), and embedded in paraffin. Consecutive 3- μ m-thick sections were stained with H&E and processed for immunohistochemical staining using rat monoclonal antibody against Ki-67 (clone TEC3; DakoCytomation), rabbit polyclonal against p16^{INK4A} (M-156; Santa Cruz Biotechnology), rat monoclonal against p19^{ARF} (5-C3-1; Santa Cruz Biotechnology), and rabbit polyclonal against WNT16B (LS-A9630; MBL International Corp.).

Colony formation assay and cell counting. For colony formation, MRC5 fibroblasts were infected with shRNA or cDNA constructs, exposed to G418 or puromycin for 1 wk, seeded at 5×10^3 cells per well onto six-well plates, and stained with methylene blue 3 to 4 wk after. Cell proliferation after shRNA infection was determined using Alamar Blue (Biosource). After exposure to the dye for 2 h, fluorescence was read at 590 nm and cell numbers were determined using a standard curve.

RNA isolation and reverse transcription-PCR analysis. Cells were lysed with Trizol reagent (Invitrogen) and total RNA was isolated according to the manufacturer's instructions. RNA integrity was assessed by spectrophotometry with A₂₆₀/A₂₈₀ ratios of >1.7. RNA (1–5 μ g) was subjected to reverse transcription using SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen). Obtained cDNA was subjected to either PCR (Taq polymerase from New England Biolabs) or real-time PCR using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) with the Mx3005P Real-Time PCR System (Stratagene). Gene expression was calculated following normalization to 18S levels by the comparative C_T (cycle threshold) method. Primer sequences are provided in Supplementary Materials and Methods.

Immunoblotting. Western blot analysis was performed as previously described (24). The following antibodies were used: anti-WNT16, anti-p53 (DO-1), and anti- α -tubulin from BD Pharmingen; anti-p21^{WAF1} from Calbiochem; anti-Rb, anti-phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (ERK), anti-phosphorylated p53, and anti-phosphorylated AKT from Cell Signaling; anti- β -actin from Sigma; and anti-p16 from Santa Cruz Biotechnology.

Trichloroacetic acid protein precipitation. The same numbers of cells from each condition were cultivated in DMEM serum-free medium for 24 h. Culture medium was filtered through 0.45- μ m low-binding protein

filters. Proteins were precipitated by addition of 1 volume of trichloroacetic acid (TCA; Sigma) to 4 volumes of culture medium. Protein pellets were washed twice with cold acetone and then resuspended in SDS-PAGE loading buffer. Proteins were analyzed by Western blot.

RNA-mediated interference. Stealth RNA-mediated interference (RNAi; Invitrogen) was used for WNT16B (siWNT16B) and p53 downregulation (siP53). The universal RNAi negative control (Invitrogen) was used (siCT). Transfections were carried out using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen).

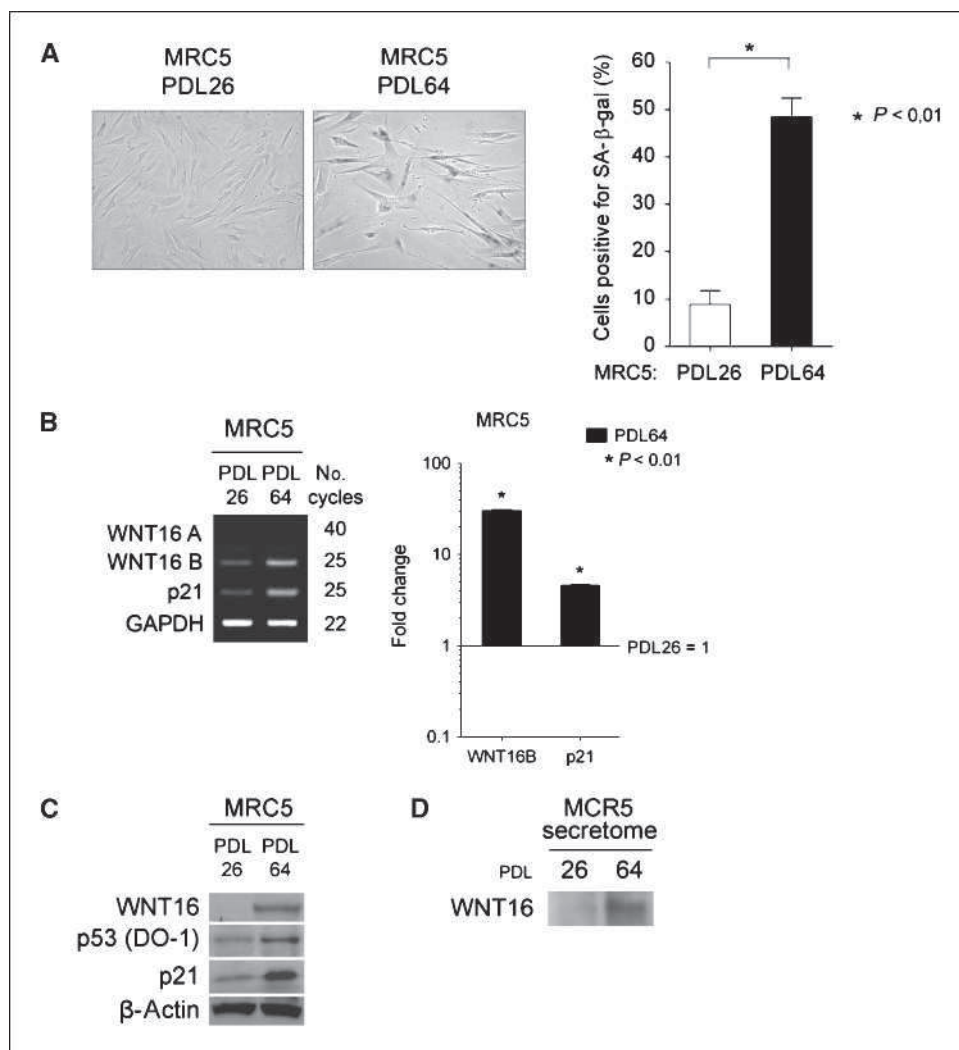
Phosphoinositide 3-kinase inhibition. Subconfluent MRC5 fibroblasts expressing WNT16B were exposed to LY294002 (50 μ mol/L; Cell Signaling) for 12 h in complete culture medium. Cells were harvested and proteins were analyzed by Western blot.

Results

Microarray analysis identifies WNT16 in senescent fibroblasts. Gene expression profiling experiments were conducted to identify genes differentially expressed during replicative senescence. As described in Supplementary Materials and Methods, we compared young MRC5 fibroblasts at population doubling 28 (PDL28) to senescent MRC5 fibroblasts at PDL63. Induction of senescence in aged fibroblasts was confirmed with the SA- β -Gal assay (Fig. 1A). In total, 177 gene probes were upregulated and 338 gene probes were downregulated in senescent versus young MRC5 fibroblasts (Supplementary Table S1). Genes were classified based on mapping to KEGG pathways. Upregulated genes were enriched in three KEGG pathways: the wingless-type mouse mammary tumor virus (MMTV) integration site (WNT) signaling pathway, cytokine-cytokine receptor interaction, and the p53 signaling pathway (Supplementary Table S2). Repressed genes were enriched in three KEGG pathways: cell cycle, cytokine-cytokine receptor interaction, and DNA replication (Supplementary Table S3). Along with p53 transcriptional targets (CDKN1A, PERP, and WIG1), genes encoding secreted factors (WNT16, MMP10, and MMP3) were among the most strongly increased in senescent cells (Table 1). Strikingly, *WNT16* was the gene most induced in senescent fibroblasts. WNT16 belongs to the WNT family of secreted proteins that are mainly involved in development and tumorigenesis (25). However, WNT proteins were recently described to be involved in aging and senescence (6, 26, 27). Thus, we hypothesized that WNT16 overexpression may play a role in replicative senescence.

WNT16B is specifically overexpressed in replicative senescence. The *WNT16* gene spans four exons with alternative exons 1a and 1b (28). Each exon 1 is associated with a unique promoter allowing transcription of two different mRNA isoforms: WNT16A and WNT16B. WNT16B was previously described as ubiquitously expressed in human tissues, whereas WNT16A was only detected in the pancreas (28). The probe used in the microarray was common to both variants. To discriminate between WNT16A and WNT16B, we analyzed mRNA expression by reverse transcription-PCR (RT-PCR) or quantitative RT-PCR (qRT-PCR) using specific primers. No expression of WNT16A was detected in MRC5 fibroblasts, whereas a more than 10-fold increase of WNT16B was observed in replicative senescent cells (Fig. 1B). Specificity of WNT16A primers was verified using a WNT16A cDNA (data not shown). At the protein level, WNT16 protein expression was induced in replicative senescent MRC5 fibroblasts (Fig. 1C). The WNT16A and WNT16B isoforms are both recognized by the WNT16 antibody used and cannot be distinguished by Western blotting because they have very close molecular weights (41 and 42 kDa, respectively). However, because the WNT16B variant is more highly expressed than WNT16A, and it has been suggested that WNT16A mRNA may not be translated into protein *in vivo* (29), we concluded that the

Figure 1. Expression of WNT16 in young (PDL26) and replicative senescent (PDL64) MRC5 human fibroblasts. *A*, MRC5 fibroblasts PDL26 and PDL64 were stained for SA- β -Gal expression and quantified. *Columns*, mean; *bars*, SD. *B*, *left*, WNT16A, WNT16B, and p21 mRNA expression was analyzed by RT-PCR. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) expression was used as control. *Right*, WNT16B and p21 mRNA expression by qRT-PCR. mRNA expression in MRC5 PDL26 fibroblasts was normalized to 1. *Columns*, mean; *bars*, SD. *C*, Western blot analysis of WNT16, p53, and p21 protein expression. β -Actin expression was used as a loading control. *D*, TCA precipitation of proteins from the culture medium of MRC5 fibroblasts and Western blot analysis of WNT16 protein secretion.



isoform detected by Western blot was WNT16B. WNT16B protein was detected in the supernatant of MRC5 fibroblasts, confirming that it is a secreted protein (Fig. 1D). Moreover, the detected amount increased in replicative senescence, consistent with microarray and PCR data. WNT16B increase was also observed in WI-38 and IMR90 fibroblasts undergoing replicative senescence (data not shown). Specific activation by the replicative senescence pathway was assessed in immortalized MRC5 fibroblasts (MRC5-hTERT). In MRC5-hTERT fibroblasts, the percentage of SA- β -Gal-positive cells was low and comparable with young fibroblasts, confirming that telomerase activation prevents the induction of senescence (Supplementary Fig. S4A). In addition, WNT16B expression was lower in MRC5-hTERT cells than in replicative senescent fibroblasts and comparable with the level of expression observed in young MRC5 fibroblasts, which suggests that telomere shortening is necessary for WNT16B accumulation (Supplementary Fig. S4B and C).

WNT16B is overexpressed in SIPS. Whereas replicative senescence is related to telomere shortening and cellular aging, a premature senescence phenotype can be induced in response to stress that is meant to prevent cellular transformation. We investigated the expression of WNT16B in such SIPS. MRC5 fibroblasts were exposed to H₂O₂ or X-rays. Both stresses are known to induce premature senescence through different signaling pathways (4, 5, 8).

Senescence was verified using the SA- β -Gal assay after 96 hours (H₂O₂) or after 48 hours (X-rays; Fig. 2A) and accompanied by increased WNT16B expression (Fig. 2B and C), which was more pronounced following irradiation. As in replicative senescence, no increase of WNT16A was measured (data not shown).

WNT16 is activated in OIS *in vitro* and *in vivo*. As a tumor suppression mechanism, premature senescence is triggered by oncogenic stress. One well-described example of OIS is the activation of the Ras oncogene family (8). We explored WNT16B expression in OIS by infecting MRC5 fibroblasts with a virus coding for the activated H-Ras^{V12} oncogene. As expected, oncogene activation induced premature senescence characterized by SA- β -Gal 6 days after retroviral infection (Fig. 2A), as well as WNT16B mRNA and protein expression (Fig. 2B and C). We further analyzed the activation of WNT16B in OIS *in vivo* using an orthotopic murine lung cancer model driven by K-Ras^{V12} (30). Mice expressing oncogenic K-Ras^{V12} develop multifocal lung tumors. Tumors develop initially as preneoplastic lesions (adenomas), which contain a high percentage of senescent cells as shown by the expression of p16^{INK4a} and SA- β -Gal activity (18). By immunostaining, we observed that WNT16B is overexpressed in K-Ras^{V12}-induced adenomas as compared with the surrounding normal lung tissue (Fig. 2D). These results indicate that WNT16B is a marker of OIS *in vitro* and *in vivo*.

Table 1. Summary of the most highly expressed genes in replicative senescent cells identified by microarray

Gene	Description	Fold change in replicative senescent cells
<i>WNT16</i>	Wingless-type MMTV integration site, member 16	6.3
<i>MMP10</i>	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	6.3
<i>MMP3</i>	Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1)	5.0
<i>CDKN1A</i>	CDK inhibitor 1A (p21, Waf1, Cip1)	3.4
<i>PERP</i>	TP53 apoptosis effector	2.7
<i>WIG1</i>	p53 target zinc finger protein	2.2

NOTE: See Supplementary Tables S1–S3 for complete list. Data deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus as GSE15919.

WNT16B is necessary for the onset of replicative senescence.

To investigate the role of WNT16B in replicative senescence, presenescent MRC5 fibroblasts (PDL58) were infected with retroviral vectors that targeted WNT16B or p53 (as a control for preventing senescence) for suppression through shRNA-mediated RNA interference. Cells infected with a control vector underwent replicative senescence by PDL64 as confirmed by SA- β -Gal positivity (Fig. 3A) and proliferation arrest (Fig. 3B). Cells infected with WNT16B shRNA (WNT16B^{kd}) bypassed senescence, as observed by increased proliferation (Fig. 3B) and low SA- β -Gal (Fig. 3A). WNT16B^{kd} MRC5 fibroblasts proliferated beyond the replicative senescence checkpoint but to a lesser degree than the p53^{kd} MRC5 fibroblasts (Fig. 3A and B). Quantitative PCR analysis showed that genes known to be transactivated by p53 during replicative senescence were expressed at a lower level in WNT16B^{kd} cells than vector-infected cells: p21^{WAF1}, PAI-1, WIG1, and PERP (Fig. 3C, left). Downregulation of WNT16B also prevented the accumulation of p21^{WAF1} protein (Fig. 3C, right). Intriguingly, in WNT16B^{kd} fibroblasts, p53 mRNA expression was decreased, whereas a slight increase was observed at the protein level. These results suggest that p53 activity in replicative senescence is dependent on WNT16B expression. To go further into the relationship between WNT16B and p53, we analyzed WNT16B expression in MRC5 p53^{kd} cells. p21^{WAF1} and WNT16B mRNA and protein expression were significantly lower than in replicative senescent cells (Fig. 3D). Expression at the mRNA level of all known p53 effector genes (e.g., p21^{WAF1}) was lower in p53^{kd} cells compared with young MRC5 fibroblasts, confirming that their expression in replicative senescence is dependent on p53 transcriptional activity (Fig. 3D, left; data not shown). Similar results were obtained in presenescent fibroblasts expressing E6, an oncoprotein from human papilloma virus 16, which induces p53 degradation and inactivation and prevents the onset of senescence (data not shown). Overall, these results highlight that WNT16B is necessary for the onset of replicative senescence by modulating the transcription of p53 target genes, such as p21^{WAF1}.

WNT16B regulates p21^{WAF1} transcription. To further characterize the relationship between WNT16B and p53, we investigated the consequences of WNT16B depletion on p53 activity in two models of SIPS (i.e., X-rays and H₂O₂ exposures). WNT16B expres-

sion was transiently inhibited by transfecting a small interfering RNA (siRNA) into MRC5-hTERT cells (Fig. 4A). Twenty-four hours after transfection, siCT, siWNT16B, and siP53 cells were exposed to X-rays or H₂O₂ and the percentage of senescent cells was determined. Although no difference was observed after X-rays (data not shown), siWNT16B prevented the onset of senescence by H₂O₂ as shown by a lower percentage of SA- β -Gal-positive cells (Fig. 4B). Without treatment, the level of p21^{WAF1} mRNA was reduced in both siWNT16B and siP53 cells, with a stronger decrease in siP53 cells (Fig. 4C). Induction of p21^{WAF1} mediated by exposure to H₂O₂ was abrogated by downregulation of WNT16B (Fig. 4C, left), in accordance with the lower percentage of SA- β -Gal-positive cells. As expected, p21^{WAF1} was not induced by H₂O₂ in siP53 cells. Although siWNT16B did not affect senescence mediated by X-rays, it did partially abrogate transactivation of p21^{WAF1} (Fig. 4C, right). p21^{WAF1} mRNA level in irradiated siWNT16B cells is still higher than in nonirradiated cells and may be sufficient to induce senescence. Expression of p21^{WAF1} protein followed that of mRNA (Fig. 4D). Both p53 and phosphorylated p53 proteins accumulated after X-rays. Intriguingly, the level of p53 was still elevated after radiation in siWNT16B cells, indicating that p53 activation by X-rays maybe independent of WNT16B. Altogether, these results suggest that WNT16B plays a role downstream of p53 to modulate the expression of p21^{WAF1} in cells undergoing senescence.

WNT16B overexpression limits the life span of MRC5 fibroblasts. We asked whether WNT16B expression was able to accelerate the onset of senescence. When overexpressed in young MRC5 fibroblasts, WNT16B resulted in an increased percentage of cells positive for SA- β -Gal, a decrease in cell proliferation, and a decrease in bromodeoxyuridine incorporation (Supplementary Fig. S5). Activation of p53 as a transcription factor was not apparent because no increase of p21^{WAF1} protein level was detected (Supplementary Fig. S5D, left; Fig. 5B). On the contrary, WNT16B overexpression induced moderate p16^{INK4A} mRNA and protein expression (Supplementary Fig. S5D, right; data not shown). These results suggest that the overexpression of WNT16B in young fibroblasts may limit the ability of cells to proliferate through activation of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p16^{INK4A}.

WNT16B regulates the AKT pathway in replicative senescence. To better understand the role of WNT16B in replicative senescence, downstream pathways were explored. WNT proteins mainly signal through the canonical WNT/ β -catenin pathway, which was previously described as being activated by WNT16B in leukemia (20, 29). On WNT stimulation, β -catenin accumulates in the nucleus to transactivate target genes, such as *MYC* and *CyclinD1*. By combining fractionation, immunofluorescence, and quantitative PCR experiments, we did not observe any hallmark of β -catenin activation on WNT16B overexpression. These results are consistent with the observation that β -catenin is not activated during replicative senescence (data not shown). Some WNT proteins may also signal through the AKT pathway (31, 32). AKT was activated in replicative senescence and this activation was dependent on both WNT16B and p53 expression (Fig. 5A). AKT is also activated in WNT16B-expressing MRC5 fibroblasts (Fig. 5B). Moreover, AKT activation was dependent on phosphoinositide 3-kinase (PI3K) activity and was abrogated through treatment with the specific PI3K inhibitor LY294002 (Fig. 5C). Interestingly, AKT was also activated after irradiation in MRC5-hTERT, and this activation was also dependent on both WNT16B and p53 expression (Fig. 4D). Overall, these results show that WNT16B regulates the PI3K/AKT pathway in cellular senescence.

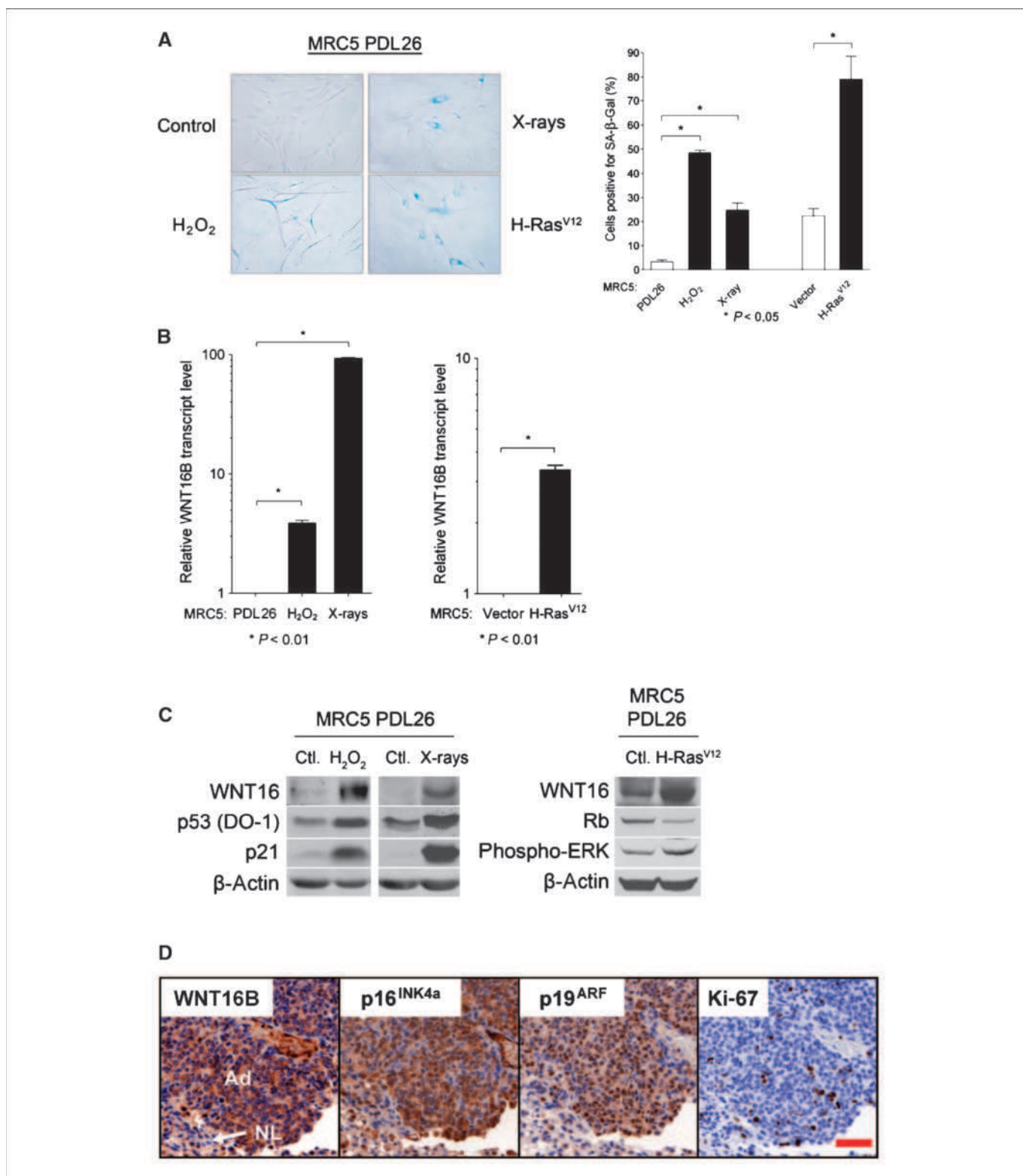


Figure 2. Expression of WNT16B in SIPS and OIS. *A*, MRC5 fibroblasts were stained for SA-β-Gal expression and quantified. Columns, mean; bars, SD. *B*, WNT16B mRNA expression was analyzed by qRT-PCR in MRC5 PDL26 fibroblasts exposed to H₂O₂ or X-rays (left) or infected with a retrovirus coding for H-Ras^{V12} (right). mRNA expression in MRC5 PDL26 fibroblasts was normalized to 1. Columns, mean; bars, SD. *C*, left and middle, Western blot analysis of WNT16B, p53, and p21 protein expression in MRC5 PDL26 fibroblasts exposed to H₂O₂ or X-rays; right, WNT16B, Rb, and phosphorylated ERK protein expression was analyzed in MRC5 PDL26 fibroblasts infected with a retrovirus coding for H-Ras^{V12}. β-Actin was used as a loading control. *D*, expression of WNT16B during OIS *in vivo*. Immunohistochemical analysis of WNT16B, p19^{ARF}, p16^{INK4A}, and Ki-67 in serial sections of K-Ras^{V12}-induced lung adenomas. Note strong positive staining of WNT16B in the cytoplasm of most tumor cells [adenomas (Ad)] but weak or negative staining in the pocket of nontumoral cells located in the bottom left corner [normal lung (NL)]. Most tumor cells showed nuclear staining of p19^{ARF} often with intense signal in the nucleoli. A fraction of tumor cells gave positive nuclear staining for p16^{INK4A}, whereas the cytoplasmic staining could be nonspecific. Scale bar, 50 μm.

Discussion

Replicative senescence is a permanent state of proliferative arrest resulting from telomere shortening (33). In replicative senescence, telomere shortening triggers a DNA damage response and

the activation of the p53 transcription factor (34). In turn, p53 transactivates target genes, such as the CDK inhibitor *p21^{WAF1}*, to induce cell cycle arrest. As observed by expression profiling experiments done by us and others (35), senescent cells are characterized by the

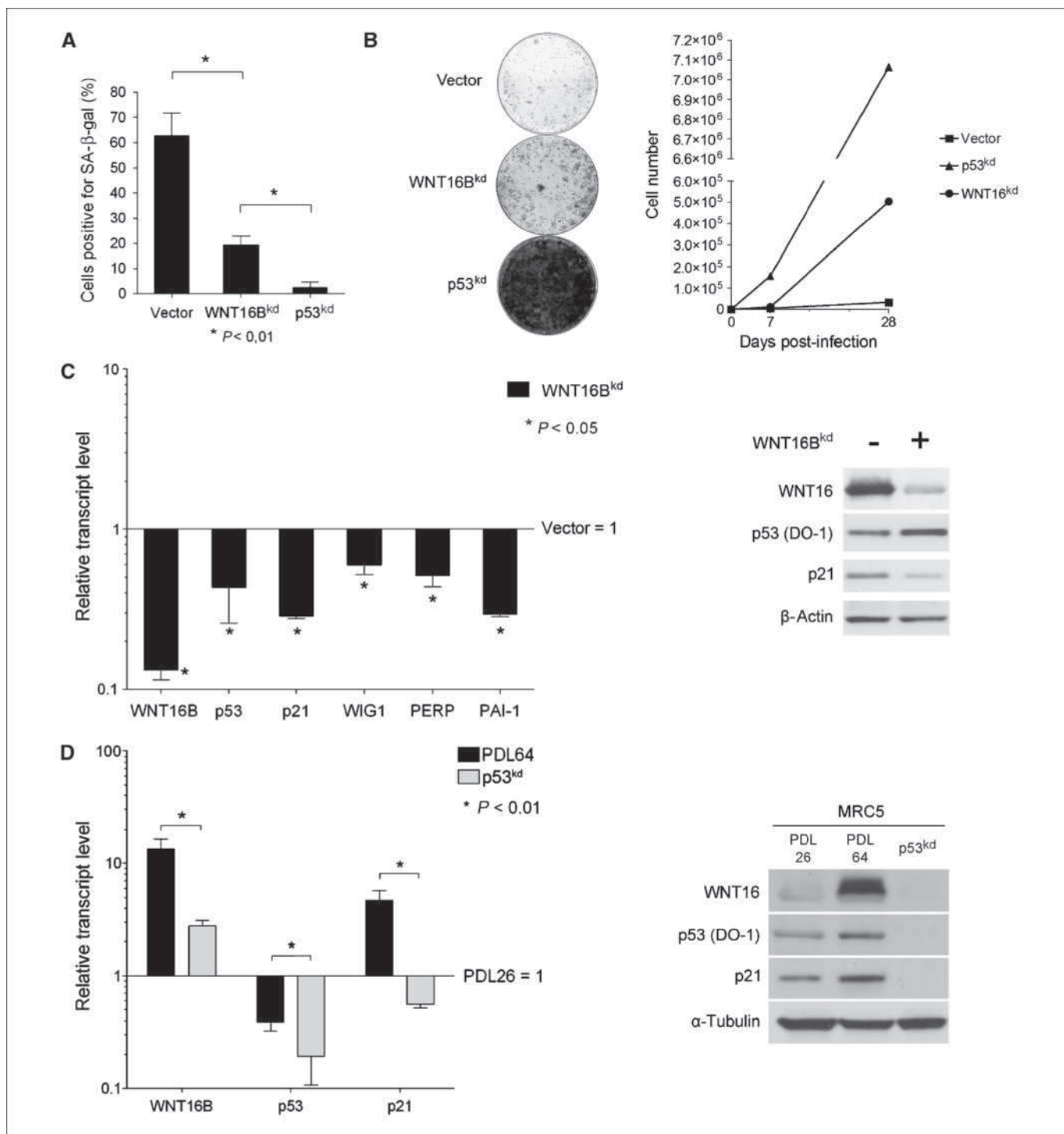


Figure 3. Inhibition of WNT16B or p53 expression in presenescent fibroblasts. *A*, control senescent cells (PDL64), WNT16B^{kd} cells, and p53^{kd} MRC5 fibroblasts were stained for SA-β-Gal activity and quantified. *Columns*, mean; *bars*, SD. *B*, *left*, 5,000 control senescent cells (PDL64), WNT16B^{kd} cells, and p53^{kd} cells were seeded into 10-cm² plates for 3 wk and stained with methylene blue; *right*, proliferation curves of control senescent cells (PDL64), WNT16B^{kd} cells, and p53^{kd} cells. *C*, *left*, WNT16B, p53, p21, WIG1, PERP, and PAI-1 mRNA expression was analyzed by qRT-PCR in WNT16B^{kd} MRC5 fibroblasts. mRNA expression in MRC5 PDL26 fibroblasts was normalized to 1. *Columns*, mean; *bars*, SD. *Right*, WNT16, p53, and p21 protein expression was analyzed using α-tubulin as a loading control. *D*, *left*, WNT16B, p53, and p21 mRNA expression in young (PDL26), senescent (PDL64), or p53^{kd} MRC5 fibroblasts was analyzed by qRT-PCR. mRNA expression in MRC5 PDL26 fibroblasts was normalized to 1. *Columns*, mean; *bars*, SD. *Right*, WNT16, p53, and p21 protein expression was analyzed using α-tubulin as a loading control.

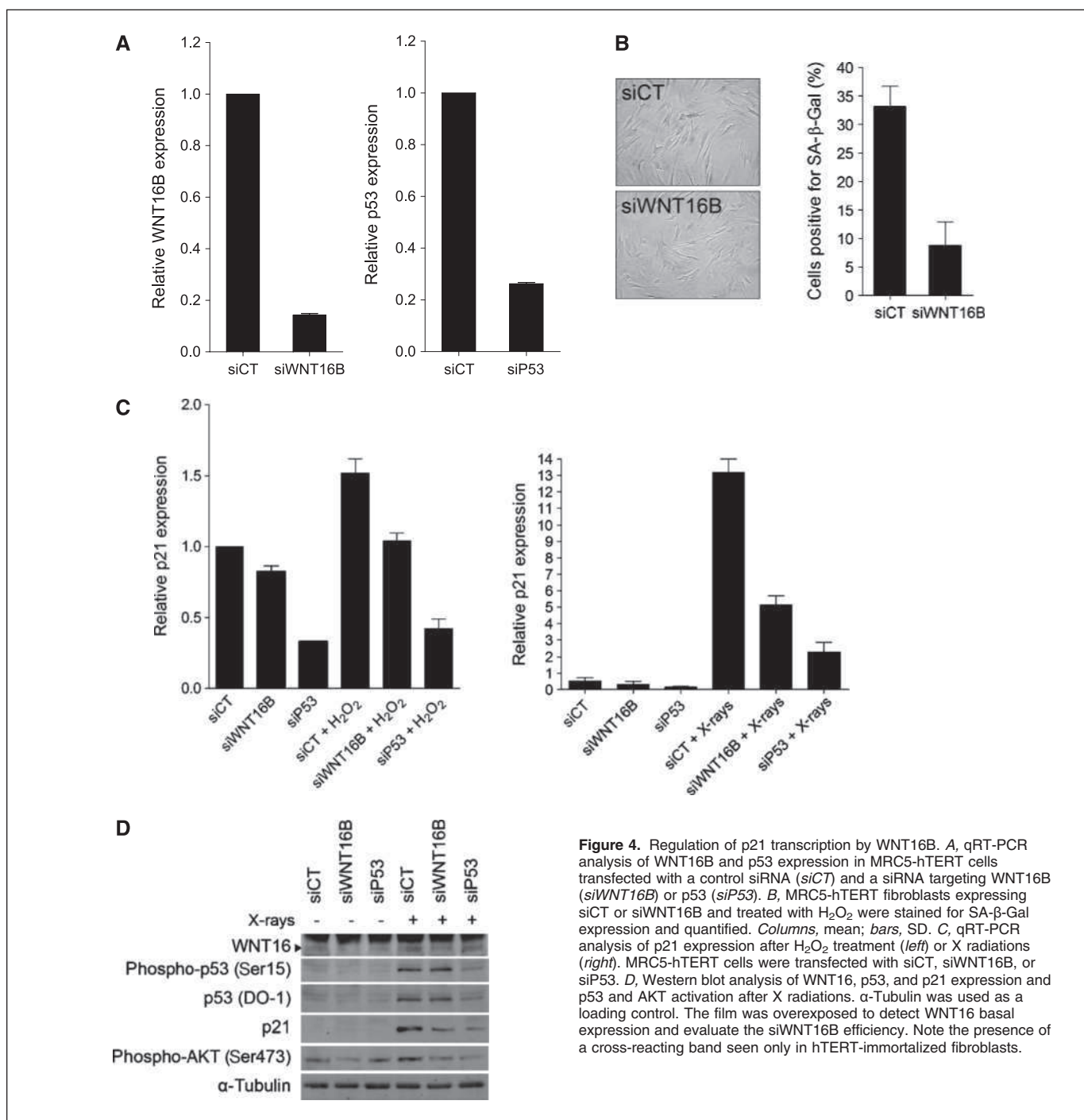


Figure 4. Regulation of p21 transcription by WNT16B. **A**, qRT-PCR analysis of WNT16B and p53 expression in MRC5-hTERT cells transfected with a control siRNA (*siCT*) and a siRNA targeting WNT16B (*siWNT16B*) or p53 (*siP53*). **B**, MRC5-hTERT fibroblasts expressing *siCT* or *siWNT16B* and treated with H₂O₂ were stained for SA-β-Gal expression and quantified. *Columns*, mean; *bars*, SD. **C**, qRT-PCR analysis of p21 expression after H₂O₂ treatment (*left*) or X-radiations (*right*). MRC5-hTERT cells were transfected with *siCT*, *siWNT16B*, or *siP53*. **D**, Western blot analysis of WNT16B, p53, and p21 expression and p53 and AKT activation after X-radiations. α-Tubulin was used as a loading control. The film was overexposed to detect WNT16B basal expression and evaluate the *siWNT16B* efficiency. Note the presence of a cross-reacting band seen only in hTERT-immortalized fibroblasts.

downregulation of genes involved in cell cycle progression and DNA replication (Supplementary Table S3), whereas p53 pathway components are overexpressed (Supplementary Table S2). We identified components of the WNT pathway as being activated in replicative senescence and *WNT16B* as the most overexpressed gene. The WNT proteins are a family of secreted factors that can signal through either β-catenin-dependent or β-catenin-independent pathways (36). The WNT pathways have been associated with senescence reversal and cellular transformation (WNT2; ref. 6). The WNT pathways may also be involved in the activation of senescence

because continuous exposure to WNT3A induces premature senescence in mouse fibroblasts (26). Our work provides a new insight into the functions of WNT pathways in promoting cellular senescence.

WNT16B was initially described as an oncogene able to activate β-catenin in pre-B acute lymphoblastoid leukemia or to signal in a β-catenin-independent manner in basal cell carcinoma (20, 29). In the present study, we observed that WNT16B does not activate β-catenin but the AKT pathway. This can be related to what is observed with WNT5A and WNT10B (37, 38). Indeed, WNT5A can

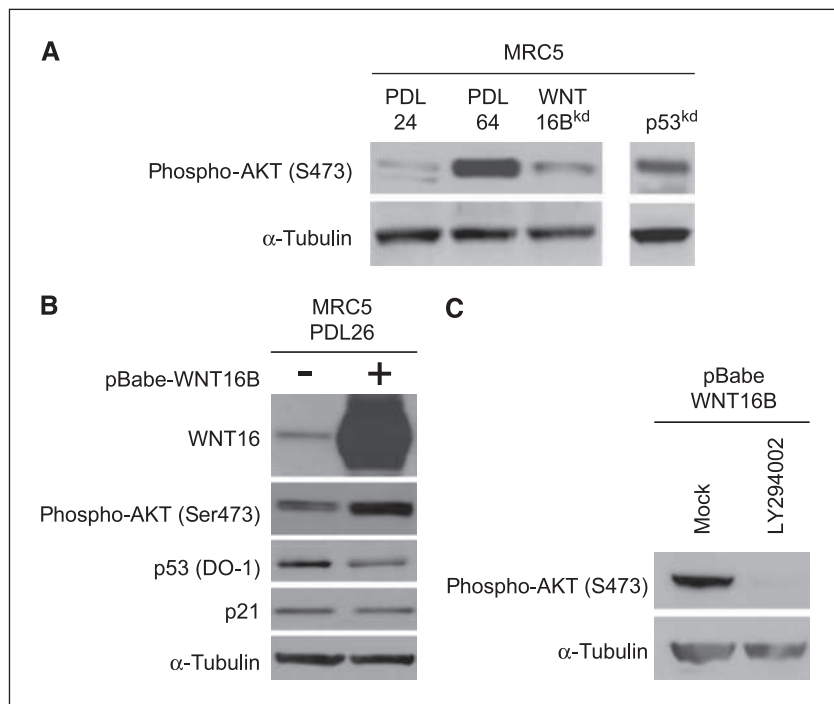


Figure 5. Regulation of AKT by WNT16B. **A**, Western blot analysis of AKT activation in dividing (PDL28), senescent (PDL64), WNT16B^{kd}, and p53^{kd} MRC5 fibroblasts. α-Tubulin was used as a loading control. **B**, Western blot analysis of AKT activation and WNT16, p53, and p21 protein expression in pBabe and pBabe-WNT16B MRC5 fibroblasts. α-Tubulin was used as a loading control. **C**, analysis of AKT activation in pBabe-WNT16B MRC5 fibroblasts by Western blot after treatment with LY294002.

activate the PI3K/AKT pathway, which inhibits β-catenin function and suppresses cell growth in colorectal cancer cells (37). Thus, WNT16B, WNT10B, and WNT5A belong to a subfamily of WNT ligands capable of antagonistic activities depending on which signaling pathway is stimulated.

WNT16B was upregulated in SIPS caused by exposure to H₂O₂, X-rays, or oncogenic H-Ras^{V12}. Thus, WNT16B is a bona fide marker of cellular senescence. Along with p21^{WAF1} and p16^{INK4A}, WNT16B can be used to validate the senescence phenotype together with the SA-β-Gal assay. We further validated WNT16B as a marker of senescence *in vivo* in K-Ras^{V12}-induced lung adenomas. This model also associates WNT16B with the initial steps of tumorigenesis and suggests that this new marker could be useful as a diagnostic tool for the early detection of tumor formation. Indeed, because WNT16B is a secreted factor, we could expect that the protein would be detectable in body fluids (e.g., in blood) and allow a noninvasive examination (39).

Both p53 and WNT16B are necessary for the onset of replicative senescence. When p53 is inactivated, senescence is bypassed and *WNT16B* gene fails to be upregulated. Similarly, WNT16B knockdown delays the onset of senescence and does not allow the transcriptional activation of p53 target genes. Although WNT16B has never been described as a p53 transcriptional target, a bioinformatic analysis identified putative p53 response elements in the WNT16B promoter (data not shown). However, further experiments are needed to determine whether WNT16B is a direct transcriptional target of p53. Alternatively, WNT16B may be necessary for the maintenance of the p53 transcriptional activity in senescence. Indeed, our results show that despite the activation of p53 in WNT16B^{kd} cells, p21^{WAF1} is not fully activated. How is WNT16B regulating the p53 pathway? One candidate WNT16B-dependent pathway highlighted here is the PI3K/AKT pathway. Indeed, acute loss of the phosphatase and tensin homologue, an

inhibitor of AKT activation in mouse fibroblasts, is responsible for the induction of senescence through the upregulation of ARF and stabilization of the p53 protein (40–42). AKT activation is responsible for the accumulation of reactive oxygen species that are essential to allow the activation of the p53 pathway and the onset of senescence (42). Thus, we propose that in replicative senescence WNT16B activation is dependent on telomere shortening and subsequent p53 activation. WNT16 may be necessary for the full and maintained transcriptional activity of p53 perhaps through activation of the AKT pathway. The relationship between WNT16B and p53 is different from that described with PAI-1, which is necessary for the onset of senescence but has no effect on p53 activity (10).

Overall, our study describes the secreted factor WNT16B as a marker and an actor of cellular senescence *in vitro* and *in vivo*.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

Received 3/18/09; revised 10/9/09; accepted 10/15/09; published OnlineFirst 12/1/09.

Grant support: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, "Agir a dom," l'Association pour la Recherche contre le Cancer, and Marie Curie International Reintegration (EU) grant MIRG-CT-2006-042148. R. Binet, D. Ythier, and D. Larrieu are recipients of doctoral fellowships from La Fondation pour la Recherche Médicale (Prix Marianne Josso), INCa, and the French Ministry of Education and Research, respectively. R. Pedeut was a recipient of an International Association for the Study of Lung Cancer fellowship.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank Thibault Voeltzel for providing MRC5 fibroblasts, Dr. Stephanie Corde and Antoine Dorenlot for their help in the X-radiation experiments, and Dr. Teck Teh for providing the pEGFP/IRE5-WNT16A plasmid.

References

1. Deng Y, Chan S, Chang S. Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer* 2008;8:450–8.
2. Hayflick L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965;37:614–36.
3. d'Adda di Fagnana F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* 2008;8:512–22.
4. Di Leonardo A, Linke S, Clarkin K, Wahl G. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 1994;8:2540–51.
5. Chen Q, Ames B. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:4130–4.
6. Ye X, Zerlanko B, Kennedy A, Banumathy G, Zhang R, Adams P. Downregulation of Wnt signaling is a trigger for formation of facultative heterochromatin and onset of cell senescence in primary human cells. *Mol Cell* 2007;27:183–96.
7. Acosta J, O'Loughlin A, Banito A, et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* 2008;133:1006–18.
8. Serrano M, Lin A, McCurrach M, Beach D, Lowe S. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997;88:593–602.
9. Itahana K, Campisi J, Dimri G. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* 2004;5:1–10.
10. Kortlever R, Higgins P, Bernard R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol* 2006;8:877–84.
11. Kim K, Seu Y, Baek S, et al. Induction of cellular senescence by insulin-like growth factor binding protein-5 through a p53-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 2007;18:4543–52.
12. Wajapeyee N, Serra R, Zhu X, Mahalingam M, Green M. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* 2008;132:363–74.
13. Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld L, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 2008;133:1019–31.
14. Coppé J, Patil C, Rodier F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 2008;6:2853–68.
15. Wang E. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res* 1995;55:2284–92.
16. Dimri G, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9363–7.
17. Itahana K, Campisi J, Dimri G. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated β -galactosidase assay. *Methods Mol Biol* 2007;371:21–31.
18. Collado M, Gil J, Efeyan A, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 2005;436:642.
19. Brummelkamp T, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002;296:550–3.
20. Mazieres J, You L, He B, et al. Inhibition of Wnt16 in human acute lymphoblastoid leukemia cells containing the t(1;19) translocation induces apoptosis. *Oncogene* 2005;24:5396–400.
21. Halbert C, Demers G, Galloway D. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. *J Virol* 1992;66:2125–34.
22. MacKenzie K, Franco S, May C, Sadelain M, Moore M. Mass cultured human fibroblasts overexpressing hTERT encounter a growth crisis following an extended period of proliferation. *Exp Cell Res* 2000;259:336–50.
23. Pedeux R, Sengupta S, Shen J, et al. ING2 regulates the onset of replicative senescence by induction of p300-dependent p53 acetylation. *Mol Cell Biol* 2005;25:6639–48.
24. Larrieu D, Ythier D, Binet R, et al. ING2 controls the progression of DNA replication forks to maintain genome stability. *EMBO Rep* 2009;10:1168–74.
25. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 2005;15:28–32.
26. Liu H, Fergusson M, Castilho R, et al. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* 2007;317:803–6.
27. Maiese K, Li F, Chong Z, Shang Y. The Wnt signaling pathway: aging gracefully as a protectionist? *Pharmacol Ther* 2008;118:58–81.
28. Fear M, Kelsell D, Spurr N, Barnes M. Wnt-16a, a novel Wnt-16 isoform, which shows differential expression in adult human tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:814–20.
29. Teh M, Blaydon D, Ghali L, et al. Role for WNT16B in human epidermal keratinocyte proliferation and differentiation. *J Cell Sci* 2007;120:330–9.
30. Guerra C, Mijimolle N, Dhawahir A, et al. Tumor induction by an endogenous K-Ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* 2003;4:111–20.
31. Dissanayake S, Wade M, Johnson C, et al. The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007;282:17259–71.
32. Medrano E. Wnt5a and PKC, a deadly partnership involved in melanoma invasion. *Pigment Cell Res* 2007;20:258–9.
33. Bodnar A, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998;279:349–52.
34. Herbig U, Jobling W, Chen B, Chen D, Sedivy J. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21 (CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* 2004;14:501–13.
35. Zhang H, Cohen S, Smurf2 up-regulation activates telomere-dependent senescence. *Genes Dev* 2004;18:3028–40.
36. Logan C, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781–810.
37. Ying J, Li H, Yu J, et al. WNT5A exhibits tumor-suppressive activity through antagonizing the Wnt/ β -catenin signaling, and is frequently methylated in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:55–61.
38. Yoshikawa H, Matsubara K, Zhou X, et al. WNT10B functional dualism: β -catenin/Tcf-dependent growth promotion or independent suppression with deregulated expression in cancer. *Mol Biol Cell* 2007;18:4292–303.
39. Jiang H, Schiffer E, Song Z, et al. Proteins induced by telomere dysfunction and DNA damage represent biomarkers of human aging and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:11299–304.
40. Chen Z, Trotman L, Shaffer D, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 2005;436:725–30.
41. Xue W, Zender L, Miething C, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 2007;445:656–60.
42. Nogueira V, Park Y, Chen C, et al. Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell* 2008;14:458–70.

Supplementary material

Material and methods

RNA isolation, microarray hybridization, and data analysis

Cells were lysed with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and total RNA was isolated according to the manufacturer's instructions. RNA integrity was assessed by the presence of 28S and 18S bands in denaturing agarose gel electrophoresis and spectrophotometry with A260/A280 ratios > 2.0 after dilution in TE-buffer. Independent isolates of young and senescent MRC5 fibroblasts were reverse-transcribed and fluorescence-labeled with Cy3 or Cy5 followed by hybridization onto 70-mer oligonucleotide microarrays printed by the Advanced Technology Center of the NCI featuring 21,329 probes (Qiagen Human Array-Ready Oligo Set, Version 2.0). A total of six arrays, including biological and technical replicates were hybridized as described (1). Hybridized arrays were scanned with a GenePix 4000A scanner (Axon Instruments, Foster City, CA) with variable voltages to achieve saturated signal intensities for about 1% of the total spot number. Acquired images were processed with GenePix Pro 3.0 software (Axon Instruments) and the resulting raw data ratios were uploaded to the NCI MicroArray Database (madb, <http://nciarray.nci.nih.gov/>) for normalization, data extraction, and further analysis. Microarrays data have been referenced into GEO under the number GSE15919.

Genes (2902) that were present in less than 50% arrays were excluded from further analysis and those with average ratio ≥ 2 or ≤ 0.5 were selected, yielding a filtered senescence gene expression signature of 177 upregulated gene probes and 338 downregulated gene probes. This signature was analyzed for features mapped to a KEGG Pathway and/or BioCarta Pathway, using the Pathway Summary Report tool in madb.

RT-PCR analysis.

Sequences of the primers used are CCT-ATC-ACT-GCT-GGC-CTT-TT (WNT16B F), AGC-CGC-TCC-TCT-TTT-GCA-C (WNT16B R), GAC-ACC-ACT-GGA-GGG-TGA-CT (P21), CAG-GTC-CAC-ATG-GTC-TTC-CT (P21 R), ATG-GAG-GAG-

CCG-CAG-TCA-GAT (P53 F), ACC-TGG-GTC-TTC-AGT-GAA-CCA-TTG (P53 R), CGA-GAT-CCC-TCC-AAA-ATC-AA (GAPDH F), ATC-CAC-AGT-CTT-CTG-GGT-GG (GAPDH R), GGG-TTT-AGA-CCG-TCG-TGA-GA (28S F), CCA-TGG-CAA-CAA-CAC-TAC-AT (28S R), CAC-CCT-CAG-CAT-GTT-CAT-TG (PAI-1 F), GGT-CAT-GTT-GCC-TTT-CCA-GT (PAI-1 R), CTC-TCG-GCA-GAG-AAT-TCC-AC (WIG1 F), CCT-GTA-CCG-CTG-TTC-AGA-CA (WIG1 R), CAT-GCT-CTT-CTG-TGG-CTT-CA (PERP F), AAA-GCC-GTA-GGC-CCA-GTT-AT (PERP R), AGC ATG GAG CCT TCG GCT GAC T (P16 F), CTG TAG GAC CTT CGG TGA CTG AT (P16 R).

1. Staib F, Robles A, Varticovski L, et al. The p53 tumor suppressor network is a key responder to microenvironmental components of chronic inflammatory stress. *Cancer Res* 2005; 65: 10255-64.

Figure legends

Table S1.

Microarray analysis of genes expression in replicative senescence in MRC5 fibroblasts.

Table S2.

Microarray analysis of genes upregulated in replicative senescence in MRC5 fibroblasts: enriched KEGG pathways.

Table S3.

Microarray analysis of genes downregulated in replicative senescence in MRC5 fibroblasts: enriched KEGG pathways.

Figure S4.

WNT16B regulation in replicative senescence.

Pre-senescent MRC5 fibroblasts (PDL58) were stably infected with retrovirus coding for the human telomerase reverse transcriptase catalytic unit (hTERT).

A - MRC5 hTERT fibroblasts were stained for SA- β -Gal expression (left) and quantified (right). Percentage of positive cells from MRC5 PDL64 is shown in lack. The graphs represent means \pm standard deviation (SD).

B - WNT16B and p21 mRNA expression in young (PDL26), senescent (PDL64), or hTERT MRC5 fibroblasts was analyzed by qRT-PCR. 18S was used as control. mRNA expression in MRC5 PDL26 fibroblasts was normalized to 1. The graphs represent means \pm SD.

C - Western blot analysis of WNT16, p53, and p21 protein expression using β -actin as a loading control.

Figure S5.

Overexpression of WNT16B in young fibroblasts – analysis of senescence markers.

Young MRC5 fibroblasts (PDL26) were infected with a retrovirus coding for WNT16B (pBabe-WNT16B).

A – One hundred thousand selected cells were tested for SA- β -gal activity and quantified. The graphs represent means \pm SD

B – Five thousand cells were seeded into 10cm² plates for 3 weeks and stained with methylene blue.

C – BrdU incorporation into pBabe and pBabe-WNT16B MRC5 fibroblasts.

D – *Left*: WNT16B, p53, and p21 mRNA expression was analyzed by qRT-PCR in pBabe-WNT16B MRC5 fibroblasts. 18S was used for standardization. mRNA expression in MRC5 PDL26 fibroblasts was normalized to 1. The graphs represent means \pm SD. *Right*: Analysis of WNT16 and p16INK4a proteins expression by western blot. α -tubulin was used as loading control.

Table S1.

A. Complete list of 177 genes overexpressed in replicative senescence

Value	Gene	Description	UniGene	RefSeq
2.440	WNT16	wingless-type MMTV integration site family, member 16 (WNT16), transcript variant 2, mRNA.	Hs.272375	NM_016087
2.355	MMP10	matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2) (MMP10), mRNA.	Hs.2258	NM_002425
2.344	MMP3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase) (MMP3), mRNA.	Hs.375129	NM_002422
2.300	HIST1H2AC	Histone cluster 1, H2ac	Hs.484950	
2.134	CLDN1	claudin 1 (CLDN1), mRNA.	Hs.439060	NM_021101
2.119	TSPAN13	tetraspanin 13 (TSPAN13), mRNA.	Hs.364544	NM_014399
2.112	HIST2H2BE	histone cluster 2, H2be (HIST2H2BE), mRNA.	Hs.2178	NM_003528
2.070	HIST2H2BE	histone cluster 2, H2be (HIST2H2BE), mRNA.	Hs.2178	NM_003528
2.026	DCBLD2	discoidin, CUB and LCCL domain containing 2 (DCBLD2), mRNA.	Hs.203691	NM_080927
2.007	SERPINB2	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2 (SERPINB2), mRNA.	Hs.594481	NM_002575
2.004	HIST2H2BE	histone cluster 2, H2be (HIST2H2BE), mRNA.	Hs.2178	NM_003528
1.989	OBFC2A	Oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 2A	Hs.591610	
1.962	HIST2H2BE	histone cluster 2, H2be (HIST2H2BE), mRNA.	Hs.2178	NM_003528
1.947	PLCB4	phospholipase C, beta 4 (PLCB4), transcript variant 2, mRNA.	Hs.472101	NM_182797
1.934	PLCB4	phospholipase C, beta 4 (PLCB4), transcript variant 1, mRNA.	Hs.472101	NM_000933
1.933	KRTAP1-5	keratin associated protein 1-5 (KRTAP1-5), mRNA.	Hs.534499	NM_031957
1.894	HIST2H2BE	histone cluster 2, H2be (HIST2H2BE), mRNA.	Hs.2178	NM_003528
1.884	CYTL1	cytokine-like 1 (CYTL1), mRNA.	Hs.13872	NM_018659
1.848	TNFRSF10D	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain (TNFRSF10D), mRNA.	Hs.213467	NM_003840
1.785	MMP1	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) (MMP1), mRNA.	Hs.83169	NM_002421
1.781	P2RX5	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 5 (P2RX5), transcript variant 2, mRNA.	Hs.408615	NM_175080
1.775	ARRDC4	arrestin domain containing 4 (ARRDC4), mRNA.	Hs.6093	NM_183376
1.738	CCND2	cyclin D2 (CCND2), mRNA.	Hs.376071	NM_001759
1.737	CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (CDKN1A), transcript variant 1, mRNA.	Hs.370771	NM_000389

1.716	AOX1	aldehyde oxidase 1 (AOX1), mRNA.	Hs.406238	NM_001159
1.713	WDR63	WD repeat domain 63 (WDR63), mRNA.	Hs.97933	NM_145172
1.711	HIST2H2BE	histone cluster 2, H2be (HIST2H2BE), mRNA.	Hs.2178	NM_003528
1.692	HIST2H2BE	histone cluster 2, H2be (HIST2H2BE), mRNA.	Hs.2178	NM_003528
1.685	LPXN	leupaxin (LPXN), mRNA.	Hs.125474	NM_004811
1.658	HIST2H2BE	histone cluster 2, H2be (HIST2H2BE), mRNA.	Hs.2178	NM_003528
1.640	GLS	glutaminase (GLS), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.	Hs.116448	NM_014905
1.599	C15orf48	chromosome 15 open reading frame 48 (C15orf48), transcript variant 1, mRNA.	Hs.112242	NM_197955
1.591	HIST2H2BE	histone cluster 2, H2be (HIST2H2BE), mRNA.	Hs.2178	NM_003528
1.574	PNPLA3	patatin-like phospholipase domain containing 3 (PNPLA3), mRNA.	Hs.654800	NM_025225
1.569	HIST2H2BE	histone cluster 2, H2be (HIST2H2BE), mRNA.	Hs.2178	NM_003528
1.568	FUT7	fucosyltransferase 7 (alpha (1,3) fucosyltransferase) (FUT7), mRNA.	Hs.457	NM_004479
1.567	RRM2B	ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible) (RRM2B), mRNA.	Hs.512592	NM_015713
1.563	FYN	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES (FYN), transcript variant 2, mRNA.	Hs.390567	NM_153047
1.548	PKIB	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor beta (PKIB), transcript variant 3, mRNA.	Hs.486354	NM_032471
1.534	LEPREL1	leprecan-like 1 (LEPREL1), mRNA.	Hs.374191	NM_018192
1.527	CHI3L1	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39) (CHI3L1), mRNA.	Hs.382202	NM_001276
1.526	HMG2	high mobility group AT-hook 2 (HMG2), transcript variant 1, mRNA.	Hs.505924	NM_003483
1.514	MAMDC2	MAM domain containing 2 (MAMDC2), mRNA.	Hs.547172	NM_153267
1.510	NEK10	NIMA (never in mitosis gene a)- related kinase 10 (NEK10), transcript variant 1, mRNA.	Hs.506115	NM_001031741
1.506	TRIM58	tripartite motif-containing 58 (TRIM58), mRNA.	Hs.323858	NM_015431
1.500	HIST2H2BE	histone cluster 2, H2be (HIST2H2BE), mRNA.	Hs.2178	NM_003528
1.498	HIST2H2BE	histone cluster 2, H2be (HIST2H2BE), mRNA.	Hs.2178	NM_003528
1.493	CYB5R1	cytochrome b5 reductase 1 (CYB5R1), mRNA.	Hs.334832	NM_016243
1.487	TMEM154	transmembrane protein 154 (TMEM154), mRNA.	Hs.518900	NM_152680
1.468	TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b (TNFRSF10B), transcript variant 2, mRNA.	Hs.521456	NM_147187
1.466	HIST1H4H	histone cluster 1, H4h (HIST1H4H), mRNA.	Hs.591790	NM_003543
1.465	STC1	stanniocalcin 1 (STC1), mRNA.	Hs.25590	NM_003155
1.464	KCNN2	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2 (KCNN2), transcript variant 2, mRNA.	Hs.98280	NM_170775
1.458	HIST2H2BE	histone cluster 2, H2be (HIST2H2BE), mRNA.	Hs.2178	NM_003528
1.439	SMURF2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2 (SMURF2), mRNA.	Hs.705442	NM_022739

1.439	SLC16A6	solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7) (SLC16A6), mRNA.	Hs.42645	NM_004694
1.429	INA	internexin neuronal intermediate filament protein, alpha (INA), mRNA.	Hs.500916	NM_032727
1.427	PTX3	pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta (PTX3), mRNA.	Hs.591286	NM_002852
1.424	HIST1H1C	histone cluster 1, H1c (HIST1H1C), mRNA.	Hs.7644	NM_005319
1.423	IGFBP7	insulin-like growth factor binding protein 7 (IGFBP7), mRNA.	Hs.479808	NM_001553
1.412	ITGA6	Integrin, alpha 6	Hs.133397	
1.407		CDNA FLJ12136 fis, clone MAMMA1000312	Hs.655291	
1.395	SFRP1	secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1), mRNA.	Hs.708003	NM_003012
1.393	PERP	PERP, TP53 apoptosis effector (PERP), mRNA.	Hs.520421	NM_022121
1.378	LOC654433	CDNA clone IMAGE:4826696	Hs.656660	
1.371	GALNT5	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5 (GalNAc-T5) (GALNT5), mRNA.	Hs.269027	NM_014568
1.347	TNFRSF10C	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c, decoy without an intracellular domain (TNFRSF10C), mRNA.	Hs.655801	NM_003841
1.329	NFE2L3	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3 (NFE2L3), mRNA.	Hs.404741	NM_004289
1.327	AKAP2	A kinase (PRKA) anchor protein 2 (AKAP2), mRNA.	Hs.591908	NM_001004065
1.324	P11	22 serine protease placental protein 11	Hs.997	
1.322	NRG1	neuregulin 1 (NRG1), transcript variant HRG-beta2, mRNA.	Hs.453951	NM_013957
1.322	SERPINB7	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 7 (SERPINB7), transcript variant 2, mRNA.	Hs.138202	NM_001040147
1.320	AK3L1	Adenylate kinase 3-like 1	Hs.592601	
1.317	BRP44	brain protein 44 (BRP44), mRNA.	Hs.517768	NM_015415
1.316	MCTP2	Multiple C2 domains, transmembrane 2	Hs.592017	
1.307	SERPINI1	serpin peptidase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1 (SERPINI1), mRNA.	Hs.478153	NM_005025
1.287	CLGN	calmagin (CLGN), mRNA.	Hs.86368	NM_004362
1.285	IGF2BP3	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 (IGF2BP3), mRNA.	Hs.700696	NM_006547
1.277	DYNLT3	dynein, light chain, Tctex-type 3 (DYNLT3), mRNA.	Hs.446392	NM_006520
1.277	FBXL2	F-box and leucine-rich repeat protein 2 (FBXL2), mRNA.	Hs.475872	NM_012157
1.270	TMEM47	transmembrane protein 47 (TMEM47), mRNA.	Hs.8769	NM_031442
1.264	UACA	uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats (UACA), transcript variant 1, mRNA.	Hs.108049	NM_018003
1.261	FLJ11151	hypothetical protein FLJ11151 (FLJ11151), transcript variant 2, mRNA.	Hs.460002	NM_001099455
1.259	WNT5B	wingless-type MMTV integration site family, member 5B (WNT5B), transcript variant 2, mRNA.	Hs.306051	NM_030775
1.257	GDF15	growth differentiation factor 15 (GDF15), mRNA.	Hs.616962	NM_004864
1.247	DRP2	dystrophin related protein 2 (DRP2), mRNA.	Hs.159291	NM_001939

1.242	HIST1H2BM	histone cluster 1, H2bm (HIST1H2BM), mRNA.	Hs.182432	NM_003521
1.240	APLP1	amyloid beta (A4) precursor-like protein 1 (APLP1), transcript variant 2, mRNA.	Hs.74565	NM_005166
1.235	TOP1MT	topoisomerase (DNA) I, mitochondrial (TOP1MT), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.	Hs.528574	NM_052963
1.233	PCYOX1	prenylcysteine oxidase 1 (PCYOX1), mRNA.	Hs.591572	NM_016297
1.232	KIAA1370	KIAA1370 (KIAA1370), mRNA.	Hs.152385	NM_019600
1.230	SMURF2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	Hs.705442	
1.220	SAT1	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1 (SAT1), mRNA.	Hs.28491	NM_002970
1.220	PTPRK	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K (PTPRK), mRNA.	Hs.155919	NM_002844
1.219	DLX2	distal-less homeobox 2 (DLX2), mRNA.	Hs.419	NM_004405
1.214	SC4MOL	sterol-C4-methyl oxidase-like (SC4MOL), transcript variant 2, mRNA.	Hs.105269	NM_001017369
1.214	SIN3B	SIN3 homolog B, transcription regulator (yeast) (SIN3B), mRNA.	Hs.13999	NM_015260
1.205	LOC554202	Hypothetical LOC554202, mRNA (cdna clone MGC:30053 IMAGE:5139119)	Hs.458096	
1.191	PRSS23	protease, serine, 23 (PRSS23), mRNA.	Hs.25338	NM_007173
1.176	NPAL3	NIPA-like domain containing 3 (NPAL3), mRNA.	Hs.523442	NM_020448
1.173	LPIN1	lipin 1 (LPIN1), mRNA.	Hs.467740	NM_145693
1.173	NAV3	Neuron navigator 3	Hs.655301	
1.163	COBLL1	COBL-like 1 (COBLL1), mRNA.	Hs.470457	NM_014900
1.156	RAC2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2) (RAC2), mRNA.	Hs.517601	NM_002872
1.154	NT5E	5'-nucleotidase, ecto (CD73) (NT5E), mRNA.	Hs.153952	NM_002526
1.154	PINK1	PTEN induced putative kinase 1 (PINK1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.	Hs.389171	NM_032409
1.148	CPA4	carboxypeptidase A4 (CPA4), mRNA.	Hs.93764	NM_016352
1.146	TRIM22	tripartite motif-containing 22 (TRIM22), mRNA.	Hs.501778	NM_006074
1.142	LOC728285	PREDICTED: similar to keratin associated protein (LOC728285), mRNA.		XM_001127070
1.140	DAPK1	death-associated protein kinase 1 (DAPK1), mRNA.	Hs.380277	NM_004938
1.140	CTSL1	cathepsin L1 (CTSL1), transcript variant 2, mRNA.	Hs.418123	NM_145918
1.137	LOC654433	CDNA clone IMAGE:4826696	Hs.656660	
1.137	LRRN3	leucine rich repeat neuronal 3 (LRRN3), transcript variant 3, mRNA.	Hs.3781	NM_018334
1.128	IL13RA2	interleukin 13 receptor, alpha 2 (IL13RA2), mRNA.	Hs.336046	NM_000640
1.126	SEMA7A	semaphorin 7A, GPI membrane anchor (John Milton Hagen blood group) (SEMA7A), mRNA.	Hs.24640	NM_003612
1.125		CDNA FLJ39162 fis, clone OCBBF2002376	Hs.283851	
1.113	TAC3	tachykinin 3 (neuromedin K, neurokinin beta) (TAC3), transcript variant 2, mRNA.	Hs.9730	NM_013251
1.112	CNIH3	cornichon homolog 3 (Drosophila) (CNIH3), mRNA.	Hs.28659	NM_152495

1.111	UBE2Q1	ubiquitin-conjugating enzyme E2Q (putative) 1 (UBE2Q1), mRNA.	Hs.607928	NM_017582
1.106	IL1R2	interleukin 1 receptor, type II (IL1R2), transcript variant 2, mRNA.	Hs.25333	NM_173343
1.104	AHNAK2	AHNAK nucleoprotein 2 (AHNAK2), mRNA.	Hs.708330	NM_138420
1.102	CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4 (CYP3A4), mRNA.	Hs.654391	NM_017460
1.101	AK3L1	Adenylate kinase 3-like 1	Hs.10862	
1.098	SLC20A1	solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1 (SLC20A1), mRNA.	Hs.187946	NM_005415
1.092	hCG_1776018	Hypothetical protein LOC644139	Hs.553909	
1.092	SCG2	secretogranin II (chromogranin C) (SCG2), mRNA.	Hs.516726	NM_003469
1.082	IL18	interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor) (IL18), mRNA.	Hs.83077	NM_001562
1.081	AKR1B1	aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase) (AKR1B1), mRNA.	Hs.521212	NM_001628
1.077	MCFD2	multiple coagulation factor deficiency 2 (MCFD2), mRNA.	Hs.293689	NM_139279
1.075	PIK3IP1	phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1 (PIK3IP1), mRNA.	Hs.26670	NM_052880
1.073	VEGFC	vascular endothelial growth factor C (VEGFC), mRNA.	Hs.435215	NM_005429
1.069	DUSP3	dual specificity phosphatase 3 (DUSP3), mRNA.	Hs.695925	NM_004090
1.060	DHRS7	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7 (DHRS7), mRNA.	Hs.59719	NM_016029
1.057	GGG1	germ cell associated 1 (GGG1), transcript variant 2, mRNA.	Hs.240053	NM_153823
1.051	SLC16A4	solute carrier family 16, member 4 (monocarboxylic acid transporter 5) (SLC16A4), mRNA.	Hs.351306	NM_004696
1.047	NDRG3	NDRG family member 3 (NDRG3), transcript variant 2, mRNA.	Hs.437338	NM_022477
1.047	DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase (DHCR7), mRNA.	Hs.503134	NM_001360
1.046	SC5DL	sterol-C5-desaturase (ERG3 delta-5-desaturase homolog, <i>S. cerevisiae</i>)-like (SC5DL), transcript variant 1, mRNA.	Hs.287749	NM_006918
1.045	GPR177	G protein-coupled receptor 177 (GPR177), transcript variant 1, mRNA.	Hs.647659	NM_024911
1.044	SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	Hs.487046	
1.044	BLCAP	bladder cancer associated protein (BLCAP), mRNA.	Hs.472651	NM_006698
1.044	GPBR	G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPBR), transcript variant 4, mRNA.	Hs.20961	NM_001098201
1.042	KRT34	keratin 34 (KRT34), mRNA.	Hs.296942	NM_021013
1.040	GM2A	GM2 ganglioside activator (GM2A), mRNA.	Hs.483873	NM_000405
1.040	FNDC4	fibronectin type III domain containing 4 (FNDC4), mRNA.	Hs.27836	NM_022823
1.039	HOXB5	homeobox B5 (HOXB5), mRNA.	Hs.654456	NM_002147
1.038	PIP4K2C	phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, gamma (PIP4K2C), mRNA.	Hs.144502	NM_024779
1.037	DKFZP586H2123	regeneration associated muscle protease (DKFZP586H2123), transcript variant 2, mRNA.	Hs.55044	NM_001001991
1.034	STOML1	stomatin (EPB72)-like 1 (STOML1), mRNA.	Hs.194816	NM_004809

1.033	CRYL1	crystallin, lambda 1 (CRYL1), mRNA.	Hs.370703	NM_015974
1.031	TncRNA	trophoblast-derived noncoding RNA (TncRNA) on chromosome 11.		NR_002802
1.025	ABLIM3	Actin binding LIM protein family, member 3	Hs.49688	
1.024	FAM49A	Family with sequence similarity 49, member A	Hs.467769	
1.024	SLC9A7	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 7 (SLC9A7), mRNA.	Hs.496057	NM_032591
1.023	IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6 (IFI6), transcript variant 1, mRNA.	Hs.523847	NM_002038
1.022	N4BP2L2	NEDD4 binding protein 2-like 2 (N4BP2L2), transcript variant 1, mRNA.	Hs.507680	NM_033111
1.021	SEMA6A	Sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A	Hs.156967	
1.020		CDNA FLJ30376 fis, clone BRACE2007944	Hs.545023	
1.017	SERINC1	serine incorporator 1 (SERINC1), mRNA.	Hs.146668	NM_020755
1.017	KCNMA1	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1 (KCNMA1), transcript variant 2, mRNA.	Hs.144795	NM_002247
1.017	STEAP3	STEAP family member 3 (STEAP3), transcript variant 3, mRNA.	Hs.647822	NM_001008410
1.015	SCN9A	sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha subunit (SCN9A), mRNA.	Hs.705382	NM_002977
1.014	ATP6V1A	ATPase, H+ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A	Hs.477155	
1.012	ZMAT3	zinc finger, matrin type 3 (ZMAT3), transcript variant 2, mRNA.	Hs.386299	NM_152240
1.011	SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 3, mRNA.	Hs.487046	NM_001024466
1.011	DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58 (DDX58), mRNA.	Hs.190622	NM_014314
1.008	SERINC3	serine incorporator 3 (SERINC3), transcript variant 1, mRNA.	Hs.272168	NM_006811
1.008	CKB	Creatine kinase, brain	Hs.173724	
1.007	AHCYL2	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 2 (AHCYL2), mRNA.	Hs.600789	NM_015328
1.006	SERINC2	serine incorporator 2 (SERINC2), mRNA.	Hs.270655	NM_178865
1.005	CPE	carboxypeptidase E (CPE), mRNA.	Hs.707992	NM_001873
1.005	GSTM1	Glutathione S-transferase M1	Hs.301961	
1.004	FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic) (FGF2), mRNA.	Hs.284244	NM_002006
1.002	SLC22A18	solute carrier family 22, member 18 (SLC22A18), transcript variant 1, mRNA.	Hs.50868	NM_002555
1.002	HIST1H2BG	Histone cluster 1, H2bg	Hs.591809	
1.001	PLEKHN1	pleckstrin homology domain containing, family N member 1 (PLEKHN1), mRNA.	Hs.528691	NM_032129
1.000	TMEM191A	Transmembrane protein 191A	Hs.546454	

B. Complete list of 338 downregulated genes in replicative senescence

Value	Gene	Description	UniGene	RefSeq
-1.001	TCF4	transcription factor 4 (TCF4), transcript variant 2, mRNA.	Hs.644653	NM_003199
-1.002	CENPO	Centromere protein O	Hs.467898	
-1.004	VGLL3	Vestigial like 3 (Drosophila)	Hs.435013	
-1.004	CACNA1B	calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit (CACNA1B), mRNA.	Hs.495522	NM_000718
-1.009	NASP	nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding) (NASP), transcript variant 3, mRNA.	Hs.319334	NM_152298
-1.009		CDNA FLJ11313 fis, clone PLACE1010106, highly similar to Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586M1418	Hs.633187	
-1.010	DIAPH3	diaphanous homolog 3 (Drosophila) (DIAPH3), transcript variant 2, mRNA.	Hs.283127	NM_030932
-1.011	BEX4	BEX family member 4 (BEX4), mRNA.	Hs.184736	NM_001080425
-1.011	KLHDC5	kelch domain containing 5 (KLHDC5), mRNA.	Hs.505104	NM_020782
-1.013	ELOVL2	elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 2 (ELOVL2), mRNA.	Hs.656436	NM_017770
-1.014	SAMD11	sterile alpha motif domain containing 11 (SAMD11), mRNA.	Hs.335293	NM_152486
-1.014	CRISPLD2	cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2 (CRISPLD2), mRNA.	Hs.513779	NM_031476
-1.014	DAB1	Disabled homolog 1 (Drosophila)	Hs.477370	
-1.015	PTGS1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) (PTGS1), transcript variant 2, mRNA.	Hs.201978	NM_080591
-1.017	GPSM2	G-protein signaling modulator 2 (AGS3-like, C. elegans) (GPSM2), mRNA.	Hs.584901	NM_013296
-1.020	DTYMK	deoxythymidylate kinase (thymidylate kinase) (DTYMK), mRNA.	Hs.471873	NM_012145
-1.020		CDNA FLJ30652 fis, clone DFNES2000011	Hs.592801	
-1.021	RAD54L	RAD54-like (S. cerevisiae) (RAD54L), mRNA.	Hs.706783	NM_003579
-1.021	TRPC6	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6 (TRPC6), mRNA.	Hs.159003	NM_004621
-1.022	SACS	spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (sacsin) (SACS), mRNA.	Hs.159492	NM_014363
-1.022	GINS3	GINS complex subunit 3 (Psf3 homolog) (GINS3), mRNA.	Hs.47125	NM_022770
-1.022	H2AFX	H2A histone family, member X (H2AFX), mRNA.	Hs.477879	NM_002105
-1.023	C13orf27	chromosome 13 open reading frame 27 (C13orf27), mRNA.	Hs.398111	NM_138779
-1.024	HIST2H2AA3	histone cluster 2, H2aa3 (HIST2H2AA3), mRNA.	Hs.530461	NM_003516
-1.026	CDCA4	cell division cycle associated 4 (CDCA4), transcript variant 13, mRNA.	Hs.34045	NM_017955
-1.027	LOC645561	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC645561 (LOC645561), mRNA	Hs.527211	

-1.028	DEK	DEK oncogene (DNA binding) (DEK), mRNA.	Hs.695957	NM_003472
-1.029	C1R	complement component 1, r subcomponent (C1R), mRNA.	Hs.524224	NM_001733
-1.030	FAM102B	Family with sequence similarity 102, member B	Hs.200230	
-1.031		CDNA FLJ12853 fis, clone NT2RP2003456	Hs.594569	
-1.032	QSER1	glutamine and serine rich 1 (QSER1), mRNA.	Hs.369368	NM_001076786
-1.035	LSM5	LSM5 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae) (LSM5), mRNA.	Hs.424908	NM_012322
-1.036	ECT2	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene (ECT2), mRNA.	Hs.518299	NM_018098
-1.037	POLE	polymerase (DNA directed), epsilon (POLE), mRNA.	Hs.524871	NM_006231
-1.043	DLEU2	Deleted in lymphocytic leukemia, 2	Hs.547964	
-1.043	RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide (RRM2), mRNA.	Hs.226390	NM_001034
-1.044	TCF3	transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47) (TCF3), mRNA.	Hs.371282	NM_003200
-1.045		CDNA FLJ11405 fis, clone HEMBA1000769	Hs.661311	
-1.049	CKAP2	cytoskeleton associated protein 2 (CKAP2), transcript variant 1, mRNA.	Hs.444028	NM_018204
-1.052		Clone 23636 mRNA sequence	Hs.66163	
-1.052	RFC2	replication factor C (activator 1) 2, 40kDa (RFC2), transcript variant 2, mRNA.	Hs.647062	NM_002914
-1.053	CCNI	cyclin I (CCNI), mRNA.	Hs.518827	NM_006835
-1.054	ARHGAP28	Rho GTPase activating protein 28 (ARHGAP28), transcript variant 2, mRNA.	Hs.183114	NM_030672
-1.059	SMC2	structural maintenance of chromosomes 2 (SMC2), transcript variant 3, mRNA.	Hs.119023	NM_006444
-1.060	PTMA	Prothymosin, alpha (gene sequence 28)	Hs.459927	
-1.062	SMCHD1	structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1 (SMCHD1), mRNA.	Hs.8118	NM_015295
-1.064	MCM8	minichromosome maintenance complex component 8 (MCM8), transcript variant 1, mRNA.	Hs.631506	NM_032485
-1.064	SIX1	SIX homeobox 1 (SIX1), mRNA.	Hs.633506	NM_005982
-1.066		MRNA from chromosome 5q31-33 region	Hs.387207	
-1.067	RPL36A	ribosomal protein L36a (RPL36A), mRNA.	Hs.432485	NM_021029
-1.068	CCBL2	cysteine conjugate-beta lyase 2 (CCBL2), transcript variant 3, mRNA.	Hs.481898	NM_019610
-1.068	CTDSP2	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase like 2 (CTDSP2), mRNA.	Hs.497967	NM_016396
-1.071	CDH13	cadherin 13, H-cadherin (heart) (CDH13), mRNA.	Hs.654386	NM_001257
-1.072	OIP5	Opa interacting protein 5 (OIP5), mRNA.	Hs.661645	NM_007280
-1.076	F2RL1	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1 (F2RL1), mRNA.	Hs.154299	NM_005242
-1.079	PKMYT1	Protein kinase, membrane associated tyrosine/threonine 1	Hs.77783	
-1.082	CCDC111	coiled-coil domain containing 111 (CCDC111), mRNA.	Hs.481307	NM_152683
-1.083	NCAPG2	non-SMC condensin II complex, subunit G2 (NCAPG2), mRNA.	Hs.18616	NM_017760

-1.084	RHOBTB3	Rho-related BTB domain containing 3 (RHOBTB3), mRNA.	Hs.445030	NM_014899
-1.085	TOPBP1	topoisomerase (DNA) II binding protein 1 (TOPBP1), mRNA.	Hs.53454	NM_007027
-1.085	CDC7	cell division cycle 7 homolog (S. cerevisiae) (CDC7), mRNA.	Hs.533573	NM_003503
-1.085	CDH2	cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal) (CDH2), mRNA.	Hs.464829	NM_001792
-1.090	PZP	pregnancy-zone protein (PZP), mRNA.	Hs.212838	NM_002864
-1.091	TROAP	trophinin associated protein (tastin) (TROAP), transcript variant 1, mRNA.	Hs.524399	NM_005480
-1.093	GCNE2	cyclin E2 (CCNE2), mRNA.	Hs.567387	NM_057749
-1.094	MCM4	minichromosome maintenance complex component 4 (MCM4), transcript variant 2, mRNA.	Hs.460184	NM_182746
-1.095	C13orf3	chromosome 13 open reading frame 3 (C13orf3), mRNA.	Hs.88523	NM_145061
-1.097	NUSAP1	nucleolar and spindle associated protein 1 (NUSAP1), transcript variant 2, mRNA.	Hs.615092	NM_018454
-1.101	PKIA	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha (PKIA), transcript variant 7, mRNA.	Hs.433700	NM_181839
-1.103	PTMA	prothymosin, alpha (gene sequence 28) (PTMA), transcript variant 2, mRNA.	Hs.459927	NM_002823
-1.104	PDS5B	PDS5, regulator of cohesion maintenance, homolog B (S. cerevisiae) (PDS5B), mRNA.	Hs.708081	NM_015032
-1.105	BUB1	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast) (BUB1), mRNA.	Hs.469649	NM_004336
-1.105	NR4A2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 (NR4A2), transcript variant 4, mRNA.	Hs.563344	NM_173173
-1.106	LOC1720	Dihydrofolate reductase pseudogene (psi-hd1)	Hs.169235	
-1.108	MXD3	MAX dimerization protein 3 (MXD3), mRNA.	Hs.702195	NM_031300
-1.109	FAM111B	family with sequence similarity 111, member B (FAM111B), mRNA.	Hs.186579	NM_198947
-1.109		Uncharacterized gastric protein ZA32P	Hs.675123	
-1.109	ANLN	anillin, actin binding protein (ANLN), mRNA.	Hs.62180	NM_018685
-1.110	RNASEH2B	ribonuclease H2, subunit B (RNASEH2B), mRNA.	Hs.306291	NM_024570
-1.111	CHRM2	cholinergic receptor, muscarinic 2 (CHRM2), transcript variant 8, mRNA.	Hs.535891	NM_001006629
-1.112		CDNA FLJ12196 fis, clone MAMMA1000867	Hs.659733	
-1.115	GDCA7L	cell division cycle associated 7-like (GDCA7L), mRNA.	Hs.520245	NM_018719
-1.117	RACGAP1P	Rac GTPase activating protein 1 pseudogene	Hs.650500	
-1.124	MYLK	myosin light chain kinase (MYLK), transcript variant 7, mRNA.	Hs.556600	NM_053031
-1.125	NEK2	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2 (NEK2), mRNA.	Hs.153704	NM_002497
-1.127	MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate (MARCKS), mRNA.	Hs.519909	NM_002356
-1.128	SMC2	structural maintenance of chromosomes 2 (SMC2), transcript variant 3, mRNA.	Hs.119023	NM_006444
-1.128	CENPJ	centromere protein J (CENPJ), mRNA.	Hs.513379	NM_018451
-1.129	PSRC1	proline/serine-rich coiled-coil 1 (PSRC1), transcript variant 2, mRNA.	Hs.405925	NM_001005290
-1.129	KIF23	kinesin family member 23 (KIF23), transcript variant 2, mRNA.	Hs.270845	NM_004856

-1.130	SHCBP1	SHC SH2-domain binding protein 1 (SHCBP1), mRNA.	Hs.123253	NM_024745
-1.130	ZWILCH	Zwisch, kinetochore associated, homolog (Drosophila) (ZWILCH), transcript variant 1, mRNA.	Hs.21331	NM_017975
-1.132	RSBN1L	CDNA clone IMAGE:4791585	Hs.72451	
-1.133	LMNB2	lamin B2 (LMNB2), mRNA.	Hs.538286	NM_032737
-1.133	RACGAP1	Rac GTPase activating protein 1 (RACGAP1), mRNA.	Hs.708122	NM_013277
-1.133	TCF4	transcription factor 4 (TCF4), transcript variant 2, mRNA.	Hs.644653	NM_003199
-1.134	POLA1	polymerase (DNA directed), alpha 1 (POLA1), mRNA.	Hs.567319	NM_016937
-1.140	SGK1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1 (SGK1), mRNA.	Hs.510078	NM_005627
-1.140	H2AFZ	H2A histone family, member Z (H2AFZ), mRNA.	Hs.119192	NM_002106
-1.142	CDCA3	cell division cycle associated 3 (CDCA3), mRNA.	Hs.524216	NM_031299
-1.143	DUT	deoxyuridine triphosphatase (DUT), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 3, mRNA.	Hs.527980	NM_001025249
-1.144	KITLG	KIT ligand (KITLG), transcript variant b, mRNA.	Hs.1048	NM_000899
-1.145	CCDC109B	coiled-coil domain containing 109B (CCDC109B), mRNA.	Hs.234149	NM_017918
-1.147	EXOSC9	exosome component 9 (EXOSC9), transcript variant 2, mRNA.	Hs.91728	NM_005033
-1.147	SMCHD1	structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1 (SMCHD1), mRNA.	Hs.8118	NM_015295
-1.156	FAM83D	family with sequence similarity 83, member D (FAM83D), mRNA.	Hs.472716	NM_030919
-1.157	MEIS1	Meis homeobox 1 (MEIS1), mRNA.	Hs.526754	NM_002398
-1.158	E2F8	E2F transcription factor 8 (E2F8), mRNA.	Hs.523526	NM_024680
-1.161	MME	membrane metallo-endopeptidase (MME), transcript variant 1bis, mRNA.	Hs.307734	NM_007287
-1.163	IL11	interleukin 11 (IL11), mRNA.	Hs.467304	NM_000641
-1.164	C10orf119	chromosome 10 open reading frame 119 (C10orf119), mRNA.	Hs.124246	NM_024834
-1.165	LOC389831	CDNA: FLJ23285 fis, clone HEP09071	Hs.389638	
-1.167	CENPK	centromere protein K (CENPK), mRNA.	Hs.529778	NM_022145
-1.169	BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin) (BIRC5), transcript variant 2, mRNA.	Hs.514527	NM_001012270
-1.171	ST3GAL1	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1	Hs.584803	
-1.171	ELN	elastin (supravalvular aortic stenosis, Williams-Beuren syndrome) (ELN), transcript variant 2, mRNA.	Hs.647061	NM_001081752
-1.174	CENPH	centromere protein H (CENPH), mRNA.	Hs.631967	NM_022909
-1.174	LMNB2	Lamin B2		
-1.175	KNTC1	kinetochore associated 1 (KNTC1), mRNA.	Hs.300559	NM_014708
-1.175	CDCA2	cell division cycle associated 2 (CDCA2), mRNA.	Hs.33366	NM_152562
-1.176	FBXO4	F-box protein 4 (FBXO4), transcript variant 1, mRNA.	Hs.165575	NM_012176
-1.177	COLEC10	collectin sub-family member 10 (C-type lectin) (COLEC10), mRNA.	Hs.176615	NM_006438

-1.181	SPAG5	sperm associated antigen 5 (SPAG5), mRNA.	Hs.514033	NM_006461
-1.183	STOX2	storkhead box 2 (STOX2), mRNA.	Hs.696657	NM_020225
-1.184	PCOLCE	procollagen C-endopeptidase enhancer (PCOLCE), mRNA.	Hs.202097	NM_002593
-1.185	CENPN	centromere protein N (CENPN), transcript variant 2, mRNA.	Hs.55028	NM_001100624
-1.187	HSPA2	heat shock 70kDa protein 2 (HSPA2), mRNA.	Hs.432648	NM_021979
-1.189	DNA2	DNA replication helicase 2 homolog (yeast) (DNA2), mRNA.	Hs.532446	NM_001080449
-1.193	GREM1	gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis) (GREM1), mRNA.	Hs.40098	NM_013372
-1.196	FERMT2	fermitin family homolog 2 (Drosophila) (FERMT2), mRNA.	Hs.509343	NM_006832
-1.201	SALL1	sal-like 1 (Drosophila) (SALL1), mRNA.	Hs.135787	NM_002968
-1.202	CDC25A	cell division cycle 25 homolog A (S. pombe) (CDC25A), transcript variant 2, mRNA.	Hs.437705	NM_201567
-1.205	CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2 (CKS2), mRNA.	Hs.83758	NM_001827
-1.209	PRKD3	protein kinase D3 (PRKD3), mRNA.	Hs.696257	NM_005813
-1.210	FST	folliculin (FST), transcript variant FST317, mRNA.	Hs.9914	NM_006350
-1.211	C13orf15	chromosome 13 open reading frame 15 (C13orf15), mRNA.	Hs.507866	NM_014059
-1.214	ARHGAP11A	Rho GTPase activating protein 11A (ARHGAP11A), transcript variant 1, mRNA.	Hs.591130	NM_014783
-1.216	NCAPH2	non-SMC condensin II complex, subunit H2 (NCAPH2), transcript variant 2, mRNA.	Hs.180903	NM_152299
-1.220	PDGFD	platelet derived growth factor D (PDGFD), transcript variant 2, mRNA.	Hs.352298	NM_033135
-1.221	MMD	monocyte to macrophage differentiation-associated (MMD), mRNA.	Hs.463483	NM_012329
-1.223	UBE2T	ubiquitin-conjugating enzyme E2T (putative) (UBE2T), mRNA.	Hs.5199	NM_014176
-1.224	ATP2B1	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 1 (ATP2B1), transcript variant 2, mRNA.	Hs.506276	NM_001682
-1.224	HIST1H2AL	histone cluster 1, H2a1 (HIST1H2AL), mRNA.	Hs.233568	NM_003511
-1.228	H2AFV	H2A histone family, member V (H2AFV), transcript variant 2, mRNA.	Hs.488189	NM_138635
-1.228	HMMR	hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM) (HMMR), transcript variant 2, mRNA.	Hs.72550	NM_012485
-1.231	CLEC14A	C-type lectin domain family 14, member A	Hs.525307	
-1.234	GDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1) (CDKN1B), mRNA.	Hs.238990	NM_004064
-1.236	CENPQ	centromere protein Q (CENPQ), mRNA.	Hs.88663	NM_018132
-1.238	CENPA	centromere protein A (CENPA), transcript variant 2, mRNA.	Hs.1594	NM_001042426
-1.240	MCM6	minichromosome maintenance complex component 6 (MCM6), mRNA.	Hs.444118	NM_005915
-1.242	SERPINH1	serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1) (SERPINH1), mRNA.	Hs.596449	NM_001235
-1.242	RBBP8	retinoblastoma binding protein 8 (RBBP8), transcript variant 3, mRNA.	Hs.546282	NM_203292
-1.247	CCDC45	coiled-coil domain containing 45 (CCDC45), mRNA.	Hs.569713	NM_138363

-1.248	GINS2	GINS complex subunit 2 (Psf2 homolog) (GINS2), mRNA.	Hs.433180	NM_016095
-1.250	PLK1	polo-like kinase 1 (Drosophila) (PLK1), mRNA.	Hs.592049	NM_005030
-1.250	NTN4	netrin 4 (NTN4), mRNA.	Hs.201034	NM_021229
-1.252	HELLS	helicase, lymphoid-specific (HELLS), mRNA.	Hs.655830	NM_018063
-1.254	MTHFD2	methylentetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase (MTHFD2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mRNA.	Hs.469030	NM_006636
-1.255	EDNRB	endothelin receptor type B (EDNRB), transcript variant 1, mRNA.	Hs.82002	NM_000115
-1.255	LDB2	LIM domain binding 2 (LDB2), mRNA.	Hs.23748	NM_001290
-1.255	ATAD2	ATPase family, AAA domain containing 2 (ATAD2), mRNA.	Hs.370834	NM_014109
-1.256	GRK5	G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5), mRNA.	Hs.524625	NM_005308
-1.256	C14orf145	chromosome 14 open reading frame 145 (C14orf145), mRNA.	Hs.162889	NM_152446
-1.256	PHF10	PHD finger protein 10 (PHF10), transcript variant 2, mRNA.	Hs.435933	NM_133325
-1.258	WDR76	WD repeat domain 76 (WDR76), mRNA.	Hs.250154	NM_024908
-1.259	C12orf48	chromosome 12 open reading frame 48 (C12orf48), mRNA.	Hs.330663	NM_017915
-1.260	LBH	limb bud and heart development homolog (mouse) (LBH), mRNA.	Hs.567598	NM_030915
-1.260	GENPM	centromere protein M (GENPM), transcript variant 3, mRNA.	Hs.208912	NM_001110215
-1.261	MKI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 (MKI67), mRNA.	Hs.80976	NM_002417
-1.261	SLC7A2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2 (SLC7A2), transcript variant 2, mRNA.	Hs.448520	NM_001008539
-1.264	TPX2	TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis) (TPX2), mRNA.	Hs.244580	NM_012112
-1.265	PRRX2	paired related homeobox 2 (PRRX2), mRNA.	Hs.660115	NM_016307
-1.277	TNFSF4	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4 (tax-transcriptionally activated glycoprotein 1, 34kDa) (TNFSF4), mRNA.	Hs.181097	NM_003326
-1.280	KIF22	kinesin family member 22 (KIF22), mRNA.	Hs.613351	NM_007317
-1.281	SGOL2	shugoshin-like 2 (S. pombe) (SGOL2), mRNA.	Hs.655182	NM_152524
-1.283	TCF21	transcription factor 21 (TCF21), transcript variant 2, mRNA.	Hs.78061	NM_003206
-1.283	GREM2	gremlin 2, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis) (GREM2), mRNA.	Hs.98206	NM_022469
-1.289	DEPDC1	DEP domain containing 1 (DEPDC1), transcript variant 2, mRNA.	Hs.445098	NM_017779
-1.290	EMILIN2	elastin microfibril interfacer 2 (EMILIN2), mRNA.	Hs.532815	NM_032048
-1.292	FOXM1	forkhead box M1 (FOXM1), transcript variant 3, mRNA.	Hs.239	NM_202003
-1.297	ZNF524	zinc finger protein 524 (ZNF524), mRNA.	Hs.440291	NM_153219
-1.298	SPINK2	serine peptidase inhibitor, Kazal type 2 (acrosin-trypsin inhibitor) (SPINK2), mRNA.	Hs.98243	NM_021114
-1.301	COL3A1	Collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)	Hs.443625	

-1.303	LRRCC1	leucine rich repeat and coiled-coil domain containing 1 (LRRCC1), transcript variant 2, mRNA.	Hs.193115	NM_001077501
-1.303	CBS	cystathionine-beta-synthase (CBS), mRNA.	Hs.533013	NM_000071
-1.307	TMPO	thymopoietin (TMPO), transcript variant 1, mRNA.	Hs.11355	NM_003276
-1.308	PEL12	pellino homolog 2 (Drosophila) (PEL12), mRNA.	Hs.657926	NM_021255
-1.308		CDNA FLJ11381 fis, clone HEMBA1000501	Hs.463677	
-1.310	OLFM2	olfactomedin 2 (OLFM2), mRNA.	Hs.169743	NM_058164
-1.311	PBK	PDZ binding kinase (PBK), mRNA.	Hs.104741	NM_018492
-1.311		CDNA FLJ20134 fis, clone COL06604	Hs.675416	
-1.311	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 (CYP1B1), mRNA.	Hs.154654	NM_000104
-1.312	CDKN2C	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4) (CDKN2C), transcript variant 2, mRNA.	Hs.525324	NM_078626
-1.318	RPS6KA2	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2 (RPS6KA2), transcript variant 2, mRNA.	Hs.655277	NM_001006932
-1.319	KIAA1524	KIAA1524 (KIAA1524), mRNA.	Hs.591308	NM_020890
-1.322	KIF11	kinesin family member 11 (KIF11), mRNA.	Hs.8878	NM_004523
-1.331	MEF2A	Myocyte enhancer factor 2A	Hs.268675	
-1.332	THBS2	Thrombospondin 2	Hs.371147	
-1.332	LUM	lumican (LUM), mRNA.	Hs.406475	NM_002345
-1.333	MYH10	myosin, heavy chain 10, non-muscle (MYH10), mRNA.	Hs.16355	NM_005964
-1.337	ATAD2	ATPase family, AAA domain containing 2 (ATAD2), mRNA.	Hs.370834	NM_014109
-1.337	TSPAN12	tetraspanin 12 (TSPAN12), mRNA.	Hs.16529	NM_012338
-1.338	TNFAIP6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6 (TNFAIP6), mRNA.	Hs.437322	NM_007115
-1.340	C1orf112	chromosome 1 open reading frame 112 (C1orf112), mRNA.	Hs.443551	NM_018186
-1.342	HMGB1	high-mobility group box 1 (HMGB1), mRNA.	Hs.434102	NM_002128
-1.350	KLHL23	Kelch-like 23 (Drosophila)	Hs.655150	
-1.351	PBX1	Pre-B-cell leukemia homeobox 1	Hs.654412	
-1.354	RPS6KA2	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2 (RPS6KA2), transcript variant 2, mRNA.	Hs.655277	NM_001006932
-1.354	CCNB2	cyclin B2 (CCNB2), mRNA.	Hs.194698	NM_004701
-1.355	COL4A1	collagen, type IV, alpha 1 (COL4A1), mRNA.	Hs.17441	NM_001845
-1.356		Human DNA sequence from clone 170F5 on chromosome Xq22.3-24. Contains an HMG1 (high-mobility group (
-1.359	PRIM1	primase, DNA, polypeptide 1 (49kDa) (PRIM1), mRNA.	Hs.534339	NM_000946
-1.359	MCM10	minichromosome maintenance complex component 10 (MCM10), transcript variant 2, mRNA.	Hs.198363	NM_018518
-1.359		CDNA FLJ25399 fis, clone TST02783	Hs.511432	
-1.360	CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), mRNA.	Hs.303649	NM_002982

-1.361	ARL5B	ADP-ribosylation factor-like 5B (ARL5B), mRNA.	Hs.25362	NM_178815
-1.366	NCAPG	non-SMC condensin I complex, subunit G (NCAPG), mRNA.	Hs.567567	NM_022346
-1.367	GMNN	geminin, DNA replication inhibitor (GMNN), mRNA.	Hs.234896	NM_015895
-1.368	DLG7	discs, large homolog 7 (Drosophila) (DLG7), mRNA.	Hs.77695	NM_014750
-1.369	TCF19	transcription factor 19 (SC1) (TCF19), transcript variant 2, mRNA.	Hs.584807	NM_001077511
-1.378	SOCS1	suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1), mRNA.	Hs.50640	NM_003745
-1.382	KIF2C	kinesin family member 2C (KIF2C), mRNA.	Hs.69360	NM_006845
-1.384		CDNA FLJ10230 fis, clone HEMBB1000215	Hs.655535	
-1.384		CDNA FLJ13419 fis, clone PLACE1002115	Hs.656728	
-1.391		Human DNA sequence from clone 38C16 on chromosome 6q22.33-24.1. Contains GAPD (glyceraldehyde 3-phos		
-1.399	TMEM155	transmembrane protein 155 (TMEM155), mRNA.	Hs.27524	NM_152399
-1.404	MELK	maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK), mRNA.	Hs.184339	NM_014791
-1.412	HIST1H4A	Histone cluster 1, H4a	Hs.248178	
-1.414	LOC91461	hypothetical protein BC007901 (LOC91461), mRNA.	Hs.408542	NM_138370
-1.416	NNMT	nicotinamide N-methyltransferase (NNMT), mRNA.	Hs.503911	NM_006169
-1.417	HELLS	Helicase, lymphoid-specific	Hs.655830	
-1.418	SGCE	sarcoglycan, epsilon (SGCE), transcript variant 2, mRNA.	Hs.371199	NM_003919
-1.421	CEP55	centrosomal protein 55kDa (CEP55), mRNA.	Hs.14559	NM_018131
-1.432	PRC1	protein regulator of cytokinesis 1 (PRC1), transcript variant 3, mRNA.	Hs.567385	NM_199414
-1.433	MPHOSPH1	M-phase phosphoprotein 1 (MPHOSPH1), mRNA.	Hs.240	NM_016195
-1.436	PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide (PDGFRA), mRNA.	Hs.74615	NM_006206
-1.437	CDKN3	cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase) (CDKN3), mRNA.	Hs.84113	NM_005192
-1.438	RFC4	replication factor C (activator 1) 4, 37kDa (RFC4), transcript variant 2, mRNA.	Hs.518475	NM_181573
-1.458	PDE7B	phosphodiesterase 7B (PDE7B), mRNA.	Hs.652367	NM_018945
-1.458	TNFRSF11B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin) (TNFRSF11B), mRNA.	Hs.81791	NM_002546
-1.459	PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B (PPAP2B), transcript variant 2, mRNA.	Hs.708050	NM_177414
-1.465	CENPE	centromere protein E, 312kDa (CENPE), mRNA.	Hs.75573	NM_001813
-1.466	MCM3	minichromosome maintenance complex component 3 (MCM3), mRNA.	Hs.179565	NM_002388
-1.467	SCARA3	scavenger receptor class A, member 3 (SCARA3), transcript variant 1, mRNA.	Hs.128856	NM_016240
-1.467	MLF1IP	MLF1 interacting protein (MLF1IP), mRNA.	Hs.575032	NM_024629
-1.470	KIFC1	kinesin family member C1 (KIFC1), mRNA.	Hs.436912	NM_002263

-1.481	PBX1	pre-B-cell leukemia homeobox 1 (PBX1), mRNA.	Hs.654412	NM_002585
-1.481	NETO2	neuroligin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2 (NETO2), mRNA.	Hs.444046	NM_018092
-1.482	PHLDB2	pleckstrin homology-like domain, family B, member 2 (PHLDB2), mRNA.	Hs.477114	NM_145753
-1.484	FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS), mRNA.	Hs.25647	NM_005252
-1.484	EXO1	exonuclease 1 (EXO1), transcript variant 3, mRNA.	Hs.498248	NM_003686
-1.490	CTSK	cathepsin K (CTSK), mRNA.	Hs.632466	NM_000396
-1.491		CDNA FLJ10176 fis, clone HEMBA1004074	Hs.675448	
-1.500	HIST1H3J	histone cluster 1, H3j (HIST1H3J), mRNA.	Hs.484990	NM_003535
-1.503	C5orf13	chromosome 5 open reading frame 13 (C5orf13), mRNA.	Hs.36053	NM_004772
-1.507	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta (ACTA2), mRNA.	Hs.500483	NM_001613
-1.511	RARRES2	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2 (RARRES2), mRNA.	Hs.647064	NM_002889
-1.511	CENPF	centromere protein F, 350/400ka (mitosin) (CENPF), mRNA.	Hs.497741	NM_016343
-1.519	KIF15	kinesin family member 15 (KIF15), mRNA.	Hs.658939	NM_020242
-1.524	HNMT	histamine N-methyltransferase (HNMT), transcript variant 1, mRNA.	Hs.42151	NM_006895
-1.526	RASSF2	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 2 (RASSF2), transcript variant 2, mRNA.	Hs.631504	NM_170774
-1.533	LBR	lamin B receptor (LBR), transcript variant 2, mRNA.	Hs.435166	NM_194442
-1.542	BUB1B	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast) (BUB1B), mRNA.	Hs.631699	NM_001211
-1.545	BRCA2	breast cancer 2, early onset (BRCA2), mRNA.	Hs.34012	NM_000059
-1.550	ASNS	asparagine synthetase (ASNS), transcript variant 2, mRNA.	Hs.489207	NM_001673
-1.557	RGS2	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa (RGS2), mRNA.	Hs.78944	NM_002923
-1.559	ITGA1	integrin, alpha 1 (ITGA1), mRNA.	Hs.696076	NM_181501
-1.566	KIF18A	kinesin family member 18A (KIF18A), mRNA.	Hs.301052	NM_031217
-1.569	C18orf24	chromosome 18 open reading frame 24 (C18orf24), transcript variant 2, mRNA.	Hs.134726	NM_145060
-1.575	ADAMTS7	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 7 (ADAMTS7), mRNA.	Hs.16441	NM_014272
-1.576	CTGF	connective tissue growth factor (CTGF), mRNA.	Hs.591346	NM_001901
-1.577	TGFB1	transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa) (TGFB1), mRNA.	Hs.494622	NM_004612
-1.582	USP1	ubiquitin specific peptidase 1 (USP1), transcript variant 3, mRNA.	Hs.35086	NM_001017416
-1.586	ZNF22	zinc finger protein 22 (KOX 15) (ZNF22), mRNA.	Hs.462693	NM_006963
-1.593	C14orf106	chromosome 14 open reading frame 106 (C14orf106), mRNA.	Hs.437941	NM_018353
-1.625	ACTG2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric (ACTG2), mRNA.	Hs.516105	NM_001615
-1.628	KIF14	kinesin family member 14 (KIF14), mRNA.	Hs.3104	NM_014875
-1.638	DLL4	delta-like 4 (Drosophila) (DLL4), mRNA.	Hs.511076	NM_019074

-1.651	LMCD1	LIM and cysteine-rich domains 1 (LMCD1), mRNA.	Hs.475353	NM_014583
-1.651	FBXO5	F-box protein 5 (FBXO5), mRNA.	Hs.708125	NM_012177
-1.657	HIST1H2AJ	histone cluster 1, H2aj (HIST1H2AJ), mRNA.	Hs.406691	NM_021066
-1.666	CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase) (CASP1), transcript variant epsilon, mRNA.	Hs.2490	NM_033295
-1.676	IL1R1	interleukin 1 receptor, type I (IL1R1), mRNA.	Hs.701982	NM_000877
-1.681	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3), transcript variant 2, mRNA.	Hs.450230	NM_000598
-1.682	COLEC12	collectin sub-family member 12 (COLEC12), mRNA.	Hs.464422	NM_130386
-1.692	HMGB2	high-mobility group box 2 (HMGB2), mRNA.	Hs.434953	NM_002129
-1.693	GPC6	glypican 6 (GPC6), mRNA.	Hs.444329	NM_005708
-1.707	C11orf82	chromosome 11 open reading frame 82 (C11orf82), mRNA.	Hs.165607	NM_145018
-1.707	ARHGAP28	Rho GTPase activating protein 28 (ARHGAP28), transcript variant 1, mRNA.	Hs.183114	NM_001010000
-1.718	SLFN11	schlafen family member 11 (SLFN11), transcript variant 5, mRNA.	Hs.462829	NM_152270
-1.720	DSCC1	defective in sister chromatid cohesion 1 homolog (S. cerevisiae) (DSCC1), mRNA.	Hs.315167	NM_024094
-1.721	PLK4	polo-like kinase 4 (Drosophila) (PLK4), mRNA.	Hs.172052	NM_014264
-1.750	TGFBR1	transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa) (TGFBR1), mRNA.	Hs.494622	NM_004612
-1.755	KCNK2	potassium channel, subfamily K, member 2 (KCNK2), transcript variant 2, mRNA.	Hs.497745	NM_014217
-1.763	ID4	inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein (ID4), mRNA.	Hs.519601	NM_001546
-1.779	KLF9	Kruppel-like factor 9 (KLF9), mRNA.	Hs.150557	NM_001206
-1.782	HIST1H1D	histone cluster 1, H1d (HIST1H1D), mRNA.	Hs.136857	NM_005320
-1.789	C9orf19	chromosome 9 open reading frame 19 (C9orf19), mRNA.	Hs.493819	NM_022343
-1.808	TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa (TOP2A), mRNA.	Hs.156346	NM_001067
-1.810	SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2), mRNA.	Hs.485572	NM_003877
-1.813	NUF2	NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae) (NUF2), transcript variant 2, mRNA.	Hs.651950	NM_031423
-1.815	PCDH18	protocadherin 18 (PCDH18), mRNA.	Hs.591691	NM_019035
-1.827	SLC2A5	solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5 (SLC2A5), mRNA.	Hs.530003	NM_003039
-1.827	SPOCK1	Sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1	Hs.654695	
-1.845	ASPM	asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila) (ASPM), mRNA.	Hs.121028	NM_018136
-1.853	CCNA2	cyclin A2 (CCNA2), mRNA.	Hs.58974	NM_001237
-1.857	VCAN	versican (VCAN), mRNA.	Hs.695930	NM_004385
-1.882	SMC4	structural maintenance of chromosomes 4 (SMC4), transcript variant 2, mRNA.	Hs.58992	NM_001002800
-1.885	ASPM	asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila) (ASPM), mRNA.	Hs.121028	NM_018136

-1.889	FAM64A	family with sequence similarity 64, member A (FAM64A), mRNA.	Hs.592116	NM_019013
-1.892	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5), mRNA.	Hs.635441	NM_000599
-1.898	PTGER2	prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa (PTGER2), mRNA.	Hs.2090	NM_000956
-1.922	EDNRA	endothelin receptor type A (EDNRA), mRNA.	Hs.183713	NM_001957
-1.934	VLDLR	very low density lipoprotein receptor (VLDLR), transcript variant 2, mRNA.	Hs.370422	NM_001018056
-1.940	COL3A1	collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant) (COL3A1), mRNA.	Hs.443625	NM_000090
-1.958	SRGN	serglycin (SRGN), mRNA.	Hs.1908	NM_002727
-1.991	TNFRSF19	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19 (TNFRSF19), transcript variant 2, mRNA.	Hs.149168	NM_148957
-2.037	CDC2	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M (CDC2), transcript variant 2, mRNA.	Hs.334562	NM_033379
-2.051	C6orf32	chromosome 6 open reading frame 32 (C6orf32), transcript variant 1, mRNA.	Hs.559459	NM_014722
-2.056	CEBPD	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta (CEBPD), mRNA.	Hs.440829	NM_005195
-2.068	C5orf23	chromosome 5 open reading frame 23 (C5orf23), mRNA.	Hs.13528	NM_024563
-2.077	NPR3	natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C (atrionatriuretic peptide receptor C) (NPR3), mRNA.	Hs.237028	NM_000908
-2.167	TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial (venous malformations, multiple cutaneous and mucosal) (TEK), mRNA.	Hs.89640	NM_000459
-2.187	DSG2	Desmoglein 2	Hs.412597	
-2.202	RAMP1	receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 1 (RAMP1), mRNA.	Hs.471783	NM_005855
-2.252	CDCA7	cell division cycle associated 7 (CDCA7), transcript variant 2, mRNA.	Hs.470654	NM_145810
-2.264	COL15A1	Collagen, type XV, alpha 1	Hs.409034	
-2.303	CSRP2	cysteine and glycine-rich protein 2 (CSRP2), mRNA.	Hs.530904	NM_001321
-2.315	TNC	tenascin C (hexabrachion) (TNC), mRNA.	Hs.143250	NM_002160
-2.388	HIST1H4C	histone cluster 1, H4c (HIST1H4C), mRNA.	Hs.46423	NM_003542
-2.420	FGL2	fibrinogen-like 2 (FGL2), mRNA.	Hs.520989	NM_006682
-2.541	GPR126	G protein-coupled receptor 126 (GPR126), transcript variant b2, mRNA.	Hs.318894	NM_001032395
-2.557	SPRY1	sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling (Drosophila) (SPRY1), transcript variant 1, mRNA.	Hs.436944	NM_005841
-2.775	KIAA1199	KIAA1199 (KIAA1199), mRNA.	Hs.459088	NM_018689
-2.861	POSTN	periostin, osteoblast specific factor (POSTN), mRNA.	Hs.136348	NM_006475
-2.890	A2M	alpha-2-macroglobulin (A2M), mRNA.	Hs.212838	NM_000014
-2.893	AREG	amphiregulin (schwannoma-derived growth factor) (AREG), mRNA.	Hs.270833	NM_001657
-3.016	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5), mRNA.	Hs.635441	NM_000599

Table S2.

A. WNT pathway

Value	Gene	Description	UniGene	RefSeq
2.440	WNT16	wingless-type MMTV integration site family, member 16 (WNT16), transcript variant 2, mRNA.	Hs.272375	NM_016087
1.947	PLCB4	phospholipase C, beta 4 (PLCB4), transcript variant 2, mRNA.	Hs.472101	NM_182797
1.934	PLCB4	phospholipase C, beta 4 (PLCB4), transcript variant 1, mRNA.	Hs.472101	NM_000933
1.738	CCND2	cyclin D2 (CCND2), mRNA.	Hs.376071	NM_001759
1.395	SFRP1	secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1), mRNA.	Hs.708003	NM_003012
1.259	WNT5B	wingless-type MMTV integration site family, member 5B (WNT5B), transcript variant 2, mRNA.	Hs.306051	NM_030775
1.156	RAC2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2) (RAC2), mRNA.	Hs.517601	NM_002872

B. Cytokines/Cytokines receptors

Value	Gene	Description	UniGene	RefSeq
1.848	TNFRSF10D	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain (TNFRSF10D), mRNA.	Hs.213467	NM_003840
1.468	TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b (TNFRSF10B), transcript variant 2, mRNA.	Hs.521456	NM_147187
1.347	TNFRSF10C	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c, decoy without an intracellular domain (TNFRSF10C), mRNA.	Hs.655801	NM_003841
1.106	IL1R2	interleukin 1 receptor, type II (IL1R2), transcript variant 2, mRNA.	Hs.25333	NM_173343
1.082	IL18	interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor) (IL18), mRNA.	Hs.83077	NM_001562
1.073	VEGFC	vascular endothelial growth factor C (VEGFC), mRNA.	Hs.435215	NM_005429

C. p53 pathway

Value	Gene	Description	UniGene	RefSeq
1.738	CCND2	cyclin D2 (CCND2), mRNA.	Hs.376071	NM_001759
1.737	CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (CDKN1A), transcript variant 1, mRNA.	Hs.370771	NM_000389
1.468	TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b (TNFRSF10B), transcript variant 2, mRNA.	Hs.521456	NM_147187
1.393	PERP	PERP, TP53 apoptosis effector (PERP), mRNA.	Hs.520421	NM_022121
1.017	STEAP3	STEAP family member 3 (STEAP3), transcript variant 3, mRNA.	Hs.647822	NM_001008410
1.012	ZMAT3	zinc finger, matrin type 3 (ZMAT3), transcript variant 2, mRNA.	Hs.386299	NM_152240

Table S3.

A. Cell cycle

Value	Gene	Description	UniGene	RefSeq
-1.079	PKMYT1	Protein kinase, membrane associated tyrosine/threonine 1	Hs.77783	
-1.085	CDC7	cell division cycle 7 homolog (S. cerevisiae) (CDC7), mRNA.	Hs.533573	NM_003503
-1.093	CCNE2	cyclin E2 (CCNE2), mRNA.	Hs.567387	NM_057749
-1.094	MCM4	minichromosome maintenance complex component 4 (MCM4), transcript variant 2, mRNA.	Hs.460184	NM_182746
-1.105	BUB1	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast) (BUB1), mRNA.	Hs.469649	NM_004336
-1.202	CDC25A	cell division cycle 25 homolog A (S. pombe) (CDC25A), transcript variant 2, mRNA.	Hs.437705	NM_201567
-1.234	CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1) (CDKN1B), mRNA.	Hs.238990	NM_004064
-1.240	MCM6	minichromosome maintenance complex component 6 (MCM6), mRNA.	Hs.444118	NM_005915
-1.250	PLK1	polo-like kinase 1 (Drosophila) (PLK1), mRNA.	Hs.592049	NM_005030
-1.312	CDKN2C	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4) (CDKN2C), transcript variant 2, mRNA.	Hs.525324	NM_078626
-1.354	CCNB2	cyclin B2 (CCNB2), mRNA.	Hs.194698	NM_004701
-1.466	MCM3	minichromosome maintenance complex component 3 (MCM3), mRNA.	Hs.179565	NM_002388
-1.542	BUB1B	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast) (BUB1B), mRNA.	Hs.631699	NM_001211
-1.853	CCNA2	cyclin A2 (CCNA2), mRNA.	Hs.58974	NM_001237
-2.037	CDC2	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M (CDC2), transcript variant 2, mRNA.	Hs.334562	NM_033379

B. Cytokines/Cytokines receptors

Value	Gene	Description	UniGene	RefSeq
-1.144	KITLG	KIT ligand (KITLG), transcript variant b, mRNA.	Hs.1048	NM_000899
-1.163	IL11	interleukin 11 (IL11), mRNA.	Hs.467304	NM_000641
-1.277	TNFSF4	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4 (tax-transcriptionally activated glycoprotein 1, 34kDa) (TNFSF4), mRNA.	Hs.181097	NM_003326
-1.360	CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), mRNA.	Hs.303649	NM_002982
-1.436	PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide (PDGFRA), mRNA.	Hs.74615	NM_006206
-1.458	TNFRSF11B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin) (TNFRSF11B), mRNA.	Hs.81791	NM_002546
-1.577	TGFBR1	transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa) (TGFBR1), mRNA.	Hs.494622	NM_004612

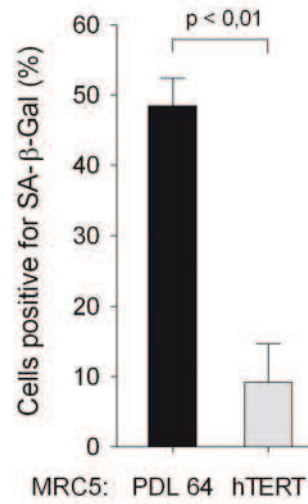
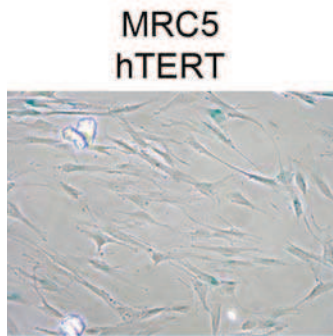
-1.676	IL1R1	interleukin 1 receptor, type I (IL1R1), mRNA.	Hs.701982	NM_000877
-1.750	TGFBR1	transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa) (TGFB1), mRNA.	Hs.494622	NM_004612
-1.991	TNFRSF19	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19 (TNFRSF19), transcript variant 2, mRNA.	Hs.149168	NM_148957

C. DNA replication

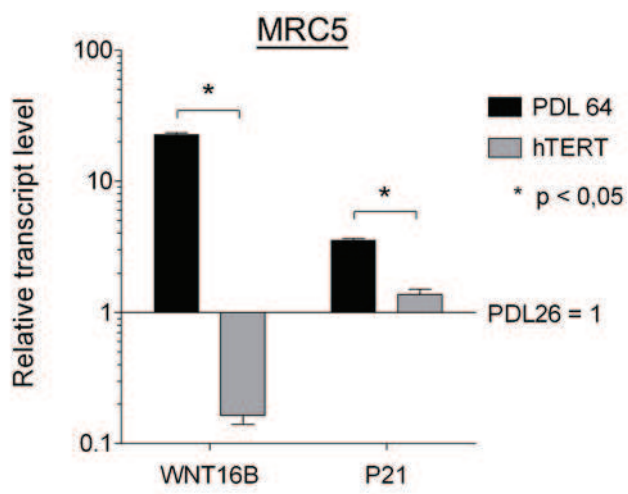
Value	Gene	Description	UniGene	RefSeq
-1.037	POLE	polymerase (DNA directed), epsilon (POLE), mRNA.	Hs.524871	NM_006231
-1.052	RFC2	replication factor C (activator 1) 2, 40kDa (RFC2), transcript variant 2, mRNA.	Hs.647062	NM_002914
-1.094	MCM4	minichromosome maintenance complex component 4 (MCM4), transcript variant 2, mRNA.	Hs.460184	NM_182746
-1.110	RNASEH2B	ribonuclease H2, subunit B (RNASEH2B), mRNA.	Hs.306291	NM_024570
-1.134	POLA1	polymerase (DNA directed), alpha 1 (POLA1), mRNA.	Hs.567319	NM_016937
-1.189	DNA2	DNA replication helicase 2 homolog (yeast) (DNA2), mRNA.	Hs.532446	NM_001080449
-1.240	MCM6	minichromosome maintenance complex component 6 (MCM6), mRNA.	Hs.444118	NM_005915
-1.359	PRIM1	primase, DNA, polypeptide 1 (49kDa) (PRIM1), mRNA.	Hs.534339	NM_000946
-1.438	RFC4	replication factor C (activator 1) 4, 37kDa (RFC4), transcript variant 2, mRNA.	Hs.518475	NM_181573
-1.466	MCM3	minichromosome maintenance complex component 3 (MCM3), mRNA.	Hs.179565	NM_002388

Figure S4

A



B



C

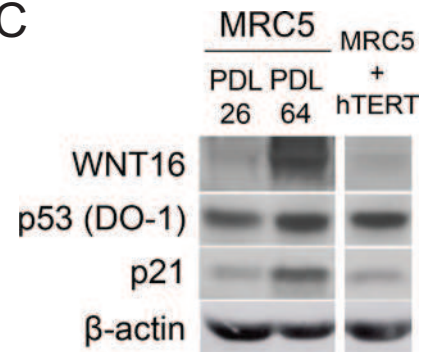
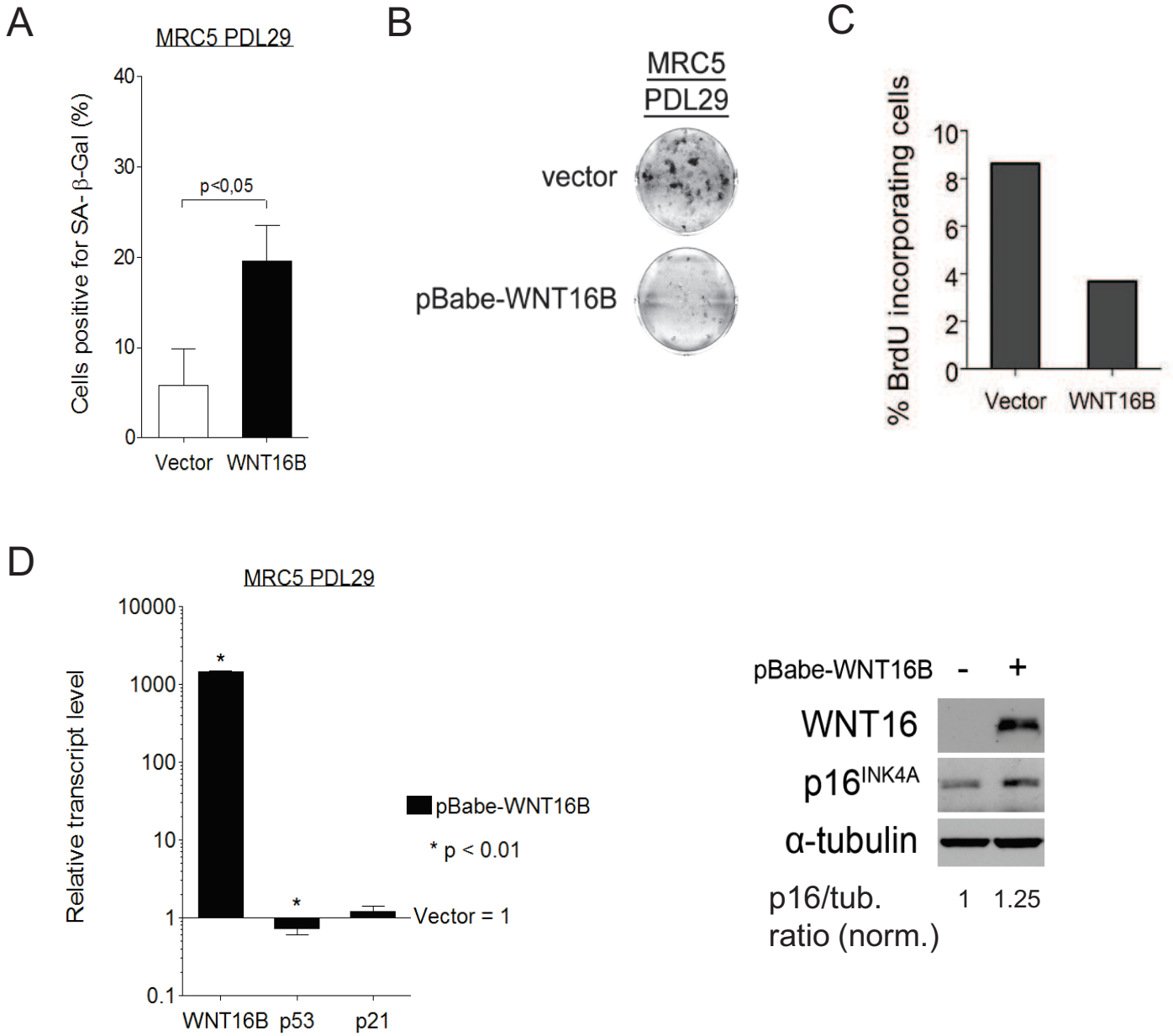


Figure S5



2. L'EXPRESSION DE WNT16 DANS LES CPNPC EST ASSOCIEE A L'EXPRESSION D'UN MARQUEUR DE LA SENESCENCE ET A UN MEILLEUR PROGNOSTIC.

Nous avons utilisé le modèle du carcinome pulmonaire non à petites cellules (CPNPC) afin d'étudier l'expression de WNT16. Pour cela, 125 prélèvements ont été analysés en immunohistochimie.

2.1. L'EXPRESSION DE WNT16 N'EST PAS ALTEREE DANS LES CPNPC

Pour chaque échantillon, un score a été attribué pour le marquage obtenu. Ce score correspond au produit de l'intensité du marquage (entre 1 et 3) et du pourcentage de cellules marquées. Notre stratégie a été d'analyser les scores moyens en fonction des paramètres physiopathologiques : sous-type histologique de la tumeur, stade tumoral, âge et sexe du patient. Dans les échantillons de poumon sain utilisés comme contrôle, le score moyen est de $158,3 \pm 32,7$. Ce score ne varie pas dans les tumeurs du stade I au stade IV ($p=0,4185$). Il n'est pas non plus influencé par le sexe ou l'âge du patient, ni par le sous-type histologique.

2.2. WNT16 EST EXPRIME DANS LE STROMA TUMORAL

Nous avons attribué un score aux cellules du stroma et analysé la corrélation entre l'expression de WNT16 dans la tumeur et dans le stroma qui l'entoure. Lorsque le score du WNT16 dans les tumeurs est inférieur à la moyenne (160), le score moyen dans le stroma est de $15,66 \pm 4,701$. Pour les tumeurs dont le score est supérieur à la moyenne, le score moyen dans le stroma est de $106,9 \pm 10,67$. De plus, il existe une corrélation linéaire entre les deux compartiments tumoraux ($p<0,0001$). Ces résultats suggèrent qu'il existe un lien entre l'expression de WNT16 dans les cellules tumorales et les cellules stromales. Plus

précisément, l'expression de WNT16 dans la tumeur semble influencer son expression dans le stroma.

2.3. L'EXPRESSION DE WNT16 DANS LES TUMEURS CORRELE AVEC LA SA-B-GAL.

Les traitements chimiothérapeutiques peuvent induire l'entrée en sénescence des cellules tumorales. Puisque tous les patients de notre étude ont reçu un traitement, et étant donné nos précédents résultats ayant montré que WNT16 était un marqueur des cellules sénescents, nous avons recherché une corrélation entre WNT16 et un autre marqueur de la sénescence cellulaire, la SA- β -Gal. Nous avons analysé dix-neuf échantillons. Parmi eux, onze sont négatifs, et le score moyen pour WNT16 est de $91,82 \pm 19,90$. Dans les huit échantillons positifs, le score moyen est de $185,0 \pm 11,34$. Il existe une corrélation entre le score de WNT16 et l'expression de la SA- β -Gal ($p=0,0019$) dans les tumeurs CPNPC. WNT16 est par conséquent un marqueur de la présence de cellules sénescents dans les tumeurs humaines.

2.4. L'EXPRESSION DE WNT16 EST ASSOCIEE A UN MEILLEUR PRONOSTIC

Finalement, nous avons étudié la survie globale des patients en fonction de l'expression de WNT16 dans les tumeurs. Lorsque le score de WNT16 est supérieur à 160, la survie des patients à cinq ans est de 46% tandis qu'elle est de 27% quand ce score est inférieur à 160. En analysant indépendamment chaque sous-type histologique, nous avons noté que cette différence semble être spécifiquement due aux carcinomes malpighiens. En effet, dans les adécarcinomes la survie globale à 5 ans est de 45% avec ou sans WNT16, tandis que dans les carcinomes malpighiens, un score élevé est associé avec un taux de survie de 52,9% ($n=29$), et un score faible avec le décès de tous les patients avant cinq ans ($n=27$). Toutefois, l'analyse statistique des courbes de survie globale ne permet pas de conclure à une différence

significative ($p=0.0768$ dans les carcinomes malpighiens). Globalement, ces résultats préliminaires suggèrent que l'expression de WNT16 pourrait servir de marqueur de bon pronostic pour les patients atteints d'un carcinome malpighien.

CONCLUSION

Via l'étude du statut de WNT16 dans les tumeurs CPNPC, nous avons identifié une association entre l'expression de WNT16, l'expression du marqueur de cellules sénescences : la SA- β -Gal, et un meilleur pronostic pour le patient, en particulier dans les tumeurs de type carcinomes malpighiens. Ces résultats confortent notre précédente étude ayant montré que WNT16 était un marqueur de la sénescence cellulaire *in vitro* et *in vivo*. D'autre part, le lien entre l'expression de WNT16 et la survie des patients atteints d'un carcinome malpighien suggère que la protéine pourrait être utilisée comme marqueur de bon pronostic.

Cette seconde partie des résultats fait l'objet d'un manuscrit intitulé ***WNT16 expression in NSCLC is associated with cellular senescence***, actuellement en préparation.

MANUSCRIT DE LA PUBLICATION N°2

**WNT16 EXPRESSION IN NSCLC IS ASSOCIATED WITH
CELLULAR SENESCENCE.**

Romuald Binet, Aurélien Vésin, Sylvie Lantuejoul, Christian
Brambilla, Denis Moro-Sibilot, Elisabeth Brambilla and Rémy
Pedoux.

WNT16 expression in NSCLC is associated with cellular senescence and a better prognosis.

Romuald BINET^{a,b}, Aurélien VESIN^d, Sylvie LANTUEJOUL^{a,b,c}, Christian BRAMBILLA^{a,b,e}, Denis MORO-SIBILOT^{a,b,e}, Elisabeth BRAMBILLA^{a,b,c}, Rémy PEDEUX^{a,b,§}

^a Molecular Basis of Lung Cancer Progression, INSERM U823, Albert Bonniot Institute, 38706 La Tronche Cedex, France

^b Joseph Fourier University, 38041 Grenoble Cedex 09, France

^c Anatomy department and Pathological Cytology, Albert Michallon Hospital, BP217, 38043 Grenoble Cedex 09, France

^d Epidemiology of Cancers and Severe Diseases INSERM U823, Albert Bonniot Institute, 38706 La Tronche Cedex, France

^e Pole of Acute Medicine, Pneumology, Albert Michalon Hospital, BP217, 38043 Grenoble Cedex 09, France

[§] Corresponding author

Tel: 33 (0)2 23 23 47 02

Fax: 33 (0)2 23 23 49 58

Email: remy.pedoux@univ-rennes1.fr

Present address

Rémy PEDEUX, INSERM U917-MICA, Faculté de médecine de Rennes, Bâtiment 2, Pièce 117, 2, avenue du Pr Léon Bernard
35043 RENNES, FRANCE

Complete correspondence address and email address to which the proofs should be sent

Rémy PEDEUX, INSERM U917-MICA, Faculté de médecine de Rennes, Bâtiment 2, Pièce 117, 2, avenue du Pr Léon Bernard
35043 RENNES, FRANCE

Summary

WNT are secreted proteins that control cell fate and cell-cell communication through the activation of multiple intracellular pathways. Unregulated activation of WNT pathways are frequently involved in tumorigenesis. WNT16 protein has recently been discovered and its function in tumorigenesis is unclear. Indeed, it was successively described as an anti-apoptotic factor, a proliferation factor and an actor of cellular senescence. We investigated WNT16 expression in lung cancer. WNT16 protein expression was analyzed by immunohistochemistry in 6 normal lung and 115 non-small cell lung carcinoma. WNT16 levels were appreciated according to the median score. In NSCLC, we compared WNT16 status in tumoural cells and in surrounding stromal fibroblasts. WNT16 expression was also correlated with the overall survival and the occurrence of cellular senescence in tumoural cells, reflected by the senescence-associated β -galactosidase activity (SA- β -Gal). WNT16 was similarly expressed in bronchial epithelia from normal lung and in NSCLC (median=160). Pathological stage, histological subtype and patient age or sex had no influence on WNT16 status. In stromal fibroblasts, WNT16 level was high (>160) in 30% of the samples, and its expression was linearly correlated between the tumor and the stroma ($p < 0.0001$). SA- β -Gal staining showed that a high WNT16 expression in tumoural cells was correlated with the occurrence of senescence in tumors ($p = 0.0019$). Finally, overall survival of patient with a high level of WNT16 (>160) was better, mostly in squamous cell carcinoma ($p = 0.0768$). Overall, our results describe a link between WNT16 expression, cellular senescence in tumors and patient outcome.

Key words (indexing terms)

WNT16, cellular senescence, NSCLC, senescence-associated β -galactosidase, survival, immunohistochemistry

Introduction

WNT are secreted proteins involved in extracellular signaling and cell-cell communication. The first gene *wnt1* was initially discovered as a proto-oncogene activated in mouse mammary tumor virus (MMTV)-induced tumors in mice (Nusse and Varmus 1982). In 2010, the human WNT family is composed of 19 identified proteins. The interaction of a WNT ligand with a membrane receptor can trigger at least four distinct pathways. The canonical WNT pathway involves the β -catenin. In absence of WNT, β -catenin is caught by the APC/Axin/GSK3 β complex, which induces its ubiquitination and subsequent degradation in the proteasome (Kimelman and Xu 2006). The interaction between a WNT ligand and the receptor complex Frizzled/LRP5-6 triggers the stabilization of β -catenin through the sequestration of Axin. β -catenin accumulates into the cytoplasm and the nucleus and interacts with a TCF/LEF transcription factor to promote the expression of genes responsible for cell proliferation and survival (Gordon and Nusse 2006). Other WNT pathways activate β -catenin-independent non-canonical pathways (Veeman, Axelrod and Moon 2003). The Planar Cell Polarity pathway (PCP) is composed of the Jun Kinase and RhoA family of G proteins. It mainly governs the cytoskeleton structure and the cell polarity (Nomachi et al. 2008). The WNT/Calcium pathway activates the phospholipase C and the NFAT transcription factor. It controls cell motility and survival (Fromigue et al. 2010, Gregory et al. 2010). Finally, WNT ligands were shown to activate the PI3K/AKT pathway which was also associated with cell survival (Binet et al. 2009). Thus, WNT proteins governs a large panel of cellular functions, and through coordinating cells, they play important functions in the development of the embryo (Nusse 2005). Moreover, WNT pathways are frequently associated with tumor development.

WNT16 is a recently identified member of the WNT family. In t(1;19) pre-B cell leukemia, the *WNT16* gene is targeted by the chimeric transcription factor E2A-PBX1 and is overexpressed. If WNT16 is disrupted, leukemia cells encounter a higher level of apoptotic cell death, suggesting that it has an anti-apoptotic function (McWhirter et al. 1999, Mazieres et al. 2005a, Casagrande, te Kronnie and Basso 2006). WNT16 was also described in basal cell carcinoma in human skin. In this model, WNT16 is a proliferation factor (Teh et al. 2007). Moreover, in fibroblasts, WNT16 expression is necessary for the onset of senescence through regulating the p53-dependent overexpression of p21 (Binet et al. 2009). Thus, the role of WNT16 may be highly dependent on cellular context. Accordingly, WNT16-activated pathway also varies upon cell type. In leukemia cells, it is associated with several markers of the β -catenin pathway. On the other hand, in keratinocytes WNT16 overexpression activates the JNK pathway. Moreover, WNT16 activates the PI3K/AKT pathway in senescent fibroblasts. Because WNT16 function appears to be highly dependent on the cellular context, it is still unclear if it acts as an oncogene or a tumor suppressor.

We previously showed that WNT16 is a marker of cellular senescence *in vitro* and *in vivo* (Binet et al. 2009). Cellular senescence is a tumor suppression mechanism characterized by an irreversible arrest in G1 phase of the cell cycle. However senescent cells remain metabolically active and become more resistant to apoptotic cell death. Senescence is encountered in response to stress that may endanger cellular behavior. Identified senescence inducers are telomere shortening or deprotection, radiation- or chemical-induced DNA damages, oxidative stress or oncogene activation (Deng, Chan and Chang 2008, Di Leonardo et al. 1994, Serrano et al. 1997). The senescence phenotype can be detected by the measurement of senescence-associated β -galactosidase activity in acidic conditions (Dimri et al. 1995). The detection of SA β Gal activity remains the most reliable and accepted

marker of senescent cells in culture and in tissues. *In vivo*, the role of senescence in counteracting the tumor development has to be proven. Accumulation of senescent cells in preneoplasia in transgenic mice expressing the activated oncogene KRasV12 suggested that senescence acted as an ultimate barrier against tumorigenesis (Collado et al. 2005). Moreover, preneoplastic cells accumulate DNA damages that are known to trigger senescence (Gorgoulis et al. 2005, Bartkova et al. 2006). Therapy-induced senescence is a recently studied strategy to stop tumor growth, because it was observed that classical chemotherapeutic agents trigger both apoptosis and senescence in tumoral cells (Schmitt et al. 2002, Roberson et al. 2005, te Poele et al. 2002). Interestingly, the occurrence of senescence in tumors of untreated patients was associated with a better response to therapy and a better progression-free survival in colorectal cancer (Haugstetter et al. 2010).

In this study, we analyzed the expression of WNT16 protein in NSCLC. WNT16 expression was correlated with a better survival of patients and the detection of senescent cells in tumor samples. Thus, we confirm here that WNT16 is a marker of senescence *in vivo*, and we associate markers of senescence with a better patient outcome.

Materials and methods

Tissue samples

One hundred and fifteen human NSCLC samples were analyzed for immunohistochemical staining. Clinicopathological details are described in table 1. Six samples of bronchus from normal lung tissue were selected within the 125 patients. Tissue samples were prepared at the time of tumor resection, then frozen and stored at -80°C until use. For histological analysis, samples were fixed in formalin and embedded in paraffin. Classification was made according to the World Health Organization International Histological Classification of Lung Tumors (Travis 2002).

Immunohistochemistry

Paraffinized tumor sections of 4µm were used for immunohistochemical analysis. Deparaffinization, blocking and antigen retrieval were performed as previously described (Ythier et al. 2009). Immunodetection of WNT16 was set up on Ventana autostainer (Ventana Medical International Inc., Illkirch, France). WNT16 antibody (H96 - Santa-Cruz Biotechnology) was used at a 1:25 dilution. Normal rabbit IgG were used as a negative control. Immunostaining were evaluated independently by two pathologists (SL and EB). A score between 0 and 300 was attributed by multiplying the percentage of stained cells (0-100%) and the intensity of staining (1, 2 or 3). For all samples, tumoral cells and stromal fibroblasts were scored independently.

Senescent-associated β-galactosidase assay

In vivo detection of SA-β-Gal activity was performed on frozen 10µm slides as previously described (Dimri et al. 1995). Briefly, slides were maintained frozen until formaldehyde

fixation. Fixed tissues were incubated for 24 hours at 37°C in a staining solution with X-Gal. Stained slides were analyzed under a light microscope and the percentage of blue cells was evaluated. Tumoral cells and stromal cells were observed as different parts. A tumor section containing more than 50% of stained cells was considered as positive.

Statistical analysis

Correlations between WNT16 score and pathological features or SA- β -Gal staining were assessed using unpaired t-test. The linear correlation between WNT16 scores in tumoral cells and stromal fibroblasts was evaluated using the Pearson test. Kaplan–Meier estimates were computed to compare the overall survival of patients according to their value regarding WNT16. The Log rank test was used to test for differences between survival curves. All tests were two-tailed.

Results

WNT16 is highly expressed in NSCLC

One hundred and fifteen samples of NSCLC and 6 normal lungs were analyzed for WNT16 expression (Table 1). The cohort was composed of 60 ADK and 55 SCC. Tumors were obtained from 83 men and 32 women. The median age was 66 years old, ranging from 41 to 86. All patients were smokers. WNT16 expression was examined by IHC in normal lung and tumors from stage I to stage IV. The antibody used in this study was previously described (Binet et al. 2009, Teh et al. 2007). As expected, WNT16 protein was detected mostly in cytoplasm, sometimes accumulating at the cell membranes (Figure 1). In all the samples, WNT16 antibody stained macrophages, lymphocytes, endothelial cells and type II hyperplastic pneumocytes. In normal lung, WNT16 expression was strong (median=160) in epithelial cells (Table 2). All the cells from the bronchial epithelium showed a similar staining. Alveolar tissue was barely stained (data not shown). Also, normal fibroblasts from the septa showed a low intensity of staining. We considered the bronchial epithelium as the reference tissue for WNT16 expression. A strong staining was also obtained in preneoplastic epithelia and in tumoral cells, whatever the pathological stage (Table 2). WNT16 expression was not significantly different between ADK and SCC. There was no correlation with the age or sex of the patient either. Thus, WNT16 expression was unchanged whatever the stage of lung cancer progression. Because the median score for all the samples was 160 and was equivalent to the mean, we considered for the following analysis two groups: low WNT16 expression (WNT16^{high}, score ≤ 160) or high WNT16 expression (WNT16^{low}, score > 160).

WNT16 expression in tumor and stroma are correlated

The tumor microenvironment, called stroma, is important for its development. Indeed, tumoural cells and stromal cells interact through direct interaction or secretion of soluble factors. Senescent fibroblasts are thought to accumulate in tumor stroma and we previously showed that WNT16 was a marker of senescence (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007, Binet et al. 2009). Thus, an individual score was given to the staining intensity of the fibroblasts from the stroma. WNT16 expression is lowest in stroma than in tumors (mean score=66). WNT16 is strongly expressed (>160) in 30% of the stromas. We compared the mean stroma score between WNT16_{low} and WNT16_{high} groups. Mean stroma score was significantly higher in the second. Moreover, we identified a linear correlation between WNT16 staining intensity in the tumor and the stroma from the same sample ($P < .0001$, Table 3). This suggests that WNT16 may stimulate its own expression in surrounding cells.

WNT16-positive tumors are enriched in senescent cells

Similarly to what we had observed in human diploid fibroblasts (Binet et al. 2009), we wondered if WNT16 expression was associated with the occurrence of senescence in lung tumors. A SA- β -Gal assay was performed on 19 frozen samples of NSCLC. Strikingly, fibroblasts from the stroma did not express SA- β -Gal. Thus we analyzed the staining of tumoral cells. A tumor was considered as positive when 50% of the tumoral cells were stained (Figure 3). Eight of the 19 samples were positive. SA- β -Gal positivity significantly correlated with WNT16 expression in tumors ($P = 0.0019$) but was independent on the stroma status (data not shown). Positive samples were both ADK and SCC (data not shown). Thus, WNT16 expression may be a marker of cellular senescence *in vivo* in NSCLC.

WNT16 expression is associated with a better overall survival rate

Additionally to its correlation with senescence, previous reports had associated WNT16 protein with the resistance to apoptosis (Mazieres et al. 2005b, Casagrande et al. 2006). Both functions suggest a role of WNT16 in tumor resistance to therapy and patient outcome. In order to test this hypothesis in NSCLC, Kaplan-Meier survival curves were generated from WNT16^{low} and WNT16^{high} groups (Figure 2). Overall survival rate in WNT16^{high} patients was higher but not statistically better than WNT16^{low} patients (P=0.2778). If we considered only the patients with a SCC, a high score for WNT16 was correlated with a better outcome (P=0.0768) whereas there was no difference in ADK. Overall survival rates were independent of the WNT16 level in the stroma (data not shown). These results indicate that although it may not affect tumor development, WNT16 expression may decrease its aggressiveness, specifically in SCC.

Discussion - Conclusion

Aberrant activation of the WNT signaling is a common feature of tumor development. However, modifications of WNT ligands themselves are infrequently described. In lung cancer, at least WNT1, WNT2 and WNT5A were shown to be highly expressed in NSCLC. WNT1 expression is associated with β -catenin, c-myc, MMP7 and Survivin, and correlates with a low apoptotic index and a high expression of the proliferation marker Ki-67 (Liu et al. 2007, Nakashima et al. 2010, Huang et al. 2008). WNT2 is overexpressed in stage I NSCLC and treatment of NSCLC cell lines with a specific antibody targeting WNT2 induces apoptosis (You et al. 2004). WNT5A expression in NSCLC correlates with a high proliferation index (Huang et al. 2005). In some cases, WNT expression is associated with tumor suppression, e.g. WNT7A. WNT7A expression is frequently lost in lung cancers, increasing cell motility through deregulation of E-cadherin (Ohira et al. 2003). In this study, we described that WNT16 is similarly expressed in normal bronchial epithelium and in non-small cell lung carcinoma. Thus, WNT16 expression appears to be independent of tumor progression. Our results are different to what was observed in the skin previously (Teh et al. 2007). WNT16 expression was described in the suprabasal layer of the skin and in the bulge region of the hair follicle, whereas the staining was low in basal cell carcinoma. More precisely, WNT16 was detected only at the periphery of the tumor. Moreover, overexpression of the protein in keratinocytes increased their growth. The author suggested that WNT16 had a role in cell proliferation. We did not observe any role of WNT16 in proliferation of cancer cells in culture (data not shown). Depending on the tumor type, WNT16 might have different functions in tumorigenesis.

WNT16 expression was correlated with senescence-associated β -galactosidase activity. We had recently shown in the lab that WNT16 was a marker of cellular senescence *in vitro* and *in vivo* (Binet et al. 2009). Our new data confirm the association between WNT16 and senescence. Thus, WNT16 expression in tumors may be a hallmark of senescence activation in tumor cells. The occurrence of senescence in tumors has been described mostly in precancerous lesions (Acosta et al. 2008, Courtois-Cox et al. 2006, Gray-Schopfer et al. 2006). This feature of senescence correlates with its role in tumor suppression, being the ultimate barrier against tumor development. Senescence in tumors is the response to oncogene activation (Collado et al. 2005) or DNA damage (d'Adda di Fagagna 2008). Here, senescent cells were detected in stage I to stage IV tumor samples. Very interestingly, WNT16 expression correlates also with patient outcome. This relationship may highlight a role of cellular senescence in tumor regression and patient survival. To our knowledge, only one study previously showed that the occurrence of senescence into colorectal tumors was predictive for a better patient outcome (Haugstetter et al. 2010). The origin of these senescent cells is unclear. They may be reminiscent cells from the precancerous stages of tumor development or newly irreversibly arrested cells in response to the pressure of other tumoral cells. Nevertheless, our and Haugstetter's studies correlate for the first time cellular senescence in tumors with the patient prognosis.

Another interesting feature is that WNT16 is a secreted protein. The discovery that it could exist a link between WNT16, the occurrence of senescence in tumors and the patient survival opens the way to a new role of WNT16 in tumor diagnosis and cancer prognosis. The difficulty of using specific markers is the accessibility of the tumors and the invasiveness of the techniques. The detection of WNT16 in human fluids, such as blood or sputum, would

help for the prediction of patient response to therapy. Thus, our study open the way to the development of a new tool for NSCLC diagnosis and prognosis.

References

- Acosta, J., A. O'Loghlen, A. Banito, M. Guijarro, A. Augert, S. Raguz, M. Fumagalli, M. Da Costa, C. Brown, N. Popov, Y. Takatsu, J. Melamed, F. d'Adda di Fagagna, D. Bernard, E. Hernando & J. Gil (2008) Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*, 133, 1006-18.
- Bartkova, J., N. Rezaei, M. Liontos, P. Karakaidos, D. Kletsas, N. Issaeva, L. Vassiliou, E. Kolettas, K. Niforou, V. Zoumpourlis, M. Takaoka, H. Nakagawa, F. Tort, K. Fugger, F. Johansson, M. Sehested, C. Andersen, L. Dyrskjot, T. Ørntoft, J. Lukas, C. Kittas, T. Helleday, T. Halazonetis, J. Bartek & V. Gorgoulis (2006) Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, 444, 633-7.
- Binet, R., D. Ythier, A. Robles, M. Collado, D. Larrieu, C. Fonti, E. Brambilla, C. Brambilla, M. Serrano, C. Harris & R. Pedoux (2009) WNT16B Is a New Marker of Cellular Senescence That Regulates p53 Activity and the Phosphoinositide 3-Kinase/AKT Pathway. *Cancer Res*.
- Campisi, J. & F. d'Adda di Fagagna (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 729-40.
- Casagrande, G., G. te Kronnie & G. Basso (2006) The effects of siRNA-mediated inhibition of E2A-PBX1 on EB-1 and Wnt16b expression in the 697 pre-B leukemia cell line. *Haematologica*, 91, 765-71.
- Collado, M., J. Gil, A. Efeyan, C. Guerra, A. Schuhmacher, M. Barradas, A. Benguría, A. Zaballos, J. Flores, M. Barbacid, D. Beach & M. Serrano (2005) Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*, 436, 642.

- Courtois-Cox, S., S. Genter Williams, E. Reczek, B. Johnson, L. McGillicuddy, C. Johannessen, P. Hollstein, M. MacCollin & K. Cichowski (2006) A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell*, 10, 459-72.
- d'Adda di Fagagna, F. (2008) Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer*, 8, 512-22.
- Deng, Y., S. Chan & S. Chang (2008) Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer*, 8, 450-8.
- Di Leonardo, A., S. Linke, K. Clarkin & G. Wahl (1994) DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev*, 8, 2540-51.
- Dimri, G., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj & O. Pereira-Smith (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9363-7.
- Fromigue, O., E. Hay, A. Barbara & P. J. Marie (2010) Essential role of nuclear factor of activated T cells (NFAT)-mediated WNT signalling in osteoblast differentiation induced by strontium ranelate. *J Biol Chem*.
- Gordon, M. & R. Nusse (2006) Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem*, 281, 22429-33.
- Gorgoulis, V. G., L. V. Vassiliou, P. Karakaidos, P. Zacharatos, A. Kotsinas, T. Liloglou, M. Venere, R. A. Dittullo, Jr., N. G. Kastrinakis, B. Levy, D. Kletsas, A. Yoneta, M. Herlyn, C. Kittas & T. D. Halazonetis (2005) Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*, 434, 907-13.

- Gray-Schopfer, V. C., S. C. Cheong, H. Chong, J. Chow, T. Moss, Z. A. Abdel-Malek, R. Marais, D. Wynford-Thomas & D. C. Bennett (2006) Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer*, 95, 496-505.
- Gregory, M. A., T. L. Phang, P. Neviani, F. Alvarez-Calderon, C. A. Eide, T. O'Hare, V. Zaberezhnyy, R. T. Williams, B. J. Druker, D. Perrotti & J. Degregori (2010) Wnt/Ca²⁺/NFAT signaling maintains survival of Ph⁺ leukemia cells upon inhibition of Bcr-Abl. *Cancer Cell*, 18, 74-87.
- Haugstetter, A. M., C. Loddenkemper, D. Lenze, J. Grone, C. Standfus, I. Petersen, B. Dorken & C. A. Schmitt (2010) Cellular senescence predicts treatment outcome in metastasised colorectal cancer. *Br J Cancer*.
- Huang, C.-L., D. Liu, S. Ishikawa, T. Nakashima, N. Nakashima, H. Yokomise, K. Kadota & M. Ueno (2008) Wnt1 overexpression promotes tumour progression in non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer*, 44, 2680-2688.
- Huang, C.-l., D. Liu, J. Nakano, S. Ishikawa, K. Kontani, H. Yokomise & M. Ueno (2005) Wnt5a Expression Is Associated With the Tumor Proliferation and the Stromal Vascular Endothelial Growth Factor--An Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*, 23, 8765-8773.
- Kimelman, D. & W. Xu (2006) beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene*, 25, 7482-91.
- Liu, D., J. Nakano, S. Ishikawa, H. Yokomise, M. Ueno, K. Kadota, M. Urushihara & C.-l. Huang (2007) Overexpression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) correlates with tumor proliferation, and a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 58, 384-391.

- Mazieres, J., L. You, B. He, Z. Xu, A. Lee, I. Mikami, F. McCormick & D. Jablons (2005a)
Inhibition of Wnt16 in human acute lymphoblastoid leukemia cells containing the
t(1;19) translocation induces apoptosis. *Oncogene*, 24, 5396-400.
- Mazieres, J., L. You, B. He, Z. Xu, A. Y. Lee, I. Mikami, F. McCormick & D. M. Jablons (2005b)
Inhibition of Wnt16 in human acute lymphoblastoid leukemia cells containing the
t(1;19) translocation induces apoptosis. *Oncogene*, 24, 5396-400.
- McWhirter, J., S. Neuteboom, E. Wancewicz, B. Monia, J. Downing & C. Murre (1999)
Oncogenic homeodomain transcription factor E2A-Pbx1 activates a novel WNT gene
in pre-B acute lymphoblastoid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11464-9.
- Nakashima, N., C. L. Huang, D. Liu, M. Ueno & H. Yokomise (2010) Intratumoral Wnt1
expression affects survivin gene expression in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol*,
37, 687-94.
- Nomachi, A., M. Nishita, D. Inaba, M. Enomoto, M. Hamasaki & Y. Minami (2008) Receptor
Tyrosine Kinase Ror2 Mediates Wnt5a-induced Polarized Cell Migration by Activating
c-Jun N-terminal Kinase via Actin-binding Protein Filamin A. *Journal of Biological
Chemistry*, 283, 27973-27981.
- Nusse, R. (2005) Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res*, 15, 28-32.
- Nusse, R. & H. E. Varmus (1982) Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus
contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 31, 99-109.
- Ohira, T., R. Gemmill, K. Ferguson, S. Kusy, J. Roche, E. Brambilla, C. Zeng, A. Baron, L. Bemis,
P. Erickson, E. Wilder, A. Rustgi, J. Kitajewski, E. Gabrielson, R. Bremnes, W. Franklin
& H. Drabkin (2003) WNT7a induces E-cadherin in lung cancer cells. *Proc Natl Acad
Sci U S A*, 100, 10429-34.

- Roberson, R. S., S. J. Kussick, E. Vallieres, S.-Y. J. Chen & D. Y. Wu (2005) Escape from Therapy-Induced Accelerated Cellular Senescence in p53-Null Lung Cancer Cells and in Human Lung Cancers. *Cancer Research*, 65, 2795-2803.
- Schmitt, C. A., J. S. Fridman, M. Yang, S. Lee, E. Baranov, R. M. Hoffman & S. W. Lowe (2002) A Senescence Program Controlled by p53 and p16INK4a Contributes to the Outcome of Cancer Therapy. *Cell*, 109, 335-346.
- Serrano, M., A. Lin, M. McCurrach, D. Beach & S. Lowe (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88, 593-602.
- te Poele, R. H., A. L. Okorokov, L. Jardine, J. Cummings & S. P. Joel (2002) DNA Damage Is Able to Induce Senescence in Tumor Cells in Vitro and in Vivo. *Cancer Research*, 62, 1876-1883.
- Teh, M., D. Blaydon, L. Ghali, V. Briggs, S. Edmunds, E. Pantazi, M. Barnes, I. Leigh, D. Kelsell & M. Philpott (2007) Role for WNT16B in human epidermal keratinocyte proliferation and differentiation. *J Cell Sci*, 120, 330-9.
- Travis, W. D. (2002) Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med*, 23, 65-81, viii.
- Veeman, M., J. Axelrod & R. Moon (2003) A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell*, 5, 367-77.
- You, L., B. He, Z. Xu, K. Uematsu, J. Mazieres, I. Mikami, N. Reguart, T. Moody, J. Kitajewski, F. McCormick & D. Jablons (2004) Inhibition of Wnt-2-mediated signaling induces programmed cell death in non-small-cell lung cancer cells. *Oncogene*, 23, 6170-4.
- Ythier, D., E. Brambilla, R. Binet, D. Nissou, A. Vesin, F. de Fraipont, D. Moro-Sibilot, S. Lantuejoul, C. Brambilla, S. Gazzeri & R. Pedeux (2009) Expression of candidate tumor suppressor gene ING2 is lost in non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer*.

Figures legends

Figure 1

WNT16 immunostaining of normal bronchial epithelia and lung cancer tissue.

A to C: WNT16 staining. D to F: Control staining with only secondary antibody.

A-B: normal lung tissue. C-D: normal lung epithelium. E-F: adenocarcinoma.

Figure 2.

A. Overall survival for patients with a high (>160) vs a low (\leq 160) level of WNT16.

B. Overall survival for patients with a SCC with a high (>160) vs a low (\leq 160) level of WNT16.

Figure 3.

SA- β -Gal staining of lung cancer tissue. A. negative sample. B. positive sample.

Table 1.

Clinicopathological features of patients.

Table 2.

Immunohistological analysis of WNT16 expression in NSCLC.

Table 3.

Correlation analysis of WNT16 expression in tumoural cells vs stromal fibroblasts

Table 4.

Correlation analysis of WNT16 expression in tumoural cells vs SA- β -Gal staining.

Figure 1

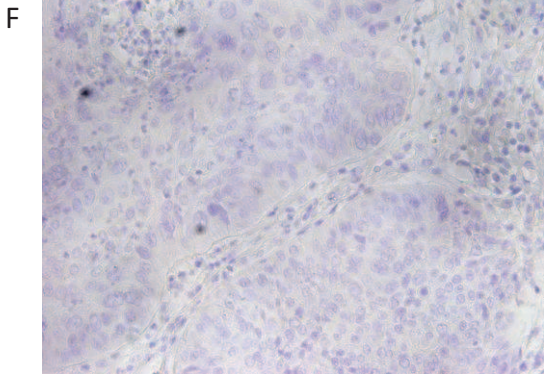
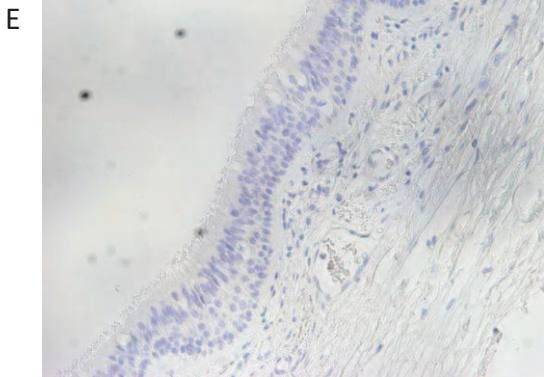
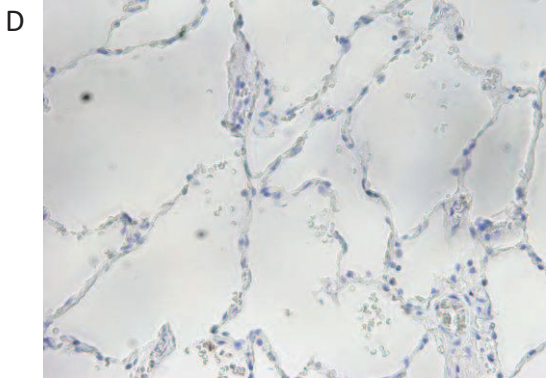
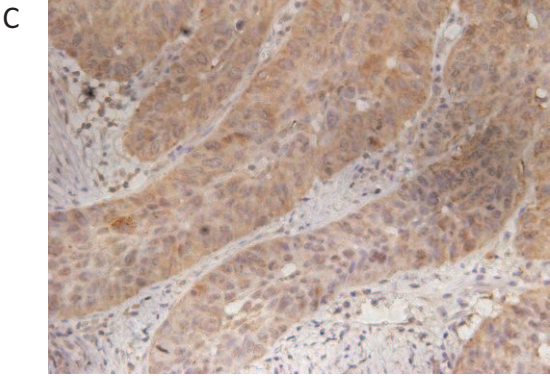
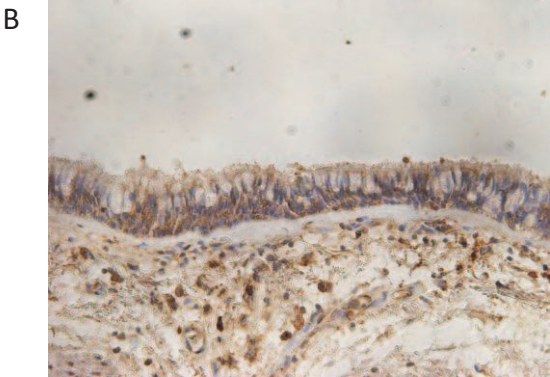
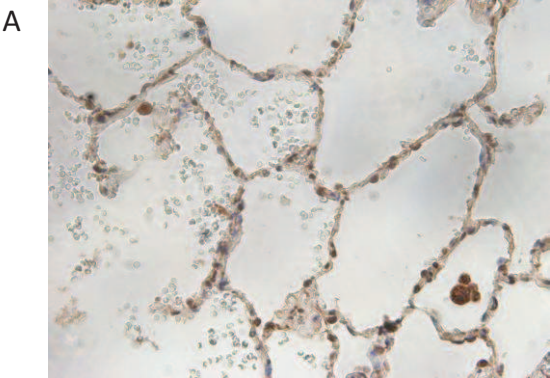


Figure 2

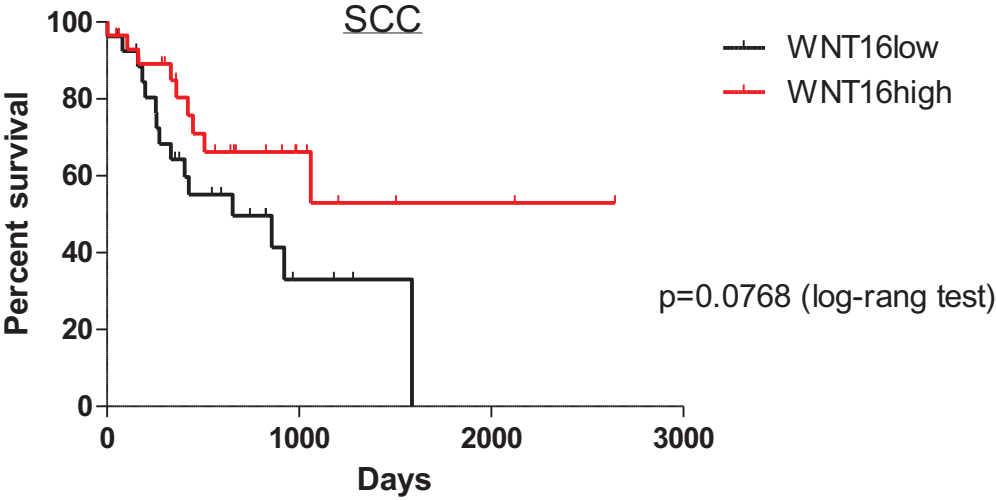
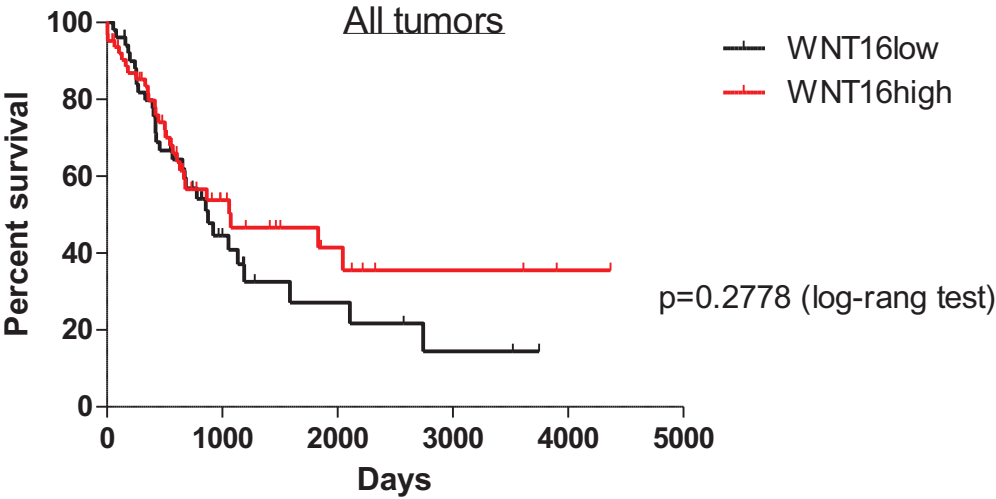


Figure 3

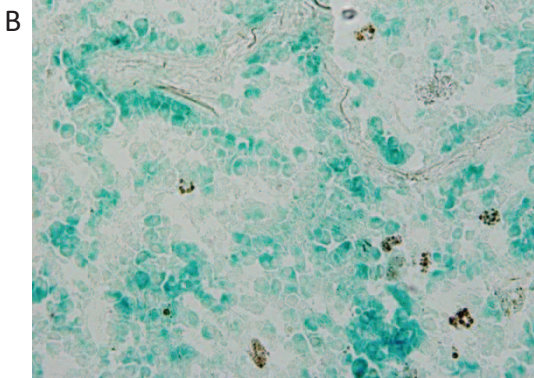
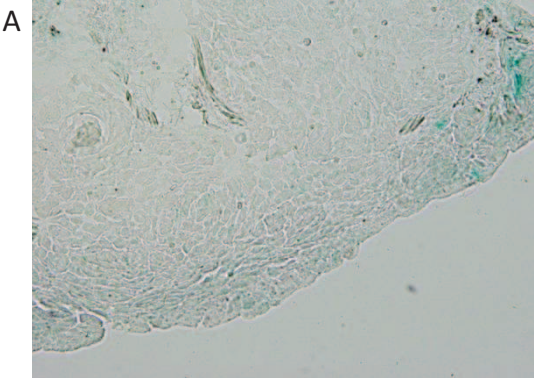


Table 1

Subgroups (# missing)		Nb of patients
Gender	Male	91
	Female	34
Pathological stage (3)	Bronchus	6
	Stage I	30
	Stage II	44
	Stage III	38
	Stage IV	10
NSCLC histological subtypes (1)	ADK	68
	SCC	56
Age	Min: 41	
	Max: 86	
	Median: 66	

Table 2

		Mean ± SEM	p*
All		159.5 ± 5.593	
Gender	Male	154.8 ± 6.793	0.4192
	Female	165.0 ± 9.714	
Pathological stage	Bronchus	158.3 ± 32.70	0.4185
	Stage I	139.3 ± 11.94	
	Stage II	155.8 ± 8.667	
	Stage III	168.9 ± 10.73	
	Stage IV	166.7 ± 17.24	
NSCLC histological subtypes	ADK	164.9 ± 7.812	0.1596
	SCC	149.1 ± 7.949	
Age	First quartile [41; 58[166.5 ± 9.129	0.1555
	Second quartile [58; 65[173.9 ± 11.11	
	Third quartile [65; 72[147.1 ± 13.20	
	Fourth quartile [72; 86]	143.2 ± 10.95	

* unpaired t-test

Table 3

	WNT16 level in tumors		p*
	low	high	
WNT16 score in stroma (Mean ± SEM)	15.66 ± 4.701	106.9 ± 10.67	<.0001

* Pearson

Table 4

	SA- β -Gal		P*
	Negative (N=11)	Positive (N=8)	
WNT16 score in tumors (Mean \pm SEM)	91.82 \pm 19.90	185.0 \pm 11.34	0.0019

* unpaired t-test

DISCUSSION

Afin de comprendre les mécanismes qui régulent l'entrée en sénescence et d'identifier des acteurs protéiques impliqués une analyse par puces à ADN de l'expression des gènes au cours de la sénescence répllicative a été réalisée. Cette expérience a mis en évidence le gène *WNT16* dont la régulation et la fonction ont été analysées dans deux systèmes : les cellules sénescents et les tumeurs bronchiques.

1. LES VOIES DE SIGNALISATION WNT NON CANONIQUES SONT ASSOCIEES A LA SENESCENCE REPLICATIVE

L'analyse des gènes surexprimés dans les fibroblastes sénescents a révélé l'amplification de plusieurs protéines appartenant aux voies de signalisation WNT non canoniques : WNT5B, qui a été montré comme activant la voie WNT/Ca²⁺ *via* l'interaction avec les récepteurs non canoniques RYK ou ROR2 (Morioka, Tanikawa et al. 2009; Lin, Baye et al. 2010) ; PLCβ4, une enzyme participant également à la voie WNT/Ca²⁺ en dégradant le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ce qui génère du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) ; enfin RAC2, une RHO GTPase ayant été associée à l'activation de la JNK qui fait partie de la voie PCP (Gu, Byrne et al. 2002). Ainsi, l'activation des voies de signalisation WNT non canoniques semble prendre part au processus de sénescence répllicative. Aucune

évidence d'une association entre les protéines de ces voies et la sénescence cellulaire n'avait été montrée jusqu'alors. Les résultats des puces à ADN proposent ainsi de nouvelles pistes d'étude des fonctions de ces voies. Tout d'abord, puisque l'activation des voies PCP et WNT/Ca²⁺ a comme principale conséquence des modifications du cytosquelette, elles pourraient être impliquées dans les changements morphologiques qui affectent les cellules sénescents (Chen, Tu et al. 2000; Nishio and Inoue 2005; Oender, Trost et al. 2008). De plus, la sénescence cellulaire étant un mécanisme de suppression tumorale, les voies WNT non canoniques pourraient participer à la mise en place de ce phénotype. Les implications connues des voies non canoniques dans la suppression tumorale concernent essentiellement WNT5A, qui active la voie PCP. En effet, dans certains cancers, les expressions respectives de WNT5A et de la β -caténine sont inversement corrélées, c'est-à-dire que l'expression de WNT5A est perdue tandis que la β -caténine est activée (Liang, Chen et al. 2003; Kremenevskaja, von Wasielewski et al. 2005). A l'inverse, la β -caténine est réprimée dans notre expérience. Dans notre cas, il est possible que le rôle des protéines des voies WNT non canoniques soit d'empêcher l'expression de certains oncogènes, comme justement la β -caténine. Quoi qu'il en soit, et quelles que soient les fonctions de ces protéines, des expériences d'inactivation par ARNi devront être réalisées afin de déterminer si chacune d'elle est nécessaire et/ou suffisante pour la mise en place de la sénescence, ou bien d'une de ses caractéristiques.

2. WNT16B EST UN NOUVEAU MARQUEUR DE LA SENESCENCE CELLULAIRE

Les résultats accumulés au cours de ma thèse ont montré une association entre WNT16B et la sénescence cellulaire dans trois systèmes : des fibroblastes humains en culture, un modèle de souris transgénique exprimant KRAS^{V12} et développant des lésions préneoplasiques et les tumeurs pulmonaires CPNPC humaines. Cette association systématique a permis de proposer

WNT16B comme nouveau marqueur des cellules sénescences. Toutefois, d'autres tests doivent être réalisés afin de le valider. En effet, un marqueur doit être spécifique, facilement détectable et quantifiable. Concernant la spécificité, très peu de données sont disponibles sur WNT16B dans la littérature. Il est impossible d'affirmer que la protéine est uniquement exprimée dans les cellules sénescences. A propos de la détectabilité, les expériences réalisées ici ont fait appel à des techniques invasives (lyse cellulaire, coupes tissulaires). Puisque WNT16B est une protéine sécrétée, il sera intéressant d'évaluer la possibilité de détecter la protéine dans les fluides biologiques. Le but d'un marqueur étant d'être utilisé comme outil clinique, la facilité de détection est un critère primordial. Enfin, la possibilité d'utilisation de WNT16B comme marqueur est soumise à la condition de pouvoir le doser dans l'organisme, et déterminer des valeurs de référence qui détermineront si la protéine est faiblement ou fortement exprimée.

L'association de WNT16B avec les fibroblastes sénescents en fait un potentiel nouvel outil clinique. En effet, la présence de cellules sénescences a été largement décrite dans les lésions précancéreuses (voir paragraphe 1.4.1.). La mesure de l'accumulation de cellules sénescences peut par conséquent être utilisée pour le diagnostic des patients à risque pour le développement d'un cancer. Cela est illustré par nos expériences utilisant les souris KRAS^{V12}. Dans ce modèle, des lésions prénéoplasiques apparaissent au niveau des poumons. Ces lésions sont riches en cellules sénescences, et WNT16B est fortement exprimé dans ces cellules. Pouvoir détecter et mesurer la quantité de cellules sénescences présente également un intérêt pour le suivi de la réponse aux traitements chimiothérapeutiques. En réalisant des tests de SA- β -Gal *in vivo* sur des coupes de tumeurs CPNPC humaines, nous avons observé une corrélation entre l'expression de WNT16 et l'expression du marqueur de sénescence. Cette association suggère que WNT16 pourrait être exprimé en réponse à l'entrée en sénescence des

cellules tumorales. Quelques études ont décrit la présence de cellules sénescents dans les tumeurs malignes après un traitement chimiothérapeutique. Dans les cancers du sein par exemple, l'expression de SA- β -Gal est détectée dans 45% des tumeurs chez les patients ayant reçu un traitement contre 10% chez les malades ayant été opérés sans chimiothérapie préalable (te Poele, Okorokov et al. 2002). Un résultat similaire a été observé dans les CPNPC de patients traités avec une combinaison de carboplatine et taxol (Roberson, Kussick et al. 2005). Dans notre étude, tous les patients ont reçu un traitement chimiothérapeutique avant d'être opérés. L'apparition de cellules sénescents exprimant WNT16B pourrait donc refléter l'efficacité du traitement, et être utilisée dans la surveillance des patients après chimiothérapie.

3. WNT16B ET AKT

Nous avons observé l'activation de la voie PI3K/AKT après surexpression de WNT16B dans les fibroblastes en division et les fibroblastes sénescents. Le mode d'activation reste à déterminer. En effet, trois types de mécanismes peuvent être impliqués : une activation directe de la PI3K par le complexe WNT16B/récepteur, une activation indirecte passant par un activateur intermédiaire, ou enfin l'inhibition d'un inhibiteur de la voie AKT. Premièrement, il est donc possible que WNT16B interagisse avec un récepteur afin de phosphoryler directement la PI3K. Par exemple, WNT5A active la voie PI3K/AKT *via* son interaction avec le récepteur Frizzled 3. Puisque nous n'avons pas identifié le récepteur de WNT16B, des expériences d'interaction *in vitro* et de co-immunoprécipitation *in vivo* entre WNT16B et les différents récepteurs possibles devront être réalisées afin de proposer un ou plusieurs candidats. Deuxièmement, l'activation pourrait être indirecte, WNT16B stimulant un facteur intermédiaire qui à son tour activera la PI3K. Cela a été observé par exemple pour WNT1.

Dans des cellules murines en condition de stress, WNT1 inhibe l'entrée en apoptose d'une manière dépendante de la voie PI3K/AKT. WNT1 stimule également l'expression des facteurs anti-apoptotiques IGF-I (*Insulin-like growth factor*) et IGF-II. Puisque l'utilisation d'IGFBP-4 (*IGF-binding protein*), qui se lie à IGF-I et IGF-II, dans le milieu de culture abolit l'activation de PI3K/AKT, il a été proposé que le rôle de WNT1 dans la résistance à l'apoptose passe par une action autocrine/paracrine d'IGF-I et IGF-II (Longo, Kennell et al. 2002). Dans notre analyse, nous n'avons identifié aucun de ces deux gènes. Néanmoins, il serait intéressant de reproduire l'expérience de Longo *et al.* dans nos conditions afin de déterminer si WNT16B stimule également IGF-I et IGF-II. Troisièmement, l'activation de la voie PI3K/AKT pourrait être régulée par la phosphatase PTEN. PTEN possède une activité antagoniste de celle de la PI3K. En effet, en déphosphorylant les phosphatidylinositols produits par la PI3K, PTEN prévient leur utilisation pour l'activation de la voie AKT (Maehama and Dixon 1998; Stambolic, Suzuki et al. 1998). Nous avons observé une diminution du niveau d'expression de PTEN au cours de la sénescence répllicative. Dans les fibroblastes en division surexprimant WNT16B, l'expression de PTEN n'est pas altérée mais le niveau de phosphorylation sur le résidu sérine 380 diminue. Cette phosphorylation a été associée à la localisation de PTEN au niveau de la membrane cytoplasmique et une diminution de son activité catalytique (Odriozola, Singh et al. 2007). Il n'est donc pas exclu que WNT16B régule l'activité de PTEN, agissant ainsi sur la voie PI3K/AKT.

Le lien fonctionnel entre les deux protéines suggère que la WNT16B joue un rôle dans les fonctions connues d'AKT. L'une des fonctions majeures de la voie PI3K/AKT est l'inhibition de l'apoptose, qui est également l'une des grandes caractéristiques des cellules sénescents. Est-ce que WNT16B pourrait jouer un rôle dans ce mécanisme ? Les données présentées dans la littérature sur WNT16B ont montré qu'elle était impliquée dans la survie cellulaire

(Mazieres, You et al. 2005; Casagrande, te Kronnie et al. 2006). En effet, Mazières *et al.* ont observé une diminution de la Survivine en utilisant un ARNi spécifique de WNT16B dans les cellules de leucémie. La Survivine est un membre de la famille des inhibiteurs de l'apoptose IAP capable d'inhiber certaines caspases (Shin, Sung et al. 2001). La voie PI3K/AKT a déjà été associée à l'activation de la Survivine afin d'inhiber l'apoptose (Fornaro, Plescia et al. 2003). WNT16B pourrait donc activer une voie AKT/Survivine afin de protéger les cellules sénescents contre la mort cellulaire par apoptose. Toutefois, les résultats des puces à ADN présentés dans cette thèse montrent une légère diminution de l'expression de la Survivine au cours de la sénescence réplivative (-1,169). Ce résultat montre que la Survivine n'est probablement pas impliquée dans la résistance à l'apoptose des fibroblastes sénescents. D'autres facteurs peuvent médier les fonctions de la voie WNT16B/PI3K/AKT. L'utilisation d'inhibiteurs de la PI3K d'une part, et de vecteurs d'expression contenant la forme dominante négative d'AKT d'autre part permettront par la suite de définir si cette voie est véritablement impliquée dans la survie des fibroblastes sénescents.

4. WNT16B ET P53

La surexpression de WNT16B est dépendante de p53. L'hypothèse la plus simple est que WNT16B est une cible transcriptionnelle de p53. Nous avons réalisé une analyse bioinformatique du promoteur de WNT16B grâce à l'algorithme p53MH (Hoh, Jin et al. 2002). Cet outil a identifié trois séquences possédant 71 à 72% de similarité avec la séquence consensus : deux décanucléotides **PurPurPurC (A/T) (T/A) GPyrPyrPyr** espacés de 0 à 13 bases (El-Deiry, Kern et al. 1992). Par comparaison, les sites situés dans les promoteurs de *WAF1* et *MDM2* possèdent 98 et 93% de similarité, respectivement. Hoh *et al.* avaient considéré que 90% était une valeur seuil raisonnable pour tester par d'autres expériences la

liaison de p53 sur le promoteur d'un gène. Ainsi, WNT16B ne semble pas être un candidat comme cible transcriptionnelle de p53. Néanmoins, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) seront nécessaires pour évaluer l'interaction de p53 au niveau du promoteur de WNT16B. De plus, nous n'avons considéré que les trois mille nucléotides précédant le point de départ de la transcription, alors qu'un site de liaison de p53 pourrait se situer en amont ou bien dans le premier intron. La seconde hypothèse est que WNT16B est régulé par l'un des gènes cibles de p53. Le seul régulateur de WNT16B connu est le facteur de transcription PBX1. A l'heure actuelle aucune donnée n'est disponible montrant que PBX1 est une cible transcriptionnelle de p53. De plus, d'autres facteurs encore inconnus régulent très certainement l'expression de WNT16B.

Nous avons également observé que la protéine WNT16B était nécessaire à l'activation de p53. Les données accumulées ne permettent pas de conclure davantage sur le mode de régulation de p53 par WNT16B. L'utilisation de cellules exprimant la télomérase d'une part, et l'observation que p53 est correctement phosphorylé sur la sérine 15 montrent que les voies de signalisation situées en amont de p53 sont correctement activées. Il semble donc que WNT16B agisse sur l'activité transcriptionnelle de p53 elle-même. Il est possible que la voie de signalisation de WNT16B régule l'activité d'un cofacteur nécessaire pour p53 : p300. p300 est une histone acétyltransférase qui forme un complexe avec p53. p300 catalyse l'acétylation de p53 sur le résidu lysine 382, et cette acétylation est nécessaire pour la liaison de p53 au niveau des promoteurs de ses gènes cibles (Lill, Grossman et al. 1997). Il a été montré que l'inhibition de la voie PI3K/AKT grâce à des inhibiteurs chimiques de la PI3K (LY294002 et Wortmannin) déstabilise la protéine p300 (Chen, Halappanavar et al. 2004). En effet, p300 est une cible de la kinase AKT. La phosphorylation de p300 sur le résidu sérine 1834 est nécessaire pour son recrutement au niveau des promoteurs des gènes. La phosphorylation est

également nécessaire pour son activité acétyltransférase (Huang and Chen 2005). Ainsi, l'inhibition de la voie WNT16B/PI3K/AKT pourrait entraîner un défaut d'acétylation de p53 par p300 en réponse à un stress ou au raccourcissement des télomères, et affecter l'activation transcriptionnelle de ses gènes cibles tels que *WAF1*. En accord avec cette hypothèse, la surexpression de WNT16B dans les fibroblastes jeunes n'affecte pas le niveau d'expression de *WAF1* malgré l'activation de la voie AKT car il n'y a pas de signal de phosphorylation de p53 nécessaire à sa stabilisation. L'analyse dans les différentes conditions de l'état d'acétylation de p53 d'une part, et de son interaction au niveau du promoteur de *WAF1* d'autre part, permettra de déterminer si cette hypothèse est pertinente.

5. WNT16 ET CROISSANCE TUMORALE

L'étude immunohistochimique réalisée dans les cancers pulmonaires non à petites cellules (CPNPC) a montré que la distribution de l'expression de WNT16B est inchangée quel que soit le stade de développement tumoral. Cette absence de dérégulation suggère que la protéine n'est pas impliquée dans la tumorigenèse bronchique. Nous avons testé l'effet d'une surexpression de WNT16B dans plusieurs lignées de cellules tumorales (résultats non présentés). Quelle que soit l'origine de la lignée (cancer du poumon, ostéosarcome, cancer colorectal, cancer du sein), aucune modification de la prolifération cellulaire n'a pu être observée. Ces expériences préliminaires suggèrent que l'accumulation de WNT16B est insuffisante pour stimuler la pousse tumorale, et diffèrent donc de ce qui avait été observé par Teh *et al.*, qui avaient montré un rôle de WNT16B sur la prolifération cellulaire. De plus, la surexpression de WNT16B n'entraîne aucune modification sur les propriétés d'étalement cellulaire. Les modifications de l'adhérence et de la mobilité sont essentielles pour

l'acquisition d'un phénotype métastatique. Par conséquent, il est peu probable que WNT16B affecte l'invasion tumorale.

En analysant le devenir des patients en fonction du statut de WNT16, nous avons observé une corrélation entre la forte expression du marqueur de sénescence et la survie des patients, particulièrement dans les carcinomes malpighiens. Il s'agit d'une tendance puisque la probabilité que cette observation soit due au hasard est de 7,68%. Ce résultat est donc à confirmer. Quoi qu'il en soit, deux hypothèses peuvent expliquer cette relation. La plus simple, étant donné que l'expression de WNT16 ne varie pas entre le tissu pulmonaire sain et le tissu tumoral, est que la présence de cellules exprimant WNT16 rend le tissu tumoral plus sensible à la chimiothérapie. Aucune donnée ne nous permet de penser à un effet direct. A l'inverse WNT16 a plutôt été associé à l'activation de la voie anti-apoptotique PI3K/AKT, ce qui est généralement impliqué dans la résistance au traitement. Par contre, considérant WNT16 exclusivement comme un marqueur des cellules sénescents, un score élevé révèle une quantité importante de cellules sénescents par rapport aux cellules malignes au sein du tissu tumoral. Ainsi, les patients présentant ce ratio élevé répondront plus vite à la chimiothérapie du fait du plus faible nombre de cellules à cibler d'une part, et de l'action probable des cellules sénescents, *via* la sécrétion de facteurs solubles, d'autre part. Une corrélation entre la présence de cellules sénescents et l'efficacité du traitement a été évoquée récemment dans les cancers colorectaux (Haugstetter, Loddenkemper et al. 2010). Dans cette étude, les auteurs ont appliqué un index de sénescence (SI – *senescence index*) pour classer des lésions précancéreuses chez des patients n'ayant pas encore reçu de traitement en deux catégories : partiellement sénescents et non-sénescents. Après traitement, les patients présentant des lésions partiellement sénescents ont globalement une meilleure survie sans progression. Nos travaux et ceux de Haugstetter *et al.* accèdent à la même conclusion, *ie* que

la présence de cellules sénescents dans les tumeurs au moment du diagnostic est liée à un meilleur pronostic de survie pour le patient après traitement. Comment les cellules sénescents participent à augmenter l'efficacité du traitement reste à déterminer. Il est notable ici que cette hypothèse va à l'encontre du modèle protumoral des cellules sénescents dans le microenvironnement proposé par J. Campisi (**Figure 13**).

La seconde hypothèse suggère que WNT16 est induit en réponse au traitement. Si le traitement est responsable de l'activation du gène, la quantité de protéine produite reflètera alors la proportion de cellules tumorales répondant à la chimiothérapie. Comme évoqué précédemment, le type de réponse est l'entrée en sénescence cellulaire. En conséquence, la progression tumorale est ralentie voire stoppée, et l'expression de la protéine WNT16B pourrait être un marqueur indirect de ce ralentissement. Cette hypothèse suppose toutefois que l'expression de WNT16, déjà forte dans le tissu pulmonaire sain, est perdue au cours de la progression tumorale, pour augmenter à nouveau après le traitement. L'analyse de tumeurs à différents stades de développement et avant traitement donnerait une indication sur la viabilité de cette hypothèse.

Il est difficile de favoriser l'un ou l'autre modèle étant donné que tous les patients ont reçu un traitement. L'hypothèse considérant que WNT16 est exprimé avant le traitement, plus simple, semble mieux refléter les observations. D'un point de vue clinique, ce modèle suggère que la mesure de l'expression de WNT16 puisse être utilisée à des fins de pronostic pour prédire la réponse du patient au traitement chimiothérapeutique. Finalement, ces résultats confirment surtout le lien entre l'expression de WNT16 et la sénescence cellulaire *in vivo*.

6. L'IMPORTANCE DES FACTEURS SOLUBLES

WNT16B est une protéine sécrétée par les cellules sénescents. Par conséquent, la protéine peut agir à la fois selon un mode autocrine, c'est-à-dire sur la cellule qui l'a produite, soit selon un mode paracrine sur les cellules proches. Cette caractéristique a plusieurs conséquences fonctionnelles et cliniques. D'un point de vue fonctionnel, la sécrétion de WNT16B suggère une propagation de ses effets d'une cellule à l'autre dans un tissu, tels que l'activation de la voie AKT et l'induction de sénescence. D'après les résultats obtenus en immunohistochimie, la sécrétion de WNT16B est liée à une meilleure survie globale, donc à une meilleure efficacité du traitement. Ce résultat n'est pas compatible avec l'induction de la voie AKT dans les cellules tumorales puisqu'elle est connue pour augmenter la résistance de ces cellules au traitement et est un facteur de mauvais pronostic. A l'inverse, il est possible que la sécrétion de WNT16B, conjointement avec d'autres facteurs dont la chimiothérapie, stimule l'entrée en sénescence et/ou en apoptose des cellules tumorales. Cette propagation d'un signal de suppression tumorale dans le tissu pourrait expliquer l'effet sur la survie des patients inclus dans cette étude.

De la même manière, nous avons montré qu'il existe une corrélation linéaire entre l'intensité du marquage de WNT16B dans les tumeurs de CPNPC et dans le stroma correspondant. Plus précisément, l'expression de WNT16B dans le stroma semble dépendre d'une forte expression dans la tumeur. Ce résultat supporte l'idée d'une communication entre cellules tumorales et cellules stromales, dans le sens tumeur vers stroma. De plus, WNT16B serait capable d'activer sa propre expression selon un mode paracrine. Si les cellules stromales, en particulier les fibroblastes, entrent en sénescence n'est pas déterminé. Dans l'affirmative, la propagation du signal de sénescence dans le microenvironnement pourra être

très importante pour le devenir de la tumeur. Selon la théorie protumorale, l'accumulation de cellules sénescents sera bénéfique à la croissance tumorale via la production de facteurs de croissances, d'enzymes matricielles et de cytokines. A l'inverse, selon nos résultats, l'augmentation du nombre de cellules sénescents exprimant WNT16 est un facteur de bon pronostic pour le patient recevant un traitement chimiothérapeutique. Ainsi, les cellules tumorales se multiplieraient plus vite, mais seraient moins résistantes. La troisième conséquence serait l'augmentation du risque de rechute. En effet, plusieurs cas de réversion de la sénescence ont été décrits (Schmitt, Fridman et al. 2002; Roberson, Kussick et al. 2005). Dans ces études, les cellules révertées conservent les propriétés anti-apoptotiques des cellules sénescents. Par conséquent, les tumeurs secondaires sont beaucoup plus résistantes aux traitements et le pronostic vital est beaucoup plus mauvais.

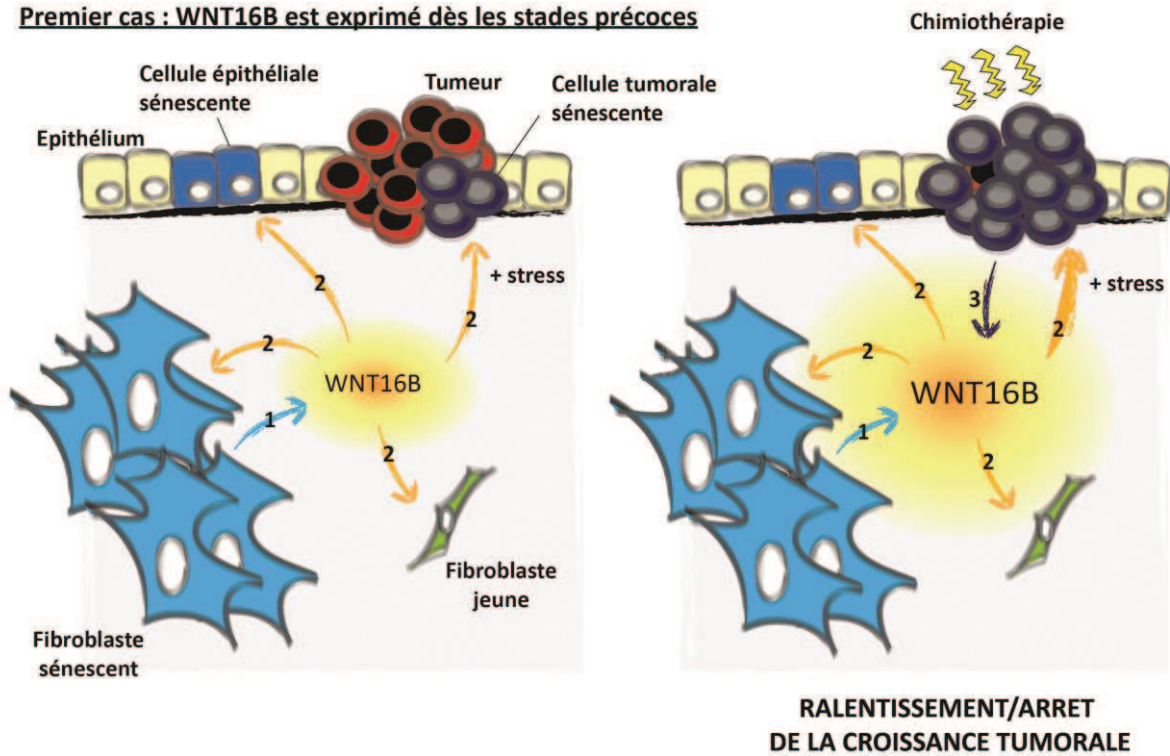
D'un point de vue clinique, le fait que WNT16B soit une protéine sécrétée a des implications non négligeables. En effet, si la protéine est détectable dans le sérum des patients, alors WNT16B viendra s'ajouter à la liste des marqueurs sériques tumoraux, comme le PSA (*Prostate specific antigen*), l'ACE (*Antigène carcino-embryonnaire*), l' α -foetoprotéine, et les *carbohydrate antigens* CA 125, CA 15,3 et CA 19,9. Ces antigènes tumoraux sont dosés dans le sérum et ont une norme définie, ce qui permet d'évaluer une surproduction. Laquelle surproduction sera un marqueur de diagnostic de développement tumoral, qui devra être confirmé par d'autres examens. Ces marqueurs sont principalement utilisés pour la surveillance des patients sous traitement, afin d'évaluer la diminution du volume tumoral. De la même manière, la détection et la mesure de la quantité de WNT16B dans le sérum pourrait être informative du pronostic, de l'efficacité du traitement et de l'évolution de la maladie, comme expliqué précédemment.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

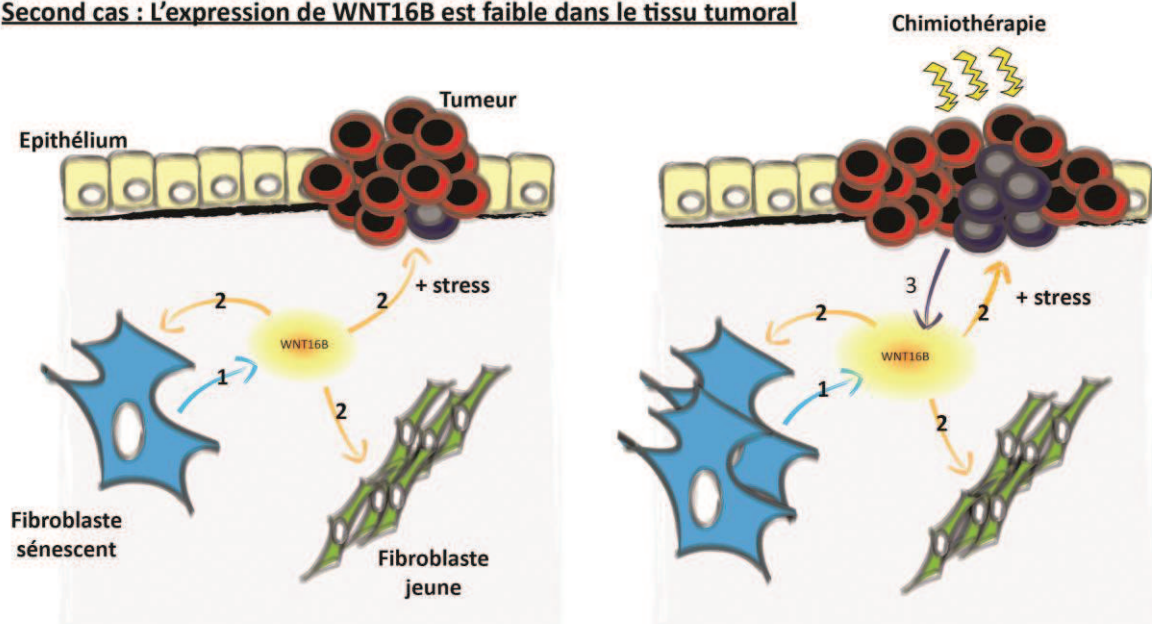
Depuis sa découverte en 1961, la sénescence cellulaire a été démontrée comme étant un mécanisme de suppression tumorale *in vitro* et *in vivo*, caractérisé par un arrêt irréversible du cycle cellulaire. L'entrée en sénescence constitue une barrière ultime contre le développement tumoral. Ainsi, les cellules sénescents s'accumulent dans les lésions précancéreuses, et pourraient constituer un puissant outil pour la détection précoce des cancers, à la condition de posséder des marqueurs suffisamment spécifiques et aisément détectables chez les patients. Par ailleurs, l'entrée en sénescence des cellules tumorales est observée sous l'effet de chimiothérapies. La proportion de cellules sénescents est corrélée à l'efficacité du traitement et à l'inhibition de la croissance tumorale. Dans ce contexte, la disponibilité de marqueurs des cellules sénescents présente également un intérêt pour le suivi de l'évolution du patient. Plus récemment, il a été proposé que les cellules sénescents possèdent un sécrétome particulier. Ce sécrétome est nécessaire pour la mise en place et le maintien de la sénescence. Il pourrait également être impliqué dans la croissance tumorale, en stimulant la prolifération des cellules cancéreuses selon un mode d'action paracrine. Ainsi, l'identification des facteurs sécrétés responsables de l'activité protumorale des cellules sénescents pourrait être utilisée pour la mise au point de nouveaux traitements ciblés. Globalement, la compréhension des

Figure 19. Modèle d'action de WNT16B dans le microenvironnement tumoral.

Premier cas : WNT16B est exprimé dès les stades précoces



Second cas : L'expression de WNT16B est faible dans le tissu tumoral



mécanismes mis en jeu pour l'entrée et le maintien de la sénescence présente un intérêt majeur dans la lutte contre le cancer.

Au cours de ma thèse, j'ai caractérisé la protéine WNT16B en tant que nouveau marqueur des cellules sénescents *in vitro* et *in vivo*, retrouvé en particulier dans les cellules tumorales sénescents. WNT16B est une protéine sécrétée qui participe à la mise en place de la sénescence en régulant l'activité transcriptionnelle de p53 par un mécanisme encore inconnu. Ce ligand n'affecte pas la prolifération cellulaire, mais semble jouer un rôle dans la survie cellulaire en activant la voie de résistance à l'apoptose PI3K/AKT. A la lumière de ces résultats, un modèle est proposé, présentant les effets potentiels de WNT16B dans le microenvironnement tumoral (**Figure 19**). Dans un premier cas, la protéine WNT16B est produite par les fibroblastes sénescents (1), pour diffuser dans le microenvironnement et affecter les cellules voisines (2). Lors de la transformation tumorale, la présence de cellules sénescents dans le microenvironnement stimule la croissance tumorale d'une part, et la sécrétion de WNT16B probablement couplée à un stress induit l'apparition de cellules tumorales sénescents (2). Lorsque le patient suit un traitement, la chimiothérapie augmente le nombre de cellules tumorales entrant en sénescence grâce à la présence de la protéine du microenvironnement WNT16B. Ces cellules tumorales sénescents expriment elles-mêmes WNT16B, augmentant d'autant la réponse (3). Globalement, WNT16B augmente l'efficacité et la rapidité du traitement, donc les chances de survie des patients. Dans un second cas, l'expression de WNT16B est faible à la fois dans les cellules tumorales et dans le stroma (1). Le tissu tumoral contient peu de cellules sénescents. Lors du traitement, l'induction de sénescence et d'apoptose est plus lente, moins efficace, et les chances de survie du patient sont plus faibles que dans le premier cas (2 et 3). D'après ce modèle, la protéine WNT16B joue un rôle important dans l'efficacité du traitement. La détermination du statut de WNT16B

dans le microenvironnement tumoral aura donc une valeur pronostique de l'évolution du patient.

Les perspectives directes de ce travail auront pour objectif de tester la validité du modèle d'action de WNT16B. En effet, plusieurs zones d'ombre subsistent. Tout d'abord, le statut de la kinase AKT dans les CPNPC étudiés n'est pas connu. Il sera nécessaire d'analyser les différentes formes phosphorylées d'AKT pour établir l'existence d'une corrélation avec le statut de WNT16B. De plus, bien que WNT16B soit une protéine sécrétée, il n'est pas déterminé qu'elle soit capable d'activer la voie PI3K/AKT dans un autre type cellulaire, ni de provoquer l'entrée en sénescence selon un mode paracrine. Des expériences de co-cultures cellulaires devront être réalisées afin de répondre à cette question. Une fois le modèle clairement établi, des expériences fonctionnelles pourront être réalisées dans le but de tester les conséquences de ce modèle, c'est-à-dire l'impact de WNT16B, ou l'impact des cellules sénescents, sur l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques. C'est uniquement après avoir obtenu l'ensemble de ces résultats qu'il sera possible d'étudier les applications éventuelles de WNT16B en clinique en tant que biomarqueur et/ou facteur de pronostic.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdallah, P., P. Luciano, et al. (2009). "A two-step model for senescence triggered by a single critically short telomere." *Nat Cell Biol* **11**(8): 988-993.
- Acosta, J., A. O'Loughlen, et al. (2008). "Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence." *Cell* **133**(6): 1006-1018.
- Alcorta, D. A., Y. Xiong, et al. (1996). "Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(24): 13742-13747.
- Allsopp, R., E. Chang, et al. (1995). "Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo." *Exp Cell Res* **220**(1): 194-200.
- Almeida, M., L. Han, et al. (2005). "Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT." *J Biol Chem* **280**(50): 41342-41351.
- Aris, J. P., P. V. Basta, et al. (1993). "Molecular and biochemical characterization of a recombinant human PKC-delta family member." *Biochim Biophys Acta* **1174**(2): 171-181.
- Artandi, S. E., S. Alson, et al. (2002). "Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(12): 8191-8196.
- Attema, J. L., C. J. H. Pronk, et al. (2009). "Hematopoietic stem cell ageing is uncoupled from p16INK4A-mediated senescence." *Oncogene* **28**(22): 2238-2243.
- Bafico, A., A. Gazit, et al. (1999). "Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling." *J Biol Chem* **274**(23): 16180-16187.
- Bafico, A., G. Liu, et al. (2001). "Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow." *Nat Cell Biol* **3**(7): 683-686.
- Bailey, S. M., M. N. Cornforth, et al. (2001). "Strand-Specific Postreplicative Processing of Mammalian Telomeres." *Science* **293**(5539): 2462-2465.
- Baker, S. J., E. R. Fearon, et al. (1989). "Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas." *Science* **244**(4901): 217-221.
- Baker, S. J., S. Markowitz, et al. (1990). "Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53." *Science* **249**(4971): 912-915.
- Ball, H. L., J. S. Myers, et al. (2005). "ATRIP binding to replication protein A-single-stranded DNA promotes ATR-ATRIP localization but is dispensable for Chk1 phosphorylation." *Mol Biol Cell* **16**(5): 2372-2381.
- Banin, S., L. Moyal, et al. (1998). "Enhanced Phosphorylation of p53 by ATM in Response to DNA Damage." *Science* **281**(5383): 1674-1677.
- Bartkova, J., N. Rezaei, et al. (2006). "Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints." *Nature* **444**(7119): 633-637.
- Baumann, P. and T. R. Cech (2001). "Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans." *Science* **292**(5519): 1171-1175.
- Bavik, C., I. Coleman, et al. (2006). "The Gene Expression Program of Prostate Fibroblast Senescence Modulates Neoplastic Epithelial Cell Proliferation through Paracrine Mechanisms." *Cancer Research* **66**(2): 794-802.

- Benhaj, K., K. Akcali, et al. (2006). "Redundant expression of canonical Wnt ligands in human breast cancer cell lines." *Oncol Rep* **15**(3): 701-707.
- Benhaj, K., K. C. Akcali, et al. (2006). "Redundant expression of canonical Wnt ligands in human breast cancer cell lines." *Oncol Rep* **15**(3): 701-707.
- Bhanot, P., M. Brink, et al. (1996). "A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor." *Nature* **382**(6588): 225-230.
- Biggs, W. H., J. Meisenhelder, et al. (1999). "Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(13): 7421-7426.
- Billiard, J., D. Way, et al. (2005). "The orphan receptor tyrosine kinase Ror2 modulates canonical Wnt signaling in osteoblastic cells." *Mol Endocrinol* **19**(1): 90-101.
- Blackburn, E. H. and J. G. Gall (1978). "A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*." *J Mol Biol* **120**(1): 33-53.
- Blasband, A., B. Schryver, et al. (1992). "The biochemical properties and transforming potential of human Wnt-2 are similar to Wnt-1." *Oncogene* **7**(1): 153-161.
- Bonetti, D., M. Martina, et al. (2009). "Multiple Pathways Regulate 3' Overhang Generation at *S. cerevisiae* Telomeres." *Molecular Cell* **35**(1): 70-81.
- Boule, J.-B., L. R. Vega, et al. (2005). "The yeast Pif1p helicase removes telomerase from telomeric DNA." *Nature* **438**(7064): 57-61.
- Braig, M., S. Lee, et al. (2005). "Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development." *Nature* **436**(7051): 660-665.
- Brigati, C., D. M. Noonan, et al. (2002). "Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes?" *Clin Exp Metastasis* **19**(3): 247-258.
- Brown, J., W. Wei, et al. (1997). "Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts." *Science* **277**(5327): 831-834.
- Brunet, A., A. Bonni, et al. (1999). "Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor." *Cell* **96**(6): 857-868.
- Buscemi, G., L. Zannini, et al. (2009). "The shelterin protein TRF2 inhibits Chk2 activity at telomeres in the absence of DNA damage." *Curr Biol* **19**(10): 874-879.
- Campisi, J. (1997). "Aging and cancer: the double-edged sword of replicative senescence." *J Am Geriatr Soc* **45**(4): 482-488.
- Campisi, J. (2000). "Cancer, aging and cellular senescence." *In Vivo* **14**(1): 183-188.
- Campisi, J. (2005). "Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors." *Cell* **120**(4): 513-522.
- Canela, A., J. Martin-Caballero, et al. (2004). "Constitutive Expression of Tert in Thymocytes Leads to Increased Incidence and Dissemination of T-Cell Lymphoma in Lck-Tert Mice." *Mol. Cell. Biol.* **24**(10): 4275-4293.
- Canman, C. E., D.-S. Lim, et al. (1998). "Activation of the ATM Kinase by Ionizing Radiation and Phosphorylation of p53." *Science* **281**(5383): 1677-1679.
- Carmeliet, P. (2003). "Angiogenesis in health and disease." *Nat Med* **9**(6): 653-660.
- Casagrande, G., G. te Kronnie, et al. (2006). "The effects of siRNA-mediated inhibition of E2A-PBX1 on EB-1 and Wnt16b expression in the 697 pre-B leukemia cell line." *Haematologica* **91**(6): 765-771.
- Celli, G. B. and T. de Lange (2005). "DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion." *Nat Cell Biol* **7**(7): 712-718.
- Chai, W., A. J. Sfeir, et al. (2006). "The involvement of the Mre11/Rad50/Nbs1 complex in the generation of G-overhangs at human telomeres." *EMBO Rep* **7**(2): 225-230.
- Chai, W., J. W. Shay, et al. (2005). "Human telomeres maintain their overhang length at senescence." *Mol Cell Biol* **25**(6): 2158-2168.
- Chang, B.-D., E. V. Broude, et al. (1999). "A Senescence-like Phenotype Distinguishes Tumor Cells That Undergo Terminal Proliferation Arrest after Exposure to Anticancer Agents." *Cancer Research* **59**(15): 3761-3767.
- Chang, J., W. Sonoyama, et al. (2007). "Noncanonical Wnt-4 signaling enhances bone regeneration of mesenchymal stem cells in craniofacial defects through activation of p38 MAPK." *J Biol Chem* **282**(42): 30938-30948.
- Chen, J., C. M. Astle, et al. (1999). "Development and aging of primitive hematopoietic stem cells in BALB/cBy mice." *Experimental Hematology* **27**(5): 928-935.
- Chen, J., S. S. Halappanavar, et al. (2004). "Role of Akt/protein kinase B in the activity of transcriptional coactivator p300." *Cell Mol Life Sci* **61**(13): 1675-1683.
- Chen, Q. and B. Ames (1994). "Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(10): 4130-4134.
- Chen, Q., J. Bartholomew, et al. (1998). "Molecular analysis of H2O2-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication." *Biochem J* **332** (Pt 1): 43-50.

- Chen, Q., A. Fischer, et al. (1995). "Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(10): 4337-4341.
- Chen, Q., V. Tu, et al. (2000). "Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide." *J Cell Sci* **113** (Pt 22): 4087-4097.
- Chen, Z., L. Trotman, et al. (2005). "Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis." *Nature* **436**(7051): 725-730.
- Cheng, J. F., C. L. Smith, et al. (1989). "Isolation and characterization of a human telomere." *Nucleic Acids Res* **17**(15): 6109-6127.
- Ciani, L. and P. Salinas (2007). "c-Jun N-terminal kinase (JNK) cooperates with Gsk3beta to regulate Dishevelled-mediated microtubule stability." *BMC Cell Biol* **8**: 27.
- Cirone, P., S. Lin, et al. (2008). "A role for planar cell polarity signaling in angiogenesis." *Angiogenesis* **11**(4): 347-360.
- Cohen, S. B., M. E. Graham, et al. (2007). "Protein Composition of Catalytically Active Human Telomerase from Immortal Cells." *Science* **315**(5820): 1850-1853.
- Collado, M., J. Gil, et al. (2005). "Tumour biology: senescence in premalignant tumours." *Nature* **436**(7051): 642.
- Computational Biology Research Center , A., Japan. "TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites (ver 1.3)." from <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>.
- Coppé, J.-P., C. K. Patil, et al. (2008). "Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor." *PLoS Biol* **6**(12): e301.
- Corrigan, P., E. Dobbin, et al. (2009). "Patterns of Wnt/Fzd/LRP gene expression during embryonic hematopoiesis." *Stem Cells Dev* **18**(5): 759-772.
- Counter, C., A. Avilion, et al. (1992). "Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity." *EMBO J* **11**(5): 1921-1929.
- Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." *Nature* **420**(6917): 860-867.
- 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): 10614-10619.
- d'Adda di Fagagna, F., P. M. Reaper, et al. (2003). "A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence." *Nature* **426**(6963): 194-198.
- Dai, X., C. Huang, et al. (2010). "Molecular steps of G-overhang generation at human telomeres and its function in chromosome end protection." *EMBO J* **29**(16): 2788-2801.
- Dann, C., J. Hsieh, et al. (2001). "Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains." *Nature* **412**(6842): 86-90.
- Datta, S. R., H. Dudek, et al. (1997). "Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery." *Cell* **91**(2): 231-241.
- Debacq-Chainiaux, F., J. Erusalimsky, et al. (2009). "Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo." *Nat Protoc* **4**(12): 1798-1806.
- Dell'Accio, F., C. De Bari, et al. (2008). "Identification of the molecular response of articular cartilage to injury, by microarray screening: Wnt-16 expression and signaling after injury and in osteoarthritis." *Arthritis Rheum* **58**(5): 1410-1421.
- Dhomen, N., J. S. Reis-Filho, et al. (2009). "Oncogenic Braf Induces Melanocyte Senescence and Melanoma in Mice." *Cancer Cell* **15**(4): 294-303.
- Di Micco, R., M. Fumagalli, et al. (2006). "Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication." *Nature* **444**(7119): 638-642.
- 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): 9363-9367.
- Dissanayake, S., M. Wade, et al. (2007). "The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition." *J Biol Chem* **282**(23): 17259-17271.
- Dösen, G., E. Tenstad, et al. (2006). "Wnt expression and canonical Wnt signaling in human bone marrow B lymphopoiesis." *BMC Immunol* **7**: 13.
- Dulic', V., G.-E. Beney, et al. (2000). "Uncoupling between Phenotypic Senescence and Cell Cycle Arrest in Aging p21-Deficient Fibroblasts." *Mol. Cell. Biol.* **20**(18): 6741-6754.
- Dulic, V., W. K. Kaufmann, et al. (1994). "p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest." *Cell* **76**(6): 1013-1023.
- Ekinci, F. J. and T. B. Shea (1999). "Free PKC catalytic subunits (PKM) phosphorylate tau via a pathway distinct from that utilized by intact PKC." *Brain Res* **850**(1-2): 207-216.
- El-Deiry, W. S., S. E. Kern, et al. (1992). "Definition of a consensus binding site for p53." *Nat Genet* **1**(1): 45-49.

- el-Deiry, W. S., T. Tokino, et al. (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." *Cell* **75**(4): 817-825.
- Eliyahu, D., N. Goldfinger, et al. (1988). "Meth A fibrosarcoma cells express two transforming mutant p53 species." *Oncogene* **3**(3): 313-321.
- Eliyahu, D., D. Michalovitz, et al. (1989). "Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(22): 8763-8767.
- Eliyahu, D., A. Raz, et al. (1984). "Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells." *Nature* **312**(5995): 646-649.
- Fear, M., D. Kelsell, et al. (2000). "Wnt-16a, a novel Wnt-16 isoform, which shows differential expression in adult human tissues." *Biochem Biophys Res Commun* **278**(3): 814-820.
- Fear, M. W., D. P. Kelsell, et al. (2000). "Wnt-16a, a novel Wnt-16 isoform, which shows differential expression in adult human tissues." *Biochem Biophys Res Commun* **278**(3): 814-820.
- Ferbeyre, G., E. de Stanchina, et al. (2000). "PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence." *Genes Dev* **14**(16): 2015-2027.
- Fingar, D. C., S. Salama, et al. (2002). "Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E." *Genes & Development* **16**(12): 1472-1487.
- Finlay, C. A., P. W. Hinds, et al. (1989). "The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation." *Cell* **57**(7): 1083-1093.
- Finlay, C. A., P. W. Hinds, et al. (1988). "Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life." *Mol Cell Biol* **8**(2): 531-539.
- Fisher, G. H., S. L. Wellen, et al. (2001). "Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes." *Genes Dev* **15**(24): 3249-3262.
- Fokina, V. and E. Frolova (2006). "Expression patterns of Wnt genes during development of an anterior part of the chicken eye." *Dev Dyn* **235**(2): 496-505.
- Folkman, J. (1995). "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." *Nat Med* **1**(1): 27-31.
- Fornaro, M., J. Plescia, et al. (2003). "Fibronectin Protects Prostate Cancer Cells from Tumor Necrosis Factor- α -induced Apoptosis via the AKT/Survivin Pathway." *Journal of Biological Chemistry* **278**(50): 50402-50411.
- Gallahan, D., C. Kozak, et al. (1987). "A new common integration region (int-3) for mouse mammary tumor virus on mouse chromosome 17." *J Virol* **61**(1): 218-220.
- Gazit, A., A. Yaniv, et al. (1999). "Human frizzled 1 interacts with transforming Wnts to transduce a TCF dependent transcriptional response." *Oncogene* **18**(44): 5959-5966.
- Geetha-Loganathan, P., S. Nimmagadda, et al. (2009). "Expression of WNT signalling pathway genes during chicken craniofacial development." *Dev Dyn* **238**(5): 1150-1165.
- Gire, V., P. Roux, et al. (2004). "DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence." *EMBO J* **23**(13): 2554-2563.
- Glinka, A., W. Wu, et al. (1998). "Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction." *Nature* **391**(6665): 357-362.
- Goldstein, S., J. W. Littlefield, et al. (1969). "Diabetes mellitus and aging: diminished planting efficiency of cultured human fibroblasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **64**(1): 155-160.
- Gonzalez-Suarez, E., C. Geserick, et al. (2005). "Antagonistic effects of telomerase on cancer and aging in K5-mTert transgenic mice." *24*(13): 2256-2270.
- Gonzalez-Suarez, E., E. Samper, et al. (2000). "Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis." *Nat Genet* **26**(1): 114-117.
- Gonzalez-Suarez, E., E. Samper, et al. (2001). "Increased epidermal tumors and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes." *EMBO J* **20**(11): 2619-2630.
- Gordon, M. and R. Nusse (2006). "Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors." *J Biol Chem* **281**(32): 22429-22433.
- Gorgoulis, V. G., L. V. Vassiliou, et al. (2005). "Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions." *Nature* **434**(7035): 907-913.
- Gregory, M. A., T. L. Phang, et al. (2010). "Wnt/Ca²⁺/NFAT signaling maintains survival of Ph⁺ leukemia cells upon inhibition of Bcr-Abl." *Cancer Cell* **18**(1): 74-87.
- Greider, C. W. and E. H. Blackburn (1985). "Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts." *Cell* **43**(2 Pt 1): 405-413.
- Greider, C. W. and E. H. Blackburn (1987). "The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity." *Cell* **51**(6): 887-898.

- Greider, C. W. and E. H. Blackburn (1989). "A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis." *Nature* **337**(6205): 331-337.
- Griffith, J. D., L. Comeau, et al. (1999). "Mammalian telomeres end in a large duplex loop." *Cell* **97**(4): 503-514.
- Gu, W. and R. G. Roeder (1997). "Activation of p53 Sequence-Specific DNA Binding by Acetylation of the p53 C-Terminal Domain." *Cell* **90**(4): 595-606.
- Gu, Y., M. C. Byrne, et al. (2002). "Rac2, a Hematopoiesis-Specific Rho GTPase, Specifically Regulates Mast Cell Protease Gene Expression in Bone Marrow-Derived Mast Cells." *Mol. Cell. Biol.* **22**(21): 7645-7657.
- Guerra, C., N. Mijimolle, et al. (2003). "Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context." *Cancer Cell* **4**(2): 111-120.
- Guo, X., T. Day, et al. (2004). "Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation." *Genes Dev* **18**(19): 2404-2417.
- Habas, R., I. Dawid, et al. (2003). "Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation." *Genes Dev* **17**(2): 295-309.
- Habas, R., Y. Kato, et al. (2001). "Wnt/Frizzled Activation of Rho Regulates Vertebrate Gastrulation and Requires a Novel Formin Homology Protein Daam1." *Cell* **107**(7): 843-854.
- Halevy, O., J. Rodel, et al. (1991). "Frequent p53 mutations in chemically induced murine fibrosarcoma." *Oncogene* **6**(9): 1593-1600.
- Halford, M. M. and S. A. Stacker (2001). "Revelations of the RYK receptor." *Bioessays* **23**(1): 34-45.
- Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." *Science* **279**(5350): 509-514.
- Hanahan, D. and J. Folkman (1996). "Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis." *Cell* **86**(3): 353-364.
- Hara, E., R. Smith, et al. (1996). "Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence." *Mol Cell Biol* **16**(3): 859-867.
- Harley, C., A. Futcher, et al. (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." *Nature* **345**(6274): 458-460.
- Harper, J. W., G. R. Adami, et al. (1993). "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases." *Cell* **75**(4): 805-816.
- Hastie, N. D., M. Dempster, et al. (1990). "Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing." *Nature* **346**(6287): 866-868.
- Haugstetter, A. M., C. Loddenkemper, et al. (2010). "Cellular senescence predicts treatment outcome in metastasised colorectal cancer." *Br J Cancer*.
- Haviv, I., K. Polyak, et al. (2009). "Origin of carcinoma associated fibroblasts." *Cell Cycle* **8**(4): 589-595.
- HAYFLICK, L. (1965). "THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS." *Exp Cell Res* **37**: 614-636.
- HAYFLICK, L. and P. MOORHEAD (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." *Exp Cell Res* **25**: 585-621.
- Heinemeyer, T., E. Wingender, et al. (1998). "Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL." *Nucleic Acids Research* **26**(1): 362-367.
- Herbig, U., M. Ferreira, et al. (2006). "Cellular senescence in aging primates." *Science* **311**(5765): 1257.
- 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* **14**(4): 501-513.
- Higgs, H. N. (2005). "Formin proteins: a domain-based approach." *Trends in Biochemical Sciences* **30**(6): 342-353.
- Hirao, A., Y.-Y. Kong, et al. (2000). "DNA Damage-Induced Activation of p53 by the Checkpoint Kinase Chk2." *Science* **287**(5459): 1824-1827.
- Hoh, J., S. Jin, et al. (2002). "The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(13): 8467-8472.
- Honda, R., H. Tanaka, et al. (1997). "Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53." *FEBS Letters* **420**(1): 25-27.
- Hsieh, J., L. Kodjabachian, et al. (1999). "A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities." *Nature* **398**(6726): 431-436.
- Huang, W.-C. and C.-C. Chen (2005). "Akt Phosphorylation of p300 at Ser-1834 Is Essential for Its Histone Acetyltransferase and Transcriptional Activity." *Mol. Cell. Biol.* **25**(15): 6592-6602.
- Huen, M. S. Y., R. Grant, et al. (2007). "RNF8 Transduces the DNA-Damage Signal via Histone Ubiquitylation and Checkpoint Protein Assembly." *Cell* **131**(5): 901-914.
- INCa (2010). © La situation du cancer en France en 2010. *Collection Rapports & synthèses*. O. c. é. p. l'INCa. Boulogne-Billancourt, INCa.
- Itahana, K., J. Campisi, et al. (2007). "Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay." *Methods Mol Biol* **371**: 21-31.

- Jackson, E. L., N. Willis, et al. (2001). "Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras." *Genes Dev* **15**(24): 3243-3248.
- Jackson, J. G. and O. M. Pereira-Smith (2006). "p53 Is Preferentially Recruited to the Promoters of Growth Arrest Genes p21 and GADD45 during Replicative Senescence of Normal Human Fibroblasts." *Cancer Research* **66**(17): 8356-8360.
- Janzen, V., R. Forkert, et al. (2006). "Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a." *Nature* **443**(7110): 421-426.
- Jhappan, C., D. Gallahan, et al. (1992). "Expression of an activated Notch-related int-3 transgene interferes with cell differentiation and induces neoplastic transformation in mammary and salivary glands." *Genes Dev* **6**(3): 345-355.
- Johnson, L., K. Mercer, et al. (2001). "Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice." *Nature* **410**(6832): 1111-1116.
- Ju, Z., H. Jiang, et al. (2007). "Telomere dysfunction induces environmental alterations limiting hematopoietic stem cell function and engraftment." *Nat Med* **13**(6): 742-747.
- Kalluri, R. (2003). "Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis." *Nat Rev Cancer* **3**(6): 422-433.
- Karasawa, T., H. Yokokura, et al. (2002). "Frizzled-9 is activated by Wnt-2 and functions in Wnt/beta -catenin signaling." *J Biol Chem* **277**(40): 37479-37486.
- Karlseder, J., A. Smogorzewska, et al. (2002). "Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss." *Science* **295**(5564): 2446-2449.
- Kastan, M. B., O. Onyekwere, et al. (1991). "Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage." *Cancer Research* **51**(23 Part 1): 6304-6311.
- Kastan, M. B., Q. Zhan, et al. (1992). "A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia." *Cell* **71**(4): 587-597.
- Katoh, Y. and M. Katoh (2005). "Comparative genomics on Wnt16 orthologs." *Oncol Rep* **13**(4): 771-775.
- Kelley, R. O., J. A. Trotter, et al. (1980). "Variation in cytoskeletal assembly during spreading of progressively subcultivated human embryo fibroblasts (IMR-90)." *Mechanisms of Ageing and Development* **13**(2): 127-141.
- Kessenbrock, K., V. Plaks, et al. (2010). "Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment." *Cell* **141**(1): 52-67.
- Keys, B., V. Serra, et al. (2004). "Telomere shortening in human fibroblasts is not dependent on the size of the telomeric-3'-overhang." *Aging Cell* **3**(3): 103-109.
- Khanna, K. K., K. E. Keating, et al. (1998). "ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction." *Nat Genet* **20**(4): 398-400.
- Kim, A. H., G. Khursigara, et al. (2001). "Akt Phosphorylates and Negatively Regulates Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1." *Mol. Cell. Biol.* **21**(3): 893-901.
- Kim, G. H., J. H. Her, et al. (2008). "Ryk cooperates with Frizzled 7 to promote Wnt11-mediated endocytosis and is essential for *Xenopus laevis* convergent extension movements." *J Cell Biol* **182**(6): 1073-1082.
- Kim, J.-S., C. Lee, et al. (2007). "Activation of p53-Dependent Growth Suppression in Human Cells by Mutations in PTEN or PIK3CA." *Mol. Cell. Biol.* **27**(2): 662-677.
- Kim, M., H. Lee, et al. (2008). "Functional interaction between Wnt3 and Frizzled-7 leads to activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells." *J Hepatol* **48**(5): 780-791.
- Kimelman, D. and W. Xu (2006). "beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective." *Oncogene* **25**(57): 7482-7491.
- Kirsch, M., J. Strasser, et al. (1998). "Angiostatin suppresses malignant glioma growth in vivo." *Cancer Res* **58**(20): 4654-4659.
- Kishida, S., H. Yamamoto, et al. (1999). "DIX domains of Dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate beta-catenin stability." *Mol Cell Biol* **19**(6): 4414-4422.
- Kollman, C., C. W. S. Howe, et al. (2001). "Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age." *Blood* **98**(7): 2043-2051.
- Kortlever, R., P. Higgins, et al. (2006). "Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence." *Nat Cell Biol* **8**(8): 877-884.
- Kremenevskaja, N., R. von Wasielewski, et al. (2005). "Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma." *Oncogene* **24**(13): 2144-2154.
- Kress, M., E. May, et al. (1979). "Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum." *J Virol* **31**(2): 472-483.
- Krtolica, A., S. Parrinello, et al. (2001). "Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(21): 12072-12077.

- Kühl, M., L. Sheldahl, et al. (2000). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*." *J Biol Chem* **275**(17): 12701-12711.
- Kühl, M., L. Sheldahl, et al. (2000). "The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape." *Trends Genet* **16**(7): 279-283.
- Kuerbitz, S. J., B. S. Plunkett, et al. (1992). "Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(16): 7491-7495.
- Kuilman, T., C. Michaloglou, et al. (2008). "Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network." *Cell* **133**(6): 1019-1031.
- Kuilman, T. and D. Peeper (2009). "Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress." *Nat Rev Cancer* **9**(2): 81-94.
- Kurayoshi, M., N. Oue, et al. (2006). "Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion." *Cancer Res* **66**(21): 10439-10448.
- Lam, Y. C., S. Akhter, et al. (2010). "SNMIB/Apollo protects leading-strand telomeres against NHEJ-mediated repair." *EMBO J* **29**(13): 2230-2241.
- Lane, D. P. and L. V. Crawford (1979). "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells." *Nature* **278**(5701): 261-263.
- Lavin, M. F. (2007). "ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks." *Oncogene* **26**(56): 7749-7758.
- Lee, B. Y., J. A. Han, et al. (2006). "Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase." *Aging Cell* **5**(2): 187-195.
- Levy, M., R. Allsopp, et al. (1992). "Telomere end-replication problem and cell aging." *J Mol Biol* **225**(4): 951-960.
- Li, L., H. Yuan, et al. (1999). "Dishevelled Proteins Lead to Two Signaling Pathways." *Journal of Biological Chemistry* **274**(1): 129-134.
- Li, S., J. Crothers, et al. (2005). "Cellular and Gene Expression Responses Involved in the Rapid Growth Inhibition of Human Cancer Cells by RNA Interference-mediated Depletion of Telomerase RNA." *Journal of Biological Chemistry* **280**(25): 23709-23717.
- Liang, H., Q. Chen, et al. (2003). "Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue." *Cancer Cell* **4**(5): 349-360.
- Lill, N. L., S. R. Grossman, et al. (1997). "Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators." *Nature* **387**(6635): 823-827.
- Lin, K., S. Wang, et al. (1997). "The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11196-11200.
- Lin, S., L. M. Baye, et al. (2010). "Wnt5b-Ryk pathway provides directional signals to regulate gastrulation movement." *J Cell Biol* **190**(2): 263-278.
- Linzer, D. I. and A. J. Levine (1979). "Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells." *Cell* **17**(1): 43-52.
- Liu, D. and P. J. Hornsby (2007). "Senescent Human Fibroblasts Increase the Early Growth of Xenograft Tumors via Matrix Metalloproteinase Secretion." *Cancer Research* **67**(7): 3117-3126.
- Liu, D., A. Safari, et al. (2004). "PTOP interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres." *Nat Cell Biol* **6**(7): 673-680.
- Liu, L., D. M. Scolnick, et al. (1999). "p53 Sites Acetylated In Vitro by PCAF and p300 Are Acetylated In Vivo in Response to DNA Damage." *Mol. Cell. Biol.* **19**(2): 1202-1209.
- Liu, W., A. Sato, et al. (2008). "Mechanism of activation of the Formin protein Daam1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(1): 210-215.
- Loayza, D. and T. De Lange (2003). "POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control." *Nature* **423**(6943): 1013-1018.
- Longo, K., J. Kennell, et al. (2002). "Wnt signaling protects 3T3-L1 preadipocytes from apoptosis through induction of insulin-like growth factors." *J Biol Chem* **277**(41): 38239-38244.
- Lu, D., Y. Zhao, et al. (2004). "Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(9): 3118-3123.
- Lu, W., V. Yamamoto, et al. (2004). "Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth." *Cell* **119**(1): 97-108.
- Lukas, J., D. Parry, et al. (1995). "Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16." *Nature* **375**(6531): 503-506.
- Maehama, T. and J. E. Dixon (1998). "The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate." *J Biol Chem* **273**(22): 13375-13378.
- Maekawa, M., T. Ishizaki, et al. (1999). "Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton Through Protein Kinases ROCK and LIM-kinase." *Science* **285**(5429): 895-898.
- Mailand, N., S. Bekker-Jensen, et al. (2007). "RNF8 Ubiquitylates Histones at DNA Double-Strand Breaks and Promotes Assembly of Repair Proteins." *Cell* **131**(5): 887-900.

- Majumder, P. K., C. Grisanzio, et al. (2008). "A Prostatic Intraepithelial Neoplasia-Dependent p27Kip1 Checkpoint Induces Senescence and Inhibits Cell Proliferation and Cancer Progression." *Cancer Cell* **14**(2): 146-155.
- 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): 657-666.
- Mamane, Y., E. Petroulakis, et al. (2006). "mTOR, translation initiation and cancer." *Oncogene* **25**(48): 6416-6422.
- Mao, B., W. Wu, et al. (2002). "Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling." *Nature* **417**(6889): 664-667.
- Mao, B., W. Wu, et al. (2001). "LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins." *Nature* **411**(6835): 321-325.
- Mao, J., J. Wang, et al. (2001). "Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway." *Mol Cell* **7**(4): 801-809.
- Martin, G. M., C. A. Sprague, et al. (1970). "Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype." *Lab Invest* **23**(1): 86-92.
- Martin, J. A. and J. A. Buckwalter (2001). "Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **56**(4): B172-179.
- Matsuoka, S., G. Rotman, et al. (2000). "Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(19): 10389-10394.
- Mazieres, J., L. You, et al. (2005). "Inhibition of Wnt16 in human acute lymphoblastoid leukemia cells containing the t(1;19) translocation induces apoptosis." *Oncogene* **24**(34): 5396-5400.
- McClintock, B. (1941). "The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays." *Genetics* **26**(2): 234-282.
- McWhirter, J., S. Neuteboom, et al. (1999). "Oncogenic homeodomain transcription factor E2A-Pbx1 activates a novel WNT gene in pre-B acute lymphoblastoid leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 11464-11469.
- Melero, J. A., D. T. Stitt, et al. (1979). "Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and -transformed cells." *Virology* **93**(2): 466-480.
- Melkonyan, H. S., W. C. Chang, et al. (1997). "SARPs: A family of secreted apoptosis-related proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(25): 13636-13641.
- Memarian, A., M. Hojjat-Farsangi, et al. (2009). "Variation in WNT genes expression in different subtypes of chronic lymphocytic leukemia." *Leuk Lymphoma* **50**(12): 2061-2070.
- Meyerson, M., C. M. Counter, et al. (1997). "hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization." *Cell* **90**(4): 785-795.
- Michaloglou, C., L. Vredevelde, et al. (2005). "BRAF^{E600}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi." *Nature* **436**(7051): 720-724.
- Michaloglou, C., L. C. Vredevelde, et al. (2005). "BRAF^{E600}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi." *Nature* **436**(7051): 720-724.
- Michalovitz, D., O. Halevy, et al. (1990). "Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53." *Cell* **62**(4): 671-680.
- Mikels, A. J. and R. Nusse (2006). "Purified Wnt5a Protein Activates or Inhibits β -Catenin-TCF Signaling Depending on Receptor Context." *PLoS Biol* **4**(4): e115.
- Mimura, T. and N. C. Joyce (2006). "Replication Competence and Senescence in Central and Peripheral Human Corneal Endothelium." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **47**(4): 1387-1396.
- Minamino, T. and I. Komuro (2007). "Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis." *Circ Res* **100**(1): 15-26.
- Minden, A. and M. Karin (1997). "Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases." *Biochim Biophys Acta* **1333**(2): F85-104.
- Miyashita, T. and J. C. Reed (1995). "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene." *Cell* **80**(2): 293-299.
- Moodie, S. A., B. M. Willumsen, et al. (1993). "Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase." *Science* **260**(5114): 1658-1661.
- Moriarty, T. J., R. J. Ward, et al. (2005). "An Anchor Site-Type Defect in Human Telomerase That Disrupts Telomere Length Maintenance and Cellular Immortalization." *Mol. Biol. Cell* **16**(7): 3152-3161.
- Morioka, K., C. Tanikawa, et al. (2009). "Orphan receptor tyrosine kinase ROR2 as a potential therapeutic target for osteosarcoma." *Cancer Sci* **100**(7): 1227-1233.
- Morrison, S. J., A. M. Wandycz, et al. (1996). "The aging of hematopoietic stem cells." *Nat Med* **2**(9): 1011-1016.
- Mowat, M., A. Cheng, et al. (1985). "Rearrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemic cells transformed by Friend virus." *Nature* **314**(6012): 633-636.
- Müschen, M., S. Lee, et al. (2002). "Molecular portraits of B cell lineage commitment." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(15): 10014-10019.

- Muller, H. J. (1938). "The remaking of chromosomes." *Collecting Net* **13**: 181-198.
- Nagasawa, H., S. A. Latt, et al. "Effects of X-irradiation on cell-cycle progression, induction of chromosomal aberrations and cell killing in ataxia telangiectasia (AT) fibroblasts." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **148**(1-2): 71-82.
- Nagasawa, H. and J. B. Little (1983). "Comparison of kinetics of X-ray-induced cell killing in normal, ataxia telangiectasia and hereditary retinoblastoma fibroblasts." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **109**(2): 297-308.
- Nakamura, T., G. Morin, et al. (1997). "Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human." *Science* **277**(5328): 955-959.
- Narita, M., S. Nunez, et al. (2003). "Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence." *Cell* **113**(6): 703-716.
- Nath, A., M. Krauthammer, et al. (2009). "Proteomic-based detection of a protein cluster dysregulated during cardiovascular development identifies biomarkers of congenital heart defects." *PLoS One* **4**(1): e4221.
- Naylor, S., M. Smalley, et al. (2000). "Retroviral expression of Wnt-1 and Wnt-7b produces different effects in mouse mammary epithelium." *J Cell Sci* **113** (Pt 12): 2129-2138.
- Nelson, W. and R. Nusse (2004). "Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways." *Science* **303**(5663): 1483-1487.
- Nicholson, K. M. and N. G. Anderson (2002). "The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy." *Cellular Signalling* **14**(5): 381-395.
- Nishio, K. and A. Inoue (2005). "Senescence-associated alterations of cytoskeleton: extraordinary production of vimentin that anchors cytoplasmic p53 in senescent human fibroblasts." *Histochemistry and Cell Biology* **123**(3): 263-273.
- Nishio, K., A. Inoue, et al. (2001). "Senescence and cytoskeleton: overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts." *Histochemistry and Cell Biology* **116**(4): 321-327.
- Nishita, M., S. Itsukushima, et al. (2010). "Ror2/Frizzled Complex Mediates Wnt5a-Induced AP-1 Activation by Regulating Dishevelled Polymerization." *Mol. Cell. Biol.* **30**(14): 3610-3619.
- Noda, A., Y. Ning, et al. (1994). "Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen." *Exp Cell Res* **211**(1): 90-98.
- Nusse, R., A. Brown, et al. (1991). "A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family." *Cell* **64**(2): 231.
- Nusse, R., H. Theunissen, et al. (1990). "The Wnt-1 (int-1) oncogene promoter and its mechanism of activation by insertion of proviral DNA of the mouse mammary tumor virus." *Mol Cell Biol* **10**(8): 4170-4179.
- Nusse, R. and H. E. Varmus (1982). "Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome." *Cell* **31**(1): 99-109.
- Nygren, M., G. Døsen-Dahl, et al. (2009). "beta-catenin is involved in N-cadherin-dependent adhesion, but not in canonical Wnt signaling in E2A-PBX1-positive B acute lymphoblastic leukemia cells." *Exp Hematol* **37**(2): 225-233.
- O'Connell, M. P., J. L. Fiori, et al. (2009). "The orphan tyrosine kinase receptor, ROR2, mediates Wnt5A signaling in metastatic melanoma." *Oncogene* **29**(1): 34-44.
- O'Connell, M. P., J. L. Fiori, et al. (2010). "The orphan tyrosine kinase receptor, ROR2, mediates Wnt5A signaling in metastatic melanoma." *Oncogene* **29**(1): 34-44.
- O'Connor, M. S., A. Safari, et al. (2006). "A critical role for TPP1 and TIN2 interaction in high-order telomeric complex assembly." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(32): 11874-11879.
- Odziozola, L., G. Singh, et al. (2007). "Regulation of PTEN Activity by Its Carboxyl-terminal Autoinhibitory Domain." *Journal of Biological Chemistry* **282**(32): 23306-23315.
- Oender, K., A. Trost, et al. (2008). "Cytokeratin-related loss of cellular integrity is not a major driving force of human intrinsic skin aging." *Mechanisms of Ageing and Development* **129**(10): 563-571.
- Ohira, T., R. Gemmill, et al. (2003). "WNT7a induces E-cadherin in lung cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(18): 10429-10434.
- Ohtani, K., J. DeGregori, et al. (1995). "Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(26): 12146-12150.
- Ohtani, N., Z. Zebede, et al. (2001). "Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence." *Nature* **409**(6823): 1067-1070.
- Oishi, I., H. Suzuki, et al. (2003). "The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway." *Genes Cells* **8**(7): 645-654.
- Oliner, J. D., J. A. Pieterpol, et al. (1993). "Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53." *Nature* **362**(6423): 857-860.
- Olovnikov, A. (1973). "A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon." *J Theor Biol* **41**(1): 181-190.

- Olson, D. and D. Gibo (1998). "Antisense wnt-5a mimics wnt-1-mediated C57MG mammary epithelial cell transformation." *Exp Cell Res* **241**(1): 134-141.
- Olumi, A. F., G. D. Grossfeld, et al. (1999). "Carcinoma-associated Fibroblasts Direct Tumor Progression of Initiated Human Prostatic Epithelium." *Cancer Research* **59**(19): 5002-5011.
- Oren, M., W. Maltzman, et al. (1981). "Post-translational regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells." *Mol. Cell. Biol.* **1**(2): 101-110.
- Östman, A. and M. Augsten (2009). "Cancer-associated fibroblasts and tumor growth - bystanders turning into key players." *Current Opinion in Genetics & Development* **19**(1): 67-73.
- Packer, L. and K. Fuehr (1977). "Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells." *Nature* **267**(5610): 423-425.
- Parada, L. F., H. Land, et al. (1984). "Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation." *Nature* **312**(5995): 649-651.
- Parrinello, S., J. Coppe, et al. (2005). "Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation." *J Cell Sci* **118**(Pt 3): 485-496.
- Patthy, L. (2000). "The WIF module." *Trends in Biochemical Sciences* **25**(1): 12-13.
- Paull, T. T., E. P. Rogakou, et al. (2000). "A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage." *Current Biology* **10**(15): 886-895.
- Pearson, M., R. Carbone, et al. (2000). "PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras." *Nature* **406**(6792): 207-210.
- Pendergrass, W. R., M. A. Lane, et al. (1999). "Cellular proliferation potential during aging and caloric restriction in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*)." *J Cell Physiol* **180**(1): 123-130.
- Peso, L. d., M. Gonzalez-Garcia, et al. (1997). "Interleukin-3-Induced Phosphorylation of BAD Through the Protein Kinase Akt." *Science* **278**(5338): 687-689.
- Peters, G., S. Brookes, et al. (1983). "Tumorigenesis by mouse mammary tumor virus: evidence for a common region for provirus integration in mammary tumors." *Cell* **33**(2): 369-377.
- Price, J. S., J. G. Waters, et al. (2002). "The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis." *Aging Cell* **1**(1): 57-65.
- Pugazhenthii, S., A. Nesterova, et al. (2000). "Akt/Protein Kinase B Up-regulates Bcl-2 Expression through cAMP-response Element-binding Protein." *Journal of Biological Chemistry* **275**(15): 10761-10766.
- Pukrop, T., F. Klemm, et al. (2006). "Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(14): 5454-5459.
- Rafii, S., D. Lyden, et al. (2002). "Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy?" *Nat Rev Cancer* **2**(11): 826-835.
- Rahman, R., N. R. Forsyth, et al. (2008). "Telomeric 3'-overhang length is associated with the size of telomeres." *Exp Gerontol* **43**(4): 258-265.
- Rao, A., C. Luo, et al. (1997). "Transcription factors of the NFAT family: regulation and function." *Annu Rev Immunol* **15**: 707-747.
- Reischl, J., S. Schwenke, et al. (2007). "Increased expression of Wnt5a in psoriatic plaques." *J Invest Dermatol* **127**(1): 163-169.
- Ressler, S., J. Bartkova, et al. (2006). "p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin." *Aging Cell* **5**(5): 379-389.
- Rijsewijk, F., M. Schuermann, et al. (1987). "The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless." *Cell* **50**(4): 649-657.
- Rijsewijk, F., L. van Deemter, et al. (1987). "Transfection of the int-1 mammary oncogene in cuboidal RAC mammary cell line results in morphological transformation and tumorigenicity." *EMBO J* **6**(1): 127-131.
- Roberson, R. S., S. J. Kussick, et al. (2005). "Escape from Therapy-Induced Accelerated Cellular Senescence in p53-Null Lung Cancer Cells and in Human Lung Cancers." *Cancer Research* **65**(7): 2795-2803.
- Rochette, P. J. and D. E. Brash (2008). "Progressive apoptosis resistance prior to senescence and control by the anti-apoptotic protein BCL-xL." *Mechanisms of Ageing and Development* **129**(4): 207-214.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, et al. (1998). "DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139." *Journal of Biological Chemistry* **273**(10): 5858-5868.
- Rohme, D. (1981). "Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts in vitro and erythrocytes in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(8): 5009-5013.
- Román-Gómez, J., L. Cordeu, et al. (2007). "Epigenetic regulation of Wnt-signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia." *Blood* **109**(8): 3462-3469.
- Romashkova, J. A. and S. S. Makarov (1999). "NF- κ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling." *Nature* **401**(6748): 86-90.

- Ross, M., X. Zhou, et al. (2003). "Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling." *Blood* **102**(8): 2951-2959.
- Rotter, V. (1983). "p53, a transformation-related cellular-encoded protein, can be used as a biochemical marker for the detection of primary mouse tumor cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(9): 2613-2617.
- Saneyoshi, T., S. Kume, et al. (2002). "The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos." *Nature* **417**(6886): 295-299.
- Schmitt, C., J. Fridman, et al. (2002). "A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy." *Cell* **109**(3): 335-346.
- Schmitt, C. A., J. S. Fridman, et al. (2002). "A Senescence Program Controlled by p53 and p16INK4a Contributes to the Outcome of Cancer Therapy." *Cell* **109**(3): 335-346.
- Schoppmann, S. F., P. Birner, et al. (2002). "Tumor-Associated Macrophages Express Lymphatic Endothelial Growth Factors and Are Related to Peritumoral Lymphangiogenesis." *Am J Pathol* **161**(3): 947-956.
- Scolnick, D. M., N. H. Chehab, et al. (1997). "CREB-binding Protein and p300/CBP-associated Factor Are Transcriptional Coactivators of the p53 Tumor Suppressor Protein." *Cancer Research* **57**(17): 3693-3696.
- Semenov, M., R. Habas, et al. (2007). "SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways." *Cell* **131**(7): 1378.
- Seměnov, M., K. Tamai, et al. (2001). "Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6." *Curr Biol* **11**(12): 951-961.
- Sercan, Z., M. Pehlivan, et al. (2010). "Expression profile of WNT, FZD and sFRP genes in human hematopoietic cells." *Leuk Res.*
- 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): 704-707.
- Serrano, M., A. Lin, et al. (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." *Cell* **88**(5): 593-602.
- Severino, J., R. Allen, et al. (2000). "Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo?" *Exp Cell Res* **257**(1): 162-171.
- Sfeir, A., S. Kabir, et al. (2010). "Loss of Rap1 induces telomere recombination in the absence of NHEJ or a DNA damage signal." *Science* **327**(5973): 1657-1661.
- Sfeir, A. J., W. Chai, et al. (2005). "Telomere-end processing the terminal nucleotides of human chromosomes." *Mol Cell* **18**(1): 131-138.
- Shay, J. W., O. M. Pereira-Smith, et al. (1991). "A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence." *Experimental Cell Research* **196**(1): 33-39.
- Sheldahl, L. C., D. C. Slusarski, et al. (2003). "Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos." *The Journal of Cell Biology* **161**(4): 769-777.
- Shen, L., S. Zhou, et al. (2009). "Effects of age and gender on WNT gene expression in human bone marrow stromal cells." *J Cell Biochem* **106**(2): 337-343.
- Shimizu, H., M. Julius, et al. (1997). "Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin." *Cell Growth Differ* **8**(12): 1349-1358.
- Shin, S., B.-J. Sung, et al. (2001). "An Anti-apoptotic Protein Human Survivin Is a Direct Inhibitor of Caspase-3 and -7." *Biochemistry* **40**(4): 1117-1123.
- Slusarski, D., V. Corces, et al. (1997). "Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling." *Nature* **390**(6658): 410-413.
- Smith, A. E., R. Smith, et al. (1979). "Characterization of different tumor antigens present in cells transformed by simian virus 40." *Cell* **18**(2): 335-346.
- Smogorzewska, A. and T. de Lange (2002). "Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells." *EMBO J* **21**(16): 4338-4348.
- Sonderegger, S., P. Haslinger, et al. (2010). "Wingless (Wnt)-3A induces trophoblast migration and matrix metalloproteinase-2 secretion through canonical Wnt signaling and protein kinase B/AKT activation." *Endocrinology* **151**(1): 211-220.
- Sonderegger, S., P. Haslinger, et al. (2010). "Wingless (Wnt)-3A Induces Trophoblast Migration and Matrix Metalloproteinase-2 Secretion through Canonical Wnt Signaling and Protein Kinase B/AKT Activation." *Endocrinology* **151**(1): 211-220.
- Stambolic, V., A. Suzuki, et al. (1998). "Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN." *Cell* **95**(1): 29-39.
- Stein, G., M. Beeson, et al. (1990). "Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts." *Science* **249**(4969): 666-669.
- Stein, G. H., L. F. Drullinger, et al. (1999). "Differential Roles for Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p21 and p16 in the Mechanisms of Senescence and Differentiation in Human Fibroblasts." *Mol. Cell. Biol.* **19**(3): 2109-2117.
- Stewart, G. S., B. Wang, et al. (2003). "MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint." *Nature* **421**(6926): 961-966.

- Stewart, S. A., I. Ben-Porath, et al. (2003). "Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence." *Nat Genet* **33**(4): 492-496.
- Szostak, J. W. and E. H. Blackburn (1982). "Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors." *Cell* **29**(1): 245-255.
- Takai, H., A. Smogorzewska, et al. (2003). "DNA Damage Foci at Dysfunctional Telomeres." *Current Biology* **13**(17): 1549-1556.
- Tamai, K., M. Semenov, et al. (2000). "LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction." *Nature* **407**(6803): 530-535.
- Tamai, K., X. Zeng, et al. (2004). "A mechanism for Wnt coreceptor activation." *Mol Cell* **13**(1): 149-156.
- te Poele, R. H., A. L. Okorokov, et al. (2002). "DNA Damage Is Able to Induce Senescence in Tumor Cells in Vitro and in Vivo." *Cancer Research* **62**(6): 1876-1883.
- Teh, M., D. Blaydon, et al. (2007). "Role for WNT16B in human epidermal keratinocyte proliferation and differentiation." *J Cell Sci* **120**(Pt 2): 330-339.
- Teh, M. T., D. Blaydon, et al. (2007). "Role for WNT16B in human epidermal keratinocyte proliferation and differentiation." *J Cell Sci* **120**(Pt 2): 330-339.
- Tomás-Loba, A., I. Flores, et al. (2008). "Telomerase Reverse Transcriptase Delays Aging in Cancer-Resistant Mice." *Cell* **135**(4): 609-622.
- Torisu, H., M. Ono, et al. (2000). "Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: Possible involvement of TNF α and IL-1 α ." *International Journal of Cancer* **85**(2): 182-188.
- Tsung, K., J. P. Dolan, et al. (2002). "Macrophages as Effector Cells in Interleukin 12-induced T Cell-dependent Tumor Rejection." *Cancer Research* **62**(17): 5069-5075.
- van 't Veer, L. J., A. G. van Kessel, et al. (1984). "Molecular cloning and chromosomal assignment of the human homolog of int-1, a mouse gene implicated in mammary tumorigenesis." *Mol Cell Biol* **4**(11): 2532-2534.
- van Ooyen, A., V. Kwee, et al. (1985). "The nucleotide sequence of the human int-1 mammary oncogene; evolutionary conservation of coding and non-coding sequences." *EMBO J* **4**(11): 2905-2909.
- van Steensel, B. and T. de Lange (1997). "Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1." *Nature* **385**(6618): 740-743.
- van Steensel, B., A. Smogorzewska, et al. (1998). "TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions." *Cell* **92**(3): 401-413.
- Veeman, M., J. Axelrod, et al. (2003). "A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling." *Dev Cell* **5**(3): 367-377.
- Venteicher, A. S., E. B. Abreu, et al. (2009). "A Human Telomerase Holoenzyme Protein Required for Cajal Body Localization and Telomere Synthesis." *Science* **323**(5914): 644-648.
- Venteicher, A. S., Z. Meng, et al. (2008). "Identification of ATPases Pontin and Reptin as Telomerase Components Essential for Holoenzyme Assembly." *Cell* **132**(6): 945-957.
- Vogelstein, B., E. R. Fearon, et al. (1988). "Genetic alterations during colorectal-tumor development." *N Engl J Med* **319**(9): 525-532.
- von Zglinicki, T., G. Saretzki, et al. (1995). "Mild Hyperoxia Shortens Telomeres and Inhibits Proliferation of Fibroblasts: A Model for Senescence?" *Experimental Cell Research* **220**(1): 186-193.
- Wainwright, B. J., P. J. Scambler, et al. (1988). "Isolation of a human gene with protein sequence similarity to human and murine int-1 and the Drosophila segment polarity mutant wingless." *EMBO J* **7**(6): 1743-1748.
- Wajapeyee, N., R. Serra, et al. (2008). "Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7." *Cell* **132**(3): 363-374.
- Wang, E. (1995). "Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved." *Cancer Res* **55**(11): 2284-2292.
- Wang, H., F. Tekpetey, et al. (2009). "Identification of WNT/beta-CATENIN signaling pathway components in human cumulus cells." *Mol Hum Reprod* **15**(1): 11-17.
- Wang, Q., A. J. Symes, et al. (2010). "A novel role for Wnt/Ca²⁺ signaling in actin cytoskeleton remodeling and cell motility in prostate cancer." *PLoS ONE* **5**(5): e10456.
- Webley, K., J. A. Bond, et al. (2000). "Posttranslational Modifications of p53 in Replicative Senescence Overlapping but Distinct from Those Induced by DNA Damage." *Mol. Cell. Biol.* **20**(8): 2803-2808.
- Weeraratna, A., Y. Jiang, et al. (2002). "Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma." *Cancer Cell* **1**(3): 279-288.
- Wehrli, M., S. T. Dougan, et al. (2000). "arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling." *Nature* **407**(6803): 527-530.
- Wei, W., U. Herbig, et al. (2003). "Loss of retinoblastoma but not p16 function allows bypass of replicative senescence in human fibroblasts." *EMBO Rep* **4**(11): 1061-1066.
- Wennerberg, K., K. L. Rossman, et al. (2005). "The Ras superfamily at a glance." *J Cell Sci* **118**(5): 843-846.
- West, S. C. (2003). "Molecular views of recombination proteins and their control." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(6): 435-445.

- Wiemann, S. U., A. Satyanarayana, et al. (2002). "Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis." *FASEB J* **16**(9): 935-942.
- Willert, K., J. Brown, et al. (2003). "Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors." *Nature* **423**(6938): 448-452.
- Winn, R., L. Marek, et al. (2005). "Restoration of Wnt-7a expression reverses non-small cell lung cancer cellular transformation through frizzled-9-mediated growth inhibition and promotion of cell differentiation." *J Biol Chem* **280**(20): 19625-19634.
- Winn, R., M. Van Scoyk, et al. (2006). "Antitumorigenic effect of Wnt 7a and Fzd 9 in non-small cell lung cancer cells is mediated through ERK-5-dependent activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma." *J Biol Chem* **281**(37): 26943-26950.
- Winn, R. A., M. Van Scoyk, et al. (2006). "Antitumorigenic Effect of Wnt 7a and Fzd 9 in Non-small Cell Lung Cancer Cells Is Mediated through ERK-5-dependent Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ ." *Journal of Biological Chemistry* **281**(37): 26943-26950.
- Witte, F., J. Dokas, et al. (2009). "Comprehensive expression analysis of all Wnt genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation." *Gene Expr Patterns* **9**(4): 215-223.
- Wolf, D., N. Harris, et al. (1984). "Reconstitution of p53 expression in a nonproducer Ab-MuLV-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene." *Cell* **38**(1): 119-126.
- Wong, G., B. Gavin, et al. (1994). "Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes." *Mol Cell Biol* **14**(9): 6278-6286.
- Wong, H. and K. Riabowol (1996). "Differential CDK-inhibitor gene expression in aging human diploid fibroblasts." *Exp Gerontol* **31**(1-2): 311-325.
- Wu, P., M. van Overbeek, et al. (2010). "Apollo Contributes to G Overhang Maintenance and Protects Leading-End Telomeres." *Molecular Cell* **39**(4): 606-617.
- Wu, Q., C. Zierold, et al. (2009). "Dysregulation of Frizzled 6 is a critical component of B-cell leukemogenesis in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia." *Blood* **113**(13): 3031-3039.
- Xie, A., A. Hartlerode, et al. (2007). "Distinct Roles of Chromatin-Associated Proteins MDC1 and 53BP1 in Mammalian Double-Strand Break Repair." *Molecular Cell* **28**(6): 1045-1057.
- Xin, H., D. Liu, et al. (2008). "The telosome/shelterin complex and its functions." *Genome Biol* **9**(9): 232.
- Yang, N. and M. Hu (2005). "The limitations and validities of senescence associated-beta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells." *Exp Gerontol* **40**(10): 813-819.
- Ye, J. Z., D. Hockemeyer, et al. (2004). "POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex." *Genes Dev* **18**(14): 1649-1654.
- Ye, X., B. Zerlanko, et al. (2007). "Downregulation of Wnt signaling is a trigger for formation of facultative heterochromatin and onset of cell senescence in primary human cells." *Mol Cell* **27**(2): 183-196.
- You, Z., C. Chahwan, et al. (2005). "ATM Activation and Its Recruitment to Damaged DNA Require Binding to the C Terminus of Nbs1." *Mol. Cell. Biol.* **25**(13): 5363-5379.
- Young, A. R. J. and M. Narita (2009). "SASP reflects senescence." *EMBO Rep* **10**(3): 228-230.
- Zhang, H. S., A. A. Postigo, et al. (1999). "Active Transcriptional Repression by the Rb E2F Complex Mediates G1 Arrest Triggered by p16INK4a, TGF β , and Contact Inhibition." *97*(1): 53-61.
- Zhang, R., M. V. Poustovoitov, et al. (2005). "Formation of MacroH2A-Containing Senescence-Associated Heterochromatin Foci and Senescence Driven by ASF1a and HIRA." *Developmental Cell* **8**(1): 19-30.
- Zhong, Z., L. Shiue, et al. (1992). "A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro." *Mol Cell Biol* **12**(11): 4834-4843.
- Zou, L., D. Cortez, et al. (2002). "Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin." *Genes Dev* **16**(2): 198-208.
- Zou, L., D. Liu, et al. (2003). "Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 13827-13832.

ANNEXES

1. PUBLICATION N°3

EXPRESSION OF CANDIDATE TUMOR SUPPRESSOR GENE *ING2* IS LOST IN NON-SMALL CELL LUNG CARCINOMA.

Ythier D, Brambilla E, Binet R, Nissou D, Vesin A, de Fraipont F, Moro-Sibilot D, Lantuejoul S, Brambilla C, Gazzeri S, Pedeux R.

Lung Cancer. 2010 Aug;69(2):180-6. Epub 2009 Dec 4.



Contents lists available at ScienceDirect

Lung Cancer

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lungcan

Expression of candidate tumor suppressor gene ING2 is lost in non-small cell lung carcinoma

Damien Ythier^{a,b}, Elisabeth Brambilla^{a,b,c}, Romuald Binet^{a,b}, Damien Nissou^a, Aurélien Vesin^d, Florence de Fraipont^e, Denis Moro-Sibilot^{a,b,f}, Sylvie Lantuejoul^{a,b,c}, Christian Brambilla^{a,b,f}, Sylvie Gazzeri^{a,b}, Rémy Pedoux^{a,b,*}

^a Molecular Basis of Lung Cancer Progression, INSERM U823, Albert Bonniot Institute, 38706 La Tronche Cedex, France

^b Joseph Fourier University, 38041 Grenoble Cedex 09, France

^c Anatomy department and Pathological Cytology, Albert Michallon Hospital, BP217, 38043 Grenoble Cedex 09, France

^d Epidemiology of Cancers and Severe Diseases INSERM U823, Albert Bonniot Institute, 38706 La Tronche Cedex, France

^e Biological Oncology and Biotherapies, Pole of Biology, CHU Grenoble, France

^f Pole of Acute Medicine, Pneumology, Albert Michallon Hospital, BP217, 38043 Grenoble Cedex 09, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 August 2009

Received in revised form 3 November 2009

Accepted 5 November 2009

Keywords:

ING1

ING3

ING4

ING5

ABSTRACT

ING2 is a candidate tumor suppressor gene involved in cell cycle control, apoptosis and senescence. Furthermore, we have recently shown that loss of ING2 expression is associated with increased genome instability. We investigated its status in a series of 120 non-small cell lung cancer (NSCLC) by using immunohistochemistry (IHC). The results showed that ING2 protein expression is downregulated in more than 50% of NSCLC, with a higher frequency in adenocarcinoma (ADK) as compared to squamous cell carcinoma (SCC) (68% versus 45%, $P=0.021$). Loss of ING2 expression occurs in a high proportion of tumors from stage I and was not associated with patient's gender, age and 5-year survival. When investigating the possible mechanisms responsible for the decrease of ING2 expression, we did not observe any loss of heterozygosity or mutation in the ING2 gene. However, in 95% of the cases examined, we identified a silent single nucleotide polymorphism (SNP). By using quantitative RT-PCR, we found that ING2 loss of expression may be due to the decrease of its mRNA level. Analysis of CpG islands present in the promoter region of the ING2 gene did not allow for the detection of methylation. Mechanistically, although p53 can regulate ING2 transcription and ING2 enhances p53 activity, no correlation between ING2 and p53 IHC status was observed. Overall, these results indicate that loss of ING2 expression could contribute to lung tumorigenesis independently of p53.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lung cancer is the main cause of cancer deaths worldwide, claiming more lives than breast, colon and prostate cancer combined. Early diagnosis allowing for surgical resection has a 60–80% 5-year survival, but is performed in less than 25% of all patients, stressing the need for identifying molecular biomarkers to improve early detection and therapies. Lung carcinogenesis is associated with multifocal morphologic transformation and multistep accumulation of genetic and epigenetic alterations due to carcinogens exposure (tobacco, asbestos, etc.) targeting genes controlling the

cell cycle, DNA repair, apoptosis, senescence, differentiation and cell migration. Genotoxic effects of tobacco components have been well described, leading to the inactivation of tumor suppressor genes such as TP53 and RB, and to the activation of oncogenes such as KRAS [1–4]. Although several tumor suppressor genes involved in lung tumorigenesis have been identified, many others remain to be discovered [5].

A screen designed to identify new tumor suppressor genes allowed the discovery of the ING (Inhibitor of Growth) gene in 1996 [6]. Several studies have suggested that ING1 protein is involved in cell cycle regulation, DNA repair, apoptosis, senescence and neoplastic transformation [6–9]. Subsequently, homology searches have allowed the identification of the ING gene family (ING1–5) [10–13]. ING proteins are characterized by the presence of a nuclear localization sequence (NLS) and a plant homeodomain (PHD) in their C-terminal region. The ING2 gene is a member of the family that shares the highest homology with ING1. ING2 protein has been shown to mediate cell cycle arrest in G1-phase and to induce apop-

* Corresponding author at: Room 112, Institut Albert Bonniot, INSERM U823, UJF-Domaine de la Merci, 38706 La Tronche Cedex, France. Tel.: +33 4 76 54 94 64; fax: +33 4 76 54 94 13.

E-mail addresses: remy.pedoux@ujf-grenoble.fr, remy.pedoux@univ-rennes1.fr (R. Pedoux).

tosis [12]. ING2 cooperates with p300 to enhance p53 acetylation in order to induce cellular senescence [14]. In addition, ING2 has been proposed to regulate responses to DNA damage by acting as a phosphoinositide nuclear receptor [15]. The PHD of ING2 has a high affinity for the histone 3 tri-methylated on lysine 4 (H3K4(CH₃)₃) [16,17]. This interaction allows the repression of Cyclin D1 and c-myc by recruiting the deacetylase complex Sin3A/HDAC1 onto their promoters in response to stress. Recently, it has been reported that p53 could repress ING2 expression by binding two p53–DNA binding consensus sequences present in its promoter [18].

In human tumors, the expression of ING genes is frequently lost or downregulated [19]. Most of these studies have been conducted on ING1 and have shown that ING1 mutation is a rare event, but when it occurs, mutations are found in two critical domains: the NLS and the PHD [20]. A majority of studies have reported a strong decrease or loss of ING1 at the mRNA level. In lung tumors, ING1 mRNA expression is reduced in 42% of cases, suggesting that ING1 could play a role in lung carcinogenesis [21]. Since ING2 shares strong homology and function with ING1 [22], and since downregulation of ING2 expression has been reported in several lung cancer cell lines [23], we investigated the status of ING2 in NSCLC. Our results demonstrate that expression of ING2 protein is frequently downregulated in NSCLC by a mechanism which may involve the decrease of its mRNA expression level. These data highlight ING2 as a gene whose deregulation could contribute to lung carcinogenesis.

2. Materials and methods

2.1. Tissue samples

One hundred and twenty human lung tumors were included in this study. They consisted of 71 adenocarcinomas and 49 squamous cell carcinomas (see Table 1). Tissue samples were taken at the time of surgical resection of lung tumors. Tumor tissues and normal lung parenchyma were immediately frozen and stored at -80°C until use. For histological classification, tumor samples were fixed in formalin and the diagnoses were made on paraffin-embedded material using the current World Health Organization International Histological Classification of Lung Tumors criteria [24].

2.2. Immunohistochemistry

ING2 and p53 immunohistochemical analyses were carried out on formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections. Tissue sections were dehydrated in xylene and rehydrated in graded ethanol solutions. Endogenous peroxidase activity was blocked by immersion in H₂O₂ solution. Cut sections were boiled for 60 min in citrate buffer (pH6) for heat-induced epitope retrieval. Immunodetections were performed using the Ventana Autostainer (Ventana Medical International Inc., Illkirch, France). The primary antibodies ING2 (KMP1 [12]) and P53 (DO-7, Santa Cruz) were used at a 1:100 dilution for 1 h. Slide incubation with normal rabbit or mouse IgG at the same concentration as the primary antibodies, as well as competition with ING2 immunization peptide, served as negative controls.

2.3. Immunohistochemical staining evaluation

Immunostainings were evaluated by two independent observers (SL and EB) in distinct areas of slide sections for correlation and confirmation of tissues analysis and scored by taking into account tumor heterogeneity. A final score (0–300) was established by multiplying the percentage of labeled cells (0–100%) with the intensity of staining (1, 2 or 3). Subsequently, tumor samples were divided into two classes as follows: for ING2 class 0, score ≤ 50 ; class 1, score > 50 ; for p53 class 0, score

≤ 40 ; class 1, score > 40 . For ING2, samples with a score > 50 were considered as tumor with normal ING2 expression. For p53, samples with a score > 40 were considered as a mutant profile as previously established [25]. In all the slides analyzed, the type two pneumocytes present in the normal lung tissue surrounding the tumor, as well as lymphocytes present within the tumor, were used as the positive internal control.

2.4. Statistical analysis

The association of ING2 expression with histological type and tumor staging was assessed using the Chi square test. The same test was used to investigate the relationship between ING2 expression and p53 status. Kaplan–Meier estimates were computed to compare the overall survival of patients according to their value regarding ING2 expression and p53 status (individually and combined). The Log rank test was used to test for differences between survival curves. All tests were two-tailed and *p* values < 0.05 were considered significant. The statistical analyses were done using SAS 9.13 (Cary, NC) and R 2.4.0 (R foundation, Vienna, Austria).

2.5. RNA isolation and RT-PCR

Tumor samples and their matched normal lung tissue were ground with a Potter homogenizer in Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and total RNAs were isolated according to the manufacturer's recommendations. RNA purity was assessed by spectrophotometry with A260/A280 ratios > 1.7 . One to 5 μg of RNA were used for reverse transcription using SuperScript[®] III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen) according to manufacturer instructions. cDNAs were then submitted to Real-Time PCR using Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). 18S primers were used for normalization and MX Pro software (Stratagene) was used for analysis. The following primer pairs were used: ING2 forward 5'-TGC TAC GTG CAG GAC TAC CTT-3' and ING2 reverse 5'-GAC ACG TTC CTC TGC ATG TC-3', 18S forward 5'-CGC CGC TAG AGG TGA AAT TC-3' and 18S reverse 5'-TTG GCA AAT GCT TTC GCT C-3'.

2.6. Genomic DNA extraction and sequencing

Genomic DNA from frozen tumors and normal lung tissues samples were digested with proteinase K and extracted using the DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) according to the manufacturer's recommendations. The two reverse primers specific for ING2 exons 1 and 2 were: 5'-TGT CAC GGG AGA AAG GGA AG-3' and 5'-CCC TCT TCC TGT TCC CTG CTC-3', respectively.

2.7. DNA methylation analysis

ING2 gene methylation analysis was performed on lung tumors and their normal related tissue after bisulfite DNA conversion with a CpGenome DNA modification kit (MP Biomedicals, Illkirch, France). DNA was then analyzed by methylation-specific PCR (MSP). For MSP, DNA was amplified with FastStart DNA polymerase (Roche, Meylan, France) using specific primers for the methylated or unmethylated sequences of the three regions analyzed (see Fig. 4). The sequences of primers used to amplify and detect the unmethylated ING2 promoter were: (forward) 5'-GTTTTAGGTTGTTTAAAAGGAATT-3' and (reverse) 5'-CTAAAAAAACAACCACTCCAC-3' for region 1; (forward) 5'-GGGTGTGAGATGGTATT-3' and (reverse) 5'-ACCCAAAACAAAACAAA-3' for region 2; (forward) 5'-TAGTAATTGTATTTGTTGGTTGT-3' and (reverse) 5'-TCACAACACAAACATTCCT-3' for region 3. The sequences

of primers used to amplify and detect methylated ING2 promoter were: (forward) 5'-TTAGGTCGTTCCGAAAAGGAATC-3' and (reverse) 5'-TAAAAAACAACCTCCAACCTCCG-3' for region 1; (forward) 5'-GGTTGCGAGACGGTATTC-3' and (reverse) 5'-CCCAAAAACGAAACGAAA-3' for region 2; (forward) 5'-TAATTGTATTCGTCGGTCGC-3' and (reverse) 5'-TCGCAACACAAA-CACGTT-3' for region 3. DNA from peripheral blood lymphocytes (Buffy coat), treated or untreated with Sss1 methyltransferase (New England Biolabs, Ozyme, St. Quentin Yvelines, France) was used as a positive and negative control respectively. PCR products were analyzed using 3% agarose gel electrophoresis.

3. Results

3.1. ING2 protein expression is lost in lung tumors

One hundred and twenty cases of NSCLC were analyzed in this study. Their clinicopathological features are summarized in Table 1. They consisted in 71 ADK and 49 SCC. There were 90 males and 30 females and the median age was 65 years old, ranging from age 36 to 86 years. First, we examined ING2 protein expression by IHC in these tumor samples and their matched normal tissues. Samples were scored as described in Section 2. In normal lung tissue, ING2 shows a strong nuclear staining of Type II pneumocytes in the alveolar and bronchiolar epithelium (Fig. 1). ING2 score was greater than 100 in more than 90% of the tissues examined and a score higher than 50 was observed in all cases. As compared to normal lung, lung tumors exhibited a general decrease of ING2 expression. Initially, we considered three populations: normal expression (score >120), low expression (50 < score ≤ 120) and lost expression (score

Table 1

Clinicopathological parameters of 120 NSCLC cases.

	No. of patients	%
Age		
≤65	62	52
>65	58	48
Gender		
Male	90	75
Female	30	25
NSCLC subtype		
ADK	71	59
SCC	49	41
Pathological stage		
Stage I	32	26
Stage II	38	32
Stage III	38	32
Stage IV	12	10
Total NSCLC	120	100

≤50). However, since ING genes have been proposed as candidate tumor suppressor genes and since tumor suppressor genes are inactivated or lost in tumors, we have focused our analysis on tumor samples whose ING2 expression is lost. Therefore, for the analysis of ING2 expression in NSCLC, we considered two populations: normal expression (score >50) and lost expression (score ≤50). According to this, loss of ING2 expression is observed in 58% (70/120) of NSCLC (Table 2). ING2 loss is more frequent in ADK, 68% (48/71), than in SCC, 45% (22/49) (χ^2 -test, $P=0.021$). No relationship was observed between ING2 IHC status and gender or stage. Previous reports have

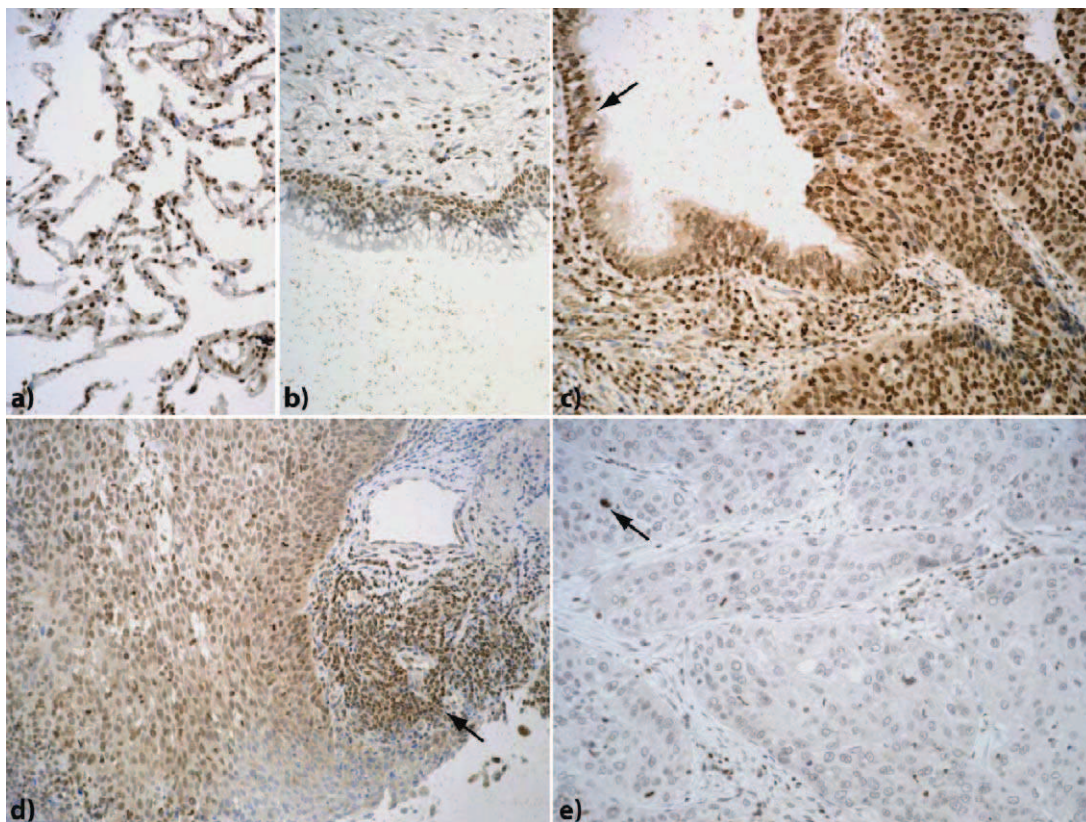


Fig. 1. Immunostaining of normal lung parenchyma and lung cancer tissue using an anti-ING2 polyclonal antibody (KMP1). (a) In normal lung, ING2 is expressed with nuclear staining in alveolar pneumocytes at a moderate to high score (mean 100), (b) and in bronchial and bronchiolar epithelial basal cells as well as lymphocytes. (c) Strong expression with nuclear staining (score 240) in squamous cell carcinoma as well as in normal bronchial cells (→). (d) Moderate ING2 expression in a squamous cell carcinoma (score 100) as compared to normal lymphocytes (score 200) (→). (e) Negative ING2 expression (score 0) in a solid type adenocarcinoma as compared with lymphocytes (score 200).

Table 2
Immunohistochemical analysis of ING2 expression in NSCLC.

	No. of patients	ING2 expression		
		Normal	Loss	P
Gender				
Male	90	39	51	0.18
Female	30	11	19	
Age				
≤65	62	30	32	0.08
>65	58	18	40	
Histological type				
ADK	71	23	48	0.02
SCC	49	27	22	
NSCLC pathological stage				
Stage I	32	14	18	0.85
Stage II	38	14	24	
Stage III	38	16	22	
Stage IV	12	6	6	
ADK pathological stage				
Stage I	18	8	10	0.34
Stage II	18	3	15	
Stage III	27	9	18	
Stage IV	8	3	5	
SCC pathological stage				
Stage I	14	6	8	0.61
Stage II	20	11	9	
Stage III	11	7	4	
Stage IV	4	3	1	

ING2 Normal: score >50; ING2 Loss: score ≤50; P: Chi square test P value.

indicated that loss of ING1 or ING2 expression is able to extend replicative lifespan [9,14]. However, no difference in loss of ING2 expression in patients below or above age 65 was observed. No difference in patient survival is observed when taking into account ING2 status (loss versus normal expression) in NSCLC, ADK or SCC (data not shown). However, we noticed that a large proportion of tumor samples exhibited a loss of ING2 expression from Stage I (56%, 18/32) both in ADK (55%, 10/18) and SCC (57%, 8/14) (Table 2). No statistical difference in the proportion of ING2 loss was observed between samples of Stage I, II, III or IV.

3.2. Loss of ING2 expression occurs at the RNA level

To determine the mechanism(s) by which ING2 loss of expression occurs in lung tumors, we first investigated ING2 gene deletion by loss of heterozygosity (LOH). A set of 12 tumors was analyzed: 7 ADK (five with lost ING2 expression) and 5 SCC (three with lost ING2 expression). Genomic DNA from these 12 tumor samples and their matched normal tissues were extracted, and subjected to PCR analysis using specific primers for five microsatellite markers surrounding the ING2 gene [26]. No LOH was observed (data not shown). We next investigated the presence of mutations within the ING2 gene in the samples. The ING2 gene is made of two exons, which were sequenced and compared to ING2 GenBank referenced sequence (accession number: NM.001564). A cytosine to a thymidine substitution was observed on nucleotide 39 on one or two

alleles both in tumors and their matched normal tissue. This substitution did not change the amino acid (alanine). To ensure that this mutation was not restricted to this set of 12 tumors, we performed sequencing on 10 additional tumors (5 out of 6 ADK and 2 out of 4 SCC with lost ING2 expression). Similar results were obtained and a total of 21 out of 22 cases exhibited a cytosine to thymidine change (15 cases, 68%: GCT, 6 cases, 27%: GCT/GCC and one case, 5%: GCC) (Fig. 2). The high rate of this substitution in our samples and its presence both in normal and the corresponding tumor tissue strongly suggests that it is a polymorphism (submitted to NCBI SNP database). Finally, we investigated ING2 mRNA expression by qPCR in the same set of 22 tumors and their matched normal lung tissue. In normal lung tissue we have observed that ING2 level of expression varies from 1- to 100-fold when normalizing with 28S RNA (data not shown). Thus, we have preferred to compare ING2 mRNA expression in tumors with their matched normal tissue instead of the mean of several normal lung tissues. A significant decrease in ING2 mRNA expression was found in 15 tumors. No significant change was observed in six cases, and in one case ING2 mRNA increased significantly (Fig. 3). Strikingly, all tumor samples with a decreased ING2 transcript also exhibited a loss of ING2 protein expression (Fig. 3). This correlation indicates that loss of ING2 expression could occur at the mRNA level.

3.3. The ING2 promoter is not methylated

Since promoter methylation is a general mechanism to inactivate mRNA expression of tumor suppressor genes, we investigated ING2 promoter methylation. Using the Methyl Primer Express Software (available at: <http://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=602121>), we identified three CpG islands within the promoter, first exon and intron of ING2 (Fig. 4a). Therefore, we analyzed ING2 CpG island methylation in these three areas by methyl specific PCR (MSP) (Fig. 4b) and by DNA sequencing (data not shown) following DNA bisulfite treatment. The 12 tumor samples and their matched normal tissue used for LOH study were analyzed. The results showed the absence of ING2 gene methylation at these sites either by MSP (Fig. 4b) or by sequencing (data not shown). Thus, ING2 promoter methylation may not be a frequent event in lung tumors and does not explain the high rate of ING2 mRNA expression loss.

3.4. ING2 loss of expression is independent of p53 status

Since ING2 is involved in the activation of p53 tumor suppression pathways [12,15], and it has been recently reported that p53 could regulate ING2 gene expression [18], we investigated the relationship between ING2 and p53 status in our set of NSCLC. Tumor samples previously analyzed for ING2 status by IHC were stained for p53 with DO-7 antibody and scored (see Section 2). As previously reported, a p53 score ≤40 is considered as a wild type protein expression; whereas, a p53 score >40 is considered as a mutant protein profile [25]. In agreement with previous studies on p53 status [25], we observed a p53 mutant profile in 46% of ADK and in 63% of SCC. No correlation was observed between ING2 and p53 status in

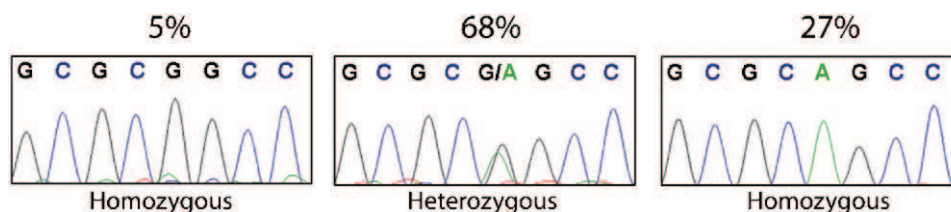


Fig. 2. ING2 gene polymorphism: sequencing diagrams obtained with a reverse primer specific for exon 1. The observed percentages for each genotype are shown.

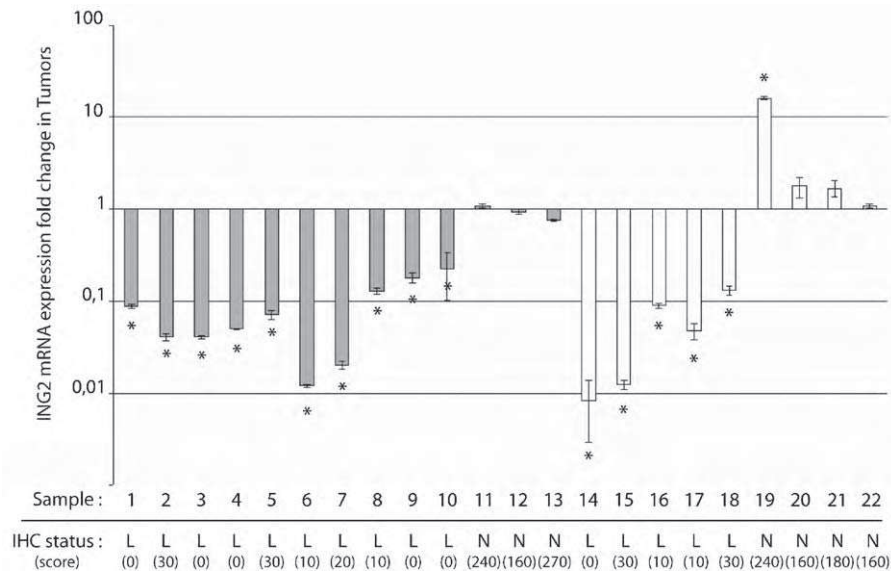


Fig. 3. ING2 mRNA expression in NSCLC. Results are shown as the ING2 mRNA expression fold change in NSCLC. ING2 mRNA expression in ADK (grey bars), SCC (white bars) and in their normal related tissues were evaluated by Real-Time PCR. For each case (numbered 1–22) ING2 mRNA was normalized using 18S RNA expression, and the ING2 mRNA expression ratio between tumors and their related tissue were calculated. Cases with a significant change in ING2 mRNA expression in tumors are denoted with a star (*). For each case, the IHC status is shown (L: loss expression (score ≤ 50); N: normal expression (score > 50)).

all NSCLC, or ADK and SCC when analyzed separately (Table 3). No correlation between p53 status and patient survival was observed (data not shown). In addition, when analyzing patient's survival according to ING2 and p53 status, no effect was observed in NSCLC, ADK or SCC (data not shown).

4. Discussion

Several studies have reported the involvement of ING2 in tumor suppressor pathways such as cell growth arrest, senescence, apoptosis and DNA repair [12,14,27]. However, limited information is available on ING2 status in human tumors. In hepatocellular

carcinoma, a reduced ING2 expression has been reported and is associated with poor prognosis [28]; whereas a decreased ING2 nuclear expression has been found in melanoma [29]. In our study, we report on a large series of lung tumor samples that ING2 expression is frequently downregulated in human lung cancer, both at the protein and mRNA levels.

Analysis of 120 tumors showed that ING2 expression is lost in 58% of NSCLC. We observed that the loss of ING2 expression was significantly different when taking into account the histological tumor type with ING2 being lost in a higher percentage of ADK than SCC. ADK and SCC development results from the accumulation of genetic abnormalities. However, some abnormalities appear to be more frequent in specific histological types. For examples: (i) KRAS mutation in the exon 12 is found in 30–40% of the ADK but is extremely rare in SCC [30,31], (ii) the methylation rates of APC, CDH13 and RAR β 1n are significantly higher in ADK than in SCC [32]. The difference of the frequency of ING2 expression loss between ADK and SCC suggests that ING2 may have role in cellular process that may be differentially regulated in ADK or SCC etiology. As we found that ING2 expression was lost in NSCLC, we investigated the mechanisms involved in the downregulation of ING2 protein expression. No deletion of the ING2 gene was observed. In addition, as previously observed by Okano et al., we

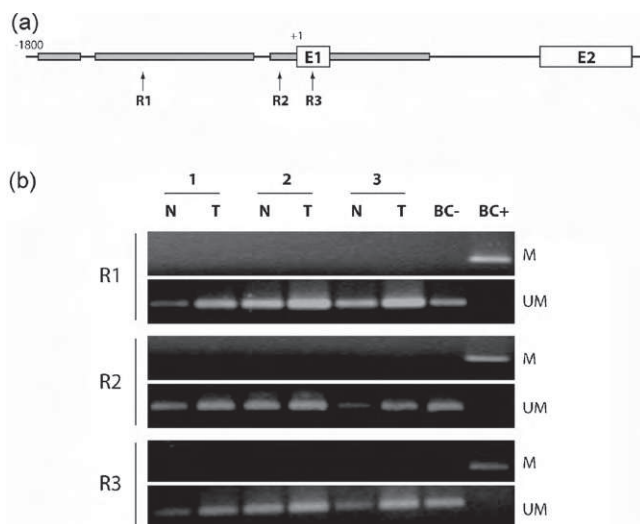


Fig. 4. ING2 promoter methylation. (a) Representation of the ING2 gene promoter and two exons (E1 and E2). The CpG rich regions (grey box) and the three regions analyzed by MSP (R1, R2 and R3) are represented. (b) Agarose gel showing the PCR products obtained with the primers specific for methylated DNA (M) or unmethylated DNA (UM) for each of the three regions analyzed (R1, R2 and R3). Three representative cases (1, 2 and 3) of tumor (T) and the corresponding normal lung (N) are presented. DNA from Buffy coats treated with (BC+) or untreated (BC-) with SSI methylase was used as a positive and negative control, respectively.

Table 3
Immunohistochemical analysis of ING2 and p53 expression in NSCLC.

	No. of patients	ING2 expression		
		Normal	Loss	P
ING2 and p53 status in NSCLC				
p53 WT	56	24	32	0.99
p53 Mt	63	26	37	
ING2 and p53 status in ADK				
p53 WT	38	14	24	0.60
p53 Mt	32	9	23	
ING2 and p53 status in SCC				
p53 WT	18	10	8	0.80
p53 Mt	31	17	14	

P53 WT: score ≤ 40 ; P53 Mt: score > 40 . ING2 Normal: score > 50 ; ING2 Loss: score ≤ 50 ; P: Chi square test P value.

did not detect any ING2 mutation in tumors [23]. We identified a silent SNP on nucleotide 39 that was unpublished yet and not observed by Okano et al. This could be due to differences in ethnicity as our population was mainly of Caucasian origin and that of Okano's study of Asian origin. This SNP is described in SNP databases (NCBI, HapMap). The reported frequency of this polymorphism in the databases is the same than in our observation. To further understand the mechanism leading to ING2 protein down-regulation, we investigated ING2 mRNA expression in tumors. We found that expression of the ING2 transcript is downregulated in lung tumors and we observed a good correlation between ING2 mRNA and protein status. Altogether, these results indicate that the decrease of ING2 expression in NSCLC may occur at the mRNA level. One of the main mechanism identified for ING1 loss of expression in human tumors is its downregulation at the mRNA level [19]. It should be noticed that in lung tumors a similar downregulation of ING1 mRNA expression was reported but the status of ING1 protein was not investigated [21]. Promoter methylation is a general mechanism to inactivate mRNA expression. Furthermore, methylation of ING1 promoter was reported in ovarian cancer. Therefore, we investigated the possibility that methylation of ING2 gene was responsible for the loss of ING2 mRNA expression in lung tumors. Bioinformatic analysis of the ING2 gene revealed the presence of CpG rich regions in the promoter, first exon and first intron (Fig. 4). We analyzed ING2 methylation in these three regions but did not find any DNA methylation at these sites. These results indicate that methylation is probably not involved in the decrease of ING2 transcript. Finally, since it has been reported that p53 can regulate ING2 transcription (two p53 transcriptional repression sequences were identified on ING2 promoter [18]), we investigated the possibility that the decrease of ING2 expression might depend on p53 status. No relationship between ING2 and p53 IHC status was observed, suggesting that ING2 and p53 play independent roles in lung tumorigenesis. Although ING proteins were initially identified as p53 activity enhancer when overexpressed, some groups using ING1 KO model have reported ING1 tumor suppressor function mostly independent of p53 pathway [33,34]. At this time, the mechanism(s) responsible for the decrease of ING2 mRNA in lung tumors remain(s) to be determined. A similar downregulation of mRNA in human tumors is also reported for the other members of the ING gene family but the main mechanism involved in this process remains also unknown.

Accumulating evidence implicates ING2 in tumor suppressor pathways. We and others have reported that in response to genotoxic stress the overexpression of ING2 can enhance p53 activation in order to repress cell cycle and/or to promote apoptosis or senescence. However, in tumors, in accordance with its candidate tumor suppressor status, ING2 gene expression is lost. Recently, using ING2 knockdown experiments, we reported a new function for ING2 in the control of DNA replication and in the maintenance of genome stability [35,36]. Furthermore, some evidence also supports a role for ING2 in DNA repair which is critical for the maintenance of the genome integrity [27,37]. Thus, ING2 may act as a tumor suppressor gene by maintaining directly DNA integrity. Since genomic instability is strongly involved in the early stages of the lung tumorigenesis process [38] and since we found that ING2 loss of expression occurs from stage I in NSCLC, we hypothesize that ING2 may play a role in these events. Consequently, it would also be of interest to investigate the status of ING2 in preneoplastic lesions. Overall, our results indicate that ING2 loss of expression could contribute to the development of lung tumors.

Conflict of interest statement

None declared.

Acknowledgements

D.Y. is a recipient of INCa doctoral fellowship. R.B. is a recipient of a doctoral fellowship from La Fondation pour la Recherche Médicale (Prix Mariane Josso). R.P. was a recipient of an IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) fellowship and the work was supported by INSERM, "Agir a dom", La Ligue Contre le Cancer (Savoie), PNES Poumon (INCa) and Marie Curie International Reintegration (MIRG-CT-2006-042148) (EU) grants. We thank the technicians of the "Biological Oncology and Biotherapies" unit for their technical support, and Nicolas Morzol for data management.

References

- [1] Schwartz AG, Prysak GM, Bock CH, Cote ML. The molecular epidemiology of lung cancer. *Carcinogenesis* 2007;28:507–18.
- [2] Brambilla E, Gazzeri S, Moro D, Lantuejoul S, Veyrenc S, Brambilla C. Alterations of Rb pathway (Rb-p16INK4-cyclin D1) in preinvasive bronchial lesions. *Clin Cancer Res* 1999;5:243–50.
- [3] Suzuki Y, Orita M, Shiraishi M, Hayashi K, Sekiya T. Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene* 1990;5:1037–43.
- [4] Mounawar M, Mukeria A, Le Calvez F, Hung RJ, Renard H, Cortot A, et al. Patterns of EGFR, HER2, TP53, and KRAS mutations of p14arf expression in non-small cell lung cancers in relation to smoking history. *Cancer Res* 2007;67:5667–72.
- [5] Risch A, Plass C. Lung cancer epigenetics and genetics. *Int J Cancer* 2008;123:1–7.
- [6] Garkavtsev I, Kazarov A, Gudkov A, Riabowol K. Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat Genet* 1996;14:415–20.
- [7] Garkavtsev I, Grigorian IA, Ossovskaya VS, Chernov MV, Chumakov PM, Gudkov AV. The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control. *Nature* 1998;391:295–8.
- [8] Shen DH, Chan KY, Khoo US, Ngan HY, Xue WC, Chiu PM, et al. Epigenetic and genetic alterations of p33ING1b in ovarian cancer. *Carcinogenesis* 2005;26:855–63.
- [9] Garkavtsev I, Riabowol K. Extension of the replicative life span of human diploid fibroblasts by inhibition of the p33ING1 candidate tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 1997;17:2014–9.
- [10] Shimada Y, Saito A, Suzuki M, Takahashi E, Horie M. Cloning of a novel gene (ING1L) homologous to ING1, a candidate tumor suppressor. *Cytogenet Cell Genet* 1998;83:232–5.
- [11] Shiseki M, Nagashima M, Pedoux RM, Kitahama-Shiseki M, Miura K, Okamura S, et al. p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity. *Cancer Res* 2003;63:2373–8.
- [12] Nagashima M, Shiseki M, Miura K, Hagiwara K, Linke SP, Pedoux R, et al. DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9671–6.
- [13] Nagashima M, Shiseki M, Pedoux RM, Okamura S, Kitahama-Shiseki M, Miura K, et al. A novel PHD-finger motif protein, p47ING3, modulates p53-mediated transcription, cell cycle control, and apoptosis. *Oncogene* 2003;22:343–50.
- [14] Pedoux R, Sengupta S, Shen JC, Demidov ON, Saito S, Onogi H, et al. ING2 regulates the onset of replicative senescence by induction of p300-dependent p53 acetylation. *Mol Cell Biol* 2005;25:6639–48.
- [15] Gozani O, Karuman P, Jones DR, Ivanov D, Cha J, Lugovskoy AA, et al. The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* 2003;114:99–111.
- [16] Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, et al. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* 2006;442:96–9.
- [17] Pena PV, Davrazou F, Shi X, Walter KL, Verkhusha VV, Gozani O, et al. Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature* 2006;442:100–3.
- [18] Kumamoto K, Spillare EA, Fujita K, Horikawa I, Yamashita T, Appella E, et al. Nutlin-3a activates p53 to both down-regulate inhibitor of growth 2 and up-regulate mir-34a, mir-34b, and mir-34c expression, and induce senescence. *Cancer Res* 2008;68:3193–203.
- [19] Ythier D, Larrieu D, Brambilla C, Brambilla E, Pedoux R. The new tumor suppressor genes ING: genomic structure and status in cancer. *Int J Cancer* 2008;123:1483–90.
- [20] Feng X, Hara Y, Riabowol K. Different HATS of the ING1 gene family. *Trends Cell Biol* 2002;12:532–8.
- [21] Kameyama K, Huang CL, Liu D, Masuya D, Nakashima T, Sumitomo S, et al. Reduced ING1b gene expression plays an important role in carcinogenesis of non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003;9:4926–34.
- [22] He GH, Helbing CC, Wagner MJ, Sensen CW, Riabowol K. Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins. *Mol Biol Evol* 2005;22:104–16.
- [23] Okano T, Gemma A, Hosoya Y, Hosomi Y, Nara M, Kokubo Y, et al. Alterations in novel candidate tumor suppressor genes, ING1 and ING2 in human lung cancer. *Oncol Rep* 2006;15:545–9.
- [24] Travis WD. Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* 2002;23:65–81, viii.

- [25] Brambilla E, Gazzeri S, Moro D, Caron de Fromentel C, Gouyer V, Jacrot M, et al. Immunohistochemical study of p53 in human lung carcinomas. *Am J Pathol* 1993;143:199–210.
- [26] Sironi E, Cerri A, Tomasini D, Sircchia SM, Porta G, Rossella F, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 4q32–35 in sporadic basal cell carcinomas: evidence for the involvement of p33ING2/ING1L and SAP30 genes. *J Cutan Pathol* 2004;31:318–22.
- [27] Wang J, Chin MY, Li G. The novel tumor suppressor p33ING2 enhances nucleotide excision repair via inducement of histone H4 acetylation and chromatin relaxation. *Cancer Res* 2006;66:1906–11.
- [28] Zhang HK, Pan K, Wang H, Weng DS, Song HF, Zhou J, et al. Decreased expression of ING2 gene and its clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2008;261:183–92.
- [29] Lu F, Dai DL, Martinka M, Ho V, Li G. Nuclear ING2 expression is reduced in human cutaneous melanomas. *Br J Cancer* 2006;95:80–6.
- [30] Cooper CA, Carby FA, Bubb VJ, Lamb D, Kerr KM, Wyllie AH. The pattern of K-ras mutation in pulmonary adenocarcinoma defines a new pathway of tumour development in the human lung. *J Pathol* 1997;181:401–4.
- [31] Rodenhuis S, Slebos RJ. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res* 1992;52:2665s–9s.
- [32] Toyooka S, Maruyama R, Toyooka KO, McLerran D, Feng Z, Fukuyama Y, et al. Smoke exposure, histologic type and geography-related differences in the methylation profiles of non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2003;103:153–60.
- [33] Kichina JV, Zeremski M, Aris L, Gurova KV, Walker E, Franks R, et al. Targeted disruption of the mouse *ing1* locus results in reduced body size, hypersensitivity to radiation and elevated incidence of lymphomas. *Oncogene* 2006;25:857–66.
- [34] Coles AH, Liang H, Zhu Z, Marfella CG, Kang J, Imbalzano AN, et al. Deletion of p37Ing1 in mice reveals a p53-independent role for Ing1 in the suppression of cell proliferation, apoptosis, and tumorigenesis. *Cancer Res* 2007;67:2054–61.
- [35] Larrieu D, Ythier D, Binet R, Brambilla C, Brambilla E, Sengupta S, et al. ING2 controls the progression of DNA replication forks to maintain genome stability. *EMBO Rep* 2009;10:1168–74.
- [36] Larrieu D, Pedeux R. SharING out the roles in replicatING DNA. *Cell Cycle* 2009;8:13–4.
- [37] Wang Y, Wang J, Li G. Leucine zipper-like domain is required for tumor suppressor ING2-mediated nucleotide excision repair and apoptosis. *FEBS Lett* 2006;580:3787–93.
- [38] Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 2005;434:907–13.

2. PUBLICATION N°4

ING2 CONTROLS THE PROGRESSION OF DNA REPLICATION FORKS TO MAINTAIN GENOME STABILITY.

Larrieu D, Ythier D, Binet R, Brambilla C, Brambilla E, Sengupta S,
Pedeux R.

EMBO Rep. 2009 Oct;10(10):1168-74. Epub 2009 Sep 4.

ING2 controls the progression of DNA replication forks to maintain genome stability

Delphine Larrieu¹, Damien Ythier¹, Romuald Binet¹, Christian Brambilla¹, Elisabeth Brambilla¹, Sagar Sengupta² & Rémy Pedeux^{1,3*}

¹Molecular Bases of Lung Cancer Progression, INSERM U823, Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, Grenoble, France,

²National Institute of Immunology, Aruna Asaf Ali Marg, New Delhi, India, and ³INSERM U917, IFR140, Faculté de Médecine, Université de Rennes 1, Rennes, France

Inhibitor of growth 2 (ING2) is a candidate tumour suppressor gene the expression of which is frequently lost in tumours. Here, we identified a new function for ING2 in the control of DNA replication and in the maintenance of genome stability. Global replication rate was markedly reduced during normal S-phase in small interfering RNA (siRNA) ING2 cells, as seen in a DNA fibre spreading experiment. Accordingly, we found that ING2 interacts with proliferating cell nuclear antigen and regulates its amount to the chromatin fraction, allowing normal replication progression and normal cell proliferation. Deregulation of DNA replication has been previously associated with genome instability. Hence, a high proportion of siRNA ING2 cells presented endoreduplication of their genome as well as an increased frequency of sister chromatid exchange. Thus, we propose for the first time that ING2 might function as a tumour suppressor gene by directly maintaining DNA integrity.

Keywords: DNA replication; genome stability; ING2; PCNA; tumour suppressor

EMBO reports (2009) 10, 1168–1174. doi:10.1038/embor.2009.180

INTRODUCTION

Inhibitor of growth 2 (ING2) belongs to the ING family of candidate tumour suppressor genes (Garkavtsev *et al*, 1996). Its expression is lost in human tumours (Ythier *et al*, 2008), but its tumour suppressor functions remain unclear. ING2 has been described as a stable component of the repressor complex mouse SIN3A–histone deacetylase 1 (HDAC1; Doyon *et al*, 2006). Owing to a high affinity with the histone 3 trimethylated on lysine 4 (H3K4me3), ING2 recruits SIN3A–HDAC1 to the chromatin (Shi *et al*, 2006) to regulate the expression of genes

involved in cell-cycle control. ING2 can also promote transforming growth factor- β -induced transcription (Sarker *et al*, 2008) and enhance the activation of p53 in response to genotoxic stress (Gozani *et al*, 2003; Pedeux *et al*, 2005). Furthermore, ING2 has been involved in DNA repair pathways in response to ultraviolet irradiation (Wang *et al*, 2006). Most of the previous studies examining the role of ING2 in cellular processes have resulted from overexpression experiments. In this study, as ING2 is lost in many human tumour types, we investigated the consequences of its downregulation. Using this strategy, we characterized a new function for ING2 in the control of DNA replication and in the maintenance of genome stability. These results suggest, for the first time to our knowledge, that ING2 might act as a caretaker tumour suppressor gene by directly protecting DNA integrity, particularly during normal replication of the genome.

RESULTS AND DISCUSSION ING2 ensures normal DNA synthesis

To identify the effects of ING2 downregulation on global S-phase, asynchronous populations of cells transfected with either a small interfering RNA control (siCT) or a small interfering RNA (siRNA) directed against ING2 (siING2#1) were analysed for bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation. The efficiency of ING2 knockdown was assessed by western blotting (data not shown). In comparison with control cells, S-phase cells, downregulated for *ING2*, showed a deficiency in BrdU incorporation, as indicated by a flattened horseshoe when analysed by fluorescence-activated cell sorting (FACS; Fig 1A). This phenotype was confirmed with a siRNA directed against another part of ING2 (siING2#2, supplementary Fig S1A online) and was also observed in normal human telomerase reverse transcriptase (hTERT)-immortalized MRC5 cells (data not shown). Thus, a population of cells in S-phase incorporated more BrdU in the control cells than in the absence of ING2. ING2 has high homology with ING1 and it has been suggested that they might have redundant functions (He *et al*, 2005). However, the deficiency of BrdU incorporation was not observed in siING1 cells (supplementary Fig S1C,D online), showing that ING1 is not involved in the regulation of BrdU incorporation during S-phase. To determine whether the

¹Molecular Bases of Lung Cancer Progression, INSERM U823, Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, Grenoble, 38706 Cedex, France

²National Institute of Immunology, Aruna Asaf Ali Marg, New Delhi 110067, India

³INSERM U917, IFR140, Faculté de Médecine, Université de Rennes 1, 35043 Rennes Cedex, France

*Corresponding author. Tel: +33 (0) 4 7654 9464; Fax: +33 (0) 4 7654 9413; E-mail: remy.pedeux@ujf-grenoble.fr

Received 6 March 2009; revised 1 July 2009; accepted 2 July 2009; published online 4 September 2009

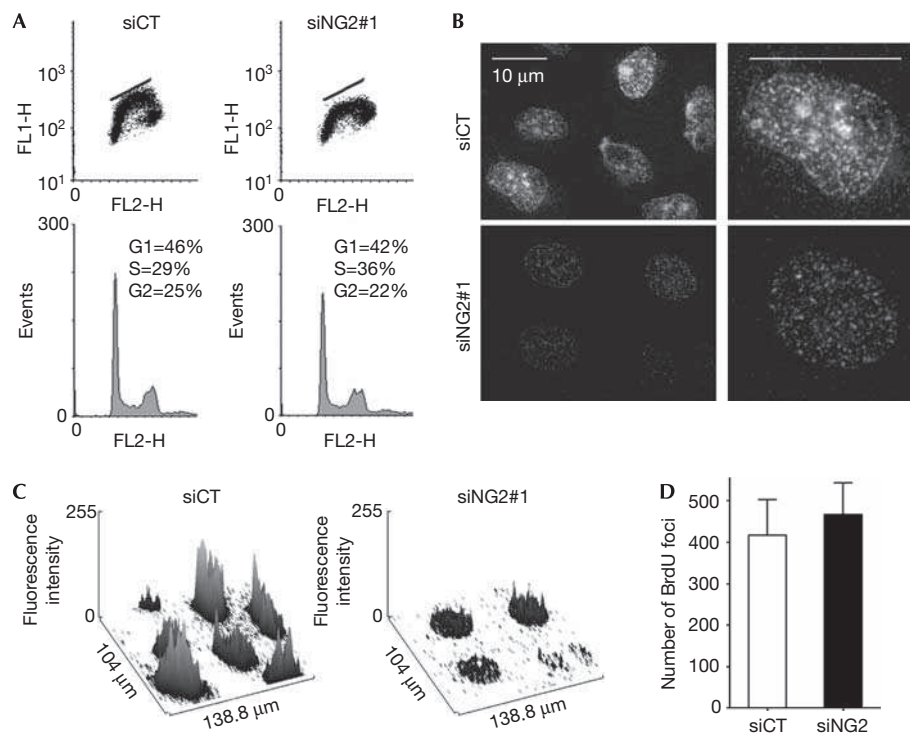


Fig 1 | ING2 ensures normal DNA synthesis. U2OS cells were transfected with siCT or siING2. (A) FACS analysis showing BrdU incorporation. (B) Representative immunofluorescence images of BrdU incorporation. Pictures were acquired with the same exposure time. (C) Graphic ImageJ (NIH) representation of BrdU intensity measured for immunostained cells shown in (B). (D) Number of replication foci per nucleus counted on 10 nuclei for each condition. BrdU, bromodeoxyuridine; FACS, fluorescence-activated cell sorting; ING2, inhibitor of growth 2; siCT, small interfering RNA control.

downregulation of ING2 affects the spatial organization and the activation of replication sites at the single-cell level, microscopic observations of cells immunostained with BrdU were carried out. This experiment again showed low BrdU incorporation in the nuclei of cells downregulated for ING2 using both siRNAs, as observed by a significant decrease of the staining intensity (Fig 1B,C; supplementary Fig S1A,B online). However, the number of replication foci was the same in siCT and siING2 cells (Fig 1D). Within each focus, many replication forks are activated. Hence, we hypothesized that the deficiency of BrdU incorporation was not due to a defect in the establishment and activation of replication foci but might be due to a slowdown of the progression of the replication fork within each active focus.

ING2 controls replication progression rate

To investigate the speed of replication forks, we carried out a DNA fibre spreading experiment (Fig 2) and studied the function of ING2 on global replication fork progression rate during an 'unperturbed' S-phase. The experiment was carried out on asynchronous cells (Fig 2A). The progression of the replication forks was visualized by sequential incorporation of BrdU and iododeoxyuridine (IdU, red) in siCT- and siING2-transfected cells (Fig 2A). DNA fibres were spread onto microscopic slides, and BrdU- and IdU-positive DNA fibres were visualized microscopically (green and red tracks, Fig 2A). The double BrdU and IdU staining allowed us to distinguish between (i) ongoing forks appearing as double-labelled tracks, (ii) newly initiated forks appearing as red-only tracks, and (iii) terminated forks appearing

as green-only tracks. Thus, to calculate specifically the speed of the elongation of DNA replication, we measured the length of the IdU tracks (red tracks, Fig 2B) on double-labelled forks only. Single-strand DNA fibres were also immunostained (blue fibres, Fig 2B) to avoid the measure of aborted red tracks, which might appear because of broken fibres. Unlike control cells, siING2 cells showed a high proportion of very short IdU tracks (Fig 2B; supplementary Fig S2A online, white arrows), reflecting slowly progressing replication forks. Fork length re-partition clearly showed that most siING2 cells had shorter replication forks when compared with control cells, with many forks progressing very slowly (Fig 2C; supplementary Fig S2B online). Slow fork progression might result in a longer S-phase. Accordingly, U2OS and hTERT MRC5 siING2 cells proliferate more slowly (supplementary Fig S5A online). Global replication fork speed—determined by measuring more than 500 forks for each condition—was reduced from 20% (siING2#1, Fig 2D) to 30% (siING2#2, supplementary Fig 2SC online) when compared with the control ($P < 0.0001$). Overall, these experiments indicate that ING2 is required to ensure normal progression of replication forks, suggesting a role in the elongation process.

ING2 interacts with PCNA

A decrease in the speed of the replication fork prompted us to study whether ING2 regulates proteins of the replication machinery. Indeed, DNA replication is a multi-step process, requiring efficient coordination between DNA unwinding and DNA synthesis. The synchronization of these events is crucial to maintain normal

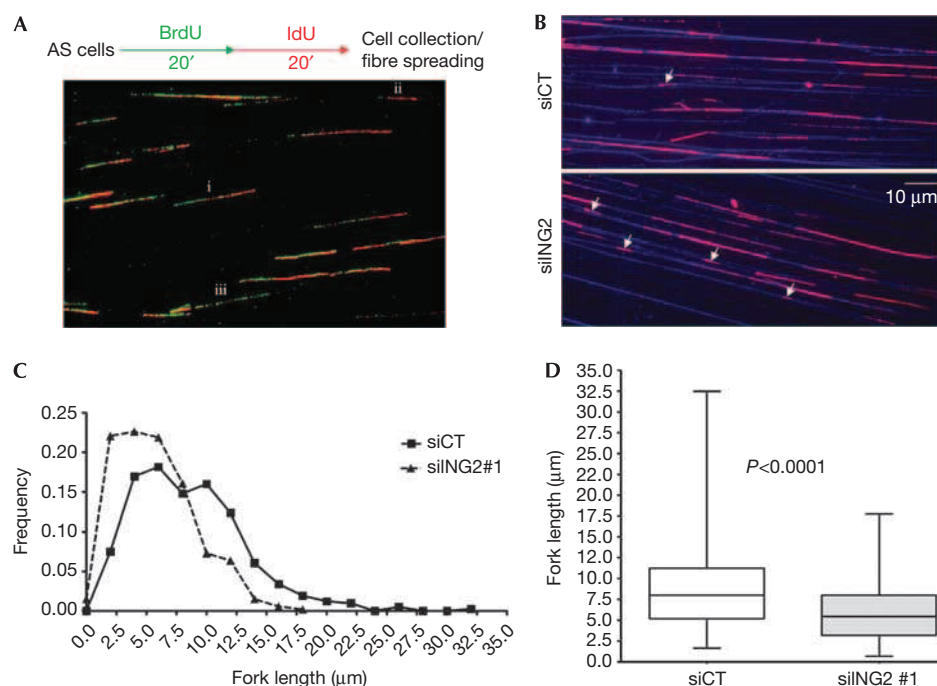


Fig 2 | ING2 controls the progression of the replication fork. (A) U2OS cells transfected with siCT or siING2 were pulsed sequentially with BrdU and IdU, as shown in the experimental protocol. DNA fibres were spread onto microscopic slides (Jackson & Pombo, 1998) and immunostained with antibodies recognizing BrdU or IdU to distinguish between (i) ongoing forks, (ii) newly initiated forks, and (iii) terminated forks. (B) Representative immunofluorescence images showing IdU-positive tracks (pink) on DNA fibres (blue). White arrows indicate short IdU-positive tracks. (C) Fork length re-partition measured in micrometres (μm) using ImageJ software (NIH) for siCT ($n = 520$) and siING2#1 ($n = 601$). (D) Boxplots represent interquartile ranges and extreme values of fork lengths for siCT and siING2. Horizontal bar denotes the median. The P -value was measured using analysis of a variance test followed by a Mann-Whitney test. AS, asynchronous; BrdU, bromodeoxyuridine; IdU, iododeoxyuridine; ING2, inhibitor of growth 2; siCT, small interfering RNA control.

replication rate and subsequent genome stability. The firing of new replication forks requires the regulated loading of many proteins. In early G1-phase, the mini chromosome maintenance 2–7 (MCM2–7) helicase complex binds to the origin recognition complex proteins at the replication forks (Bell & Dutta, 2002). The MCM proteins are assembled in the pre-replicative complex and are required for DNA unwinding. CDC45 protein is then recruited to the pre-replicative complex during the G1–S transition to initiate DNA replication (Pacek *et al*, 2006). The processing of DNA synthesis at these forks then requires the loading of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), which acts during elongation until the end of S-phase by increasing the processivity of DNA polymerases (Hao *et al*, 2008). The level of these proteins was assessed by western blotting in siCT- or siING2-transfected cells in the whole-cell extract and in the chromatin-enriched fraction (CEF; Fig 3A; supplementary Fig S3A online). In the whole-cell extract, the amount of these proteins was not altered after *ING2* downregulation (Fig 3A). In the CEF, the same amount of MCM6, CDC45 and origin recognition complex 2 proteins was present in control or in siING2-transfected cells (CEF, Fig 3A). By contrast, we saw a marked decrease in the chromatin-bound fraction of PCNA in cells downregulated for *ING2*, also apparent by immunofluorescence (supplementary Fig S3C online). Similar results were obtained in normal human fibroblasts (supplementary Fig S3B online). This is in accordance with the known ability of ING2 in recruiting or regulating proteins such as SIN3A–HDAC1

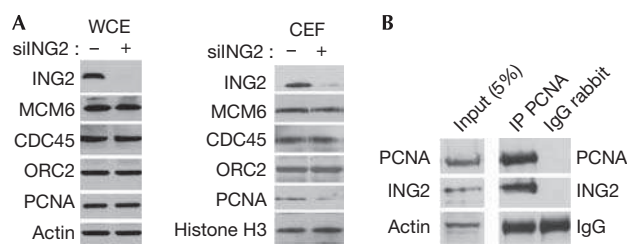


Fig 3 | ING2 interacts with PCNA. (A) Western blotting analysis of the WCE or the CEF proteins in U2OS cells. Actin and histone H3 were used as loading controls. (B) Immunoprecipitation (IP) of endogenous PCNA. Actin and IgG were used as the loading control. CEF, chromatin-enriched fraction; ING2, inhibitor of growth 2; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; WCE, whole-cell extract.

to the chromatin (Shi *et al*, 2006). To investigate whether the regulation of PCNA by ING2 could occur through an interaction between the two proteins, we carried out an immunoprecipitation experiment. Indeed, we found that PCNA co-immunoprecipitated endogenous ING2 (Fig 3B). The use of different truncated forms of ING2, transfected in the cells, showed that the region located between the leucine zipper-like motif and the nuclear localization sequence domains of ING2 is required for PCNA binding (Fig 4A). The interaction between PCNA and ING2 was confirmed *in vitro*

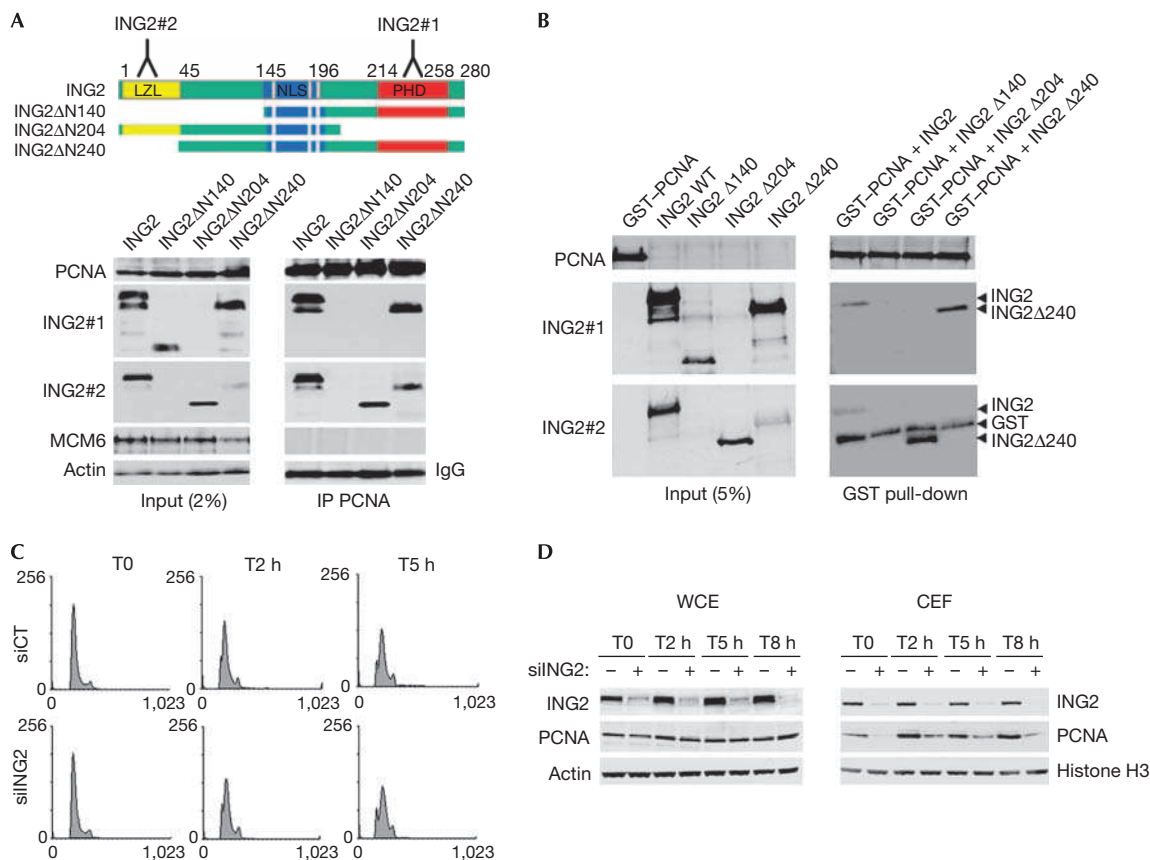


Fig 4 | ING2 regulates the amount of PCNA in the chromatin fraction. (A) PCNA was immunoprecipitated in U2OS cells transfected with the truncated forms of ING2 (top panel). The proteins were detected using the indicated antibodies. MCM6 was used as a negative control of the IP. (B) GST pull-down experiment of recombinant GST-PCNA with ING2 *in vitro* translated constructs. Actin and IgG were used as loading controls for the Input and the IP, respectively. (C) Cells were collected from early (T0) to the end (T8 h) of S-phase. (D) The total expression of ING2 and PCNA was assessed in WCE. In parallel, the chromatin-bound proteins were detected in CEF. CEF, chromatin-enriched fraction; GST, glutathione S-transferase; ING2, inhibitor of growth 2; IP, immunoprecipitation; MCM6, mini chromosome maintenance 6; PCNA, proliferating cell nuclear antigen, WCE, whole-cell extract.

by a glutathione S-transferase pull-down experiment using recombinant proteins (Fig 4B). It is interesting to point out that ING1 has been previously described as interacting with PCNA. However, this interaction was only seen in response to the stress induced by ultraviolet irradiation and was involved in DNA repair pathways (Scott *et al*, 2001). Furthermore, ING1 interacts with PCNA through a PCNA-interacting protein motif, whereas ING2 seems to interact with PCNA through another motif—as is the case for the protein GADD45, for example (Vairapandi *et al*, 2000)—which has very low homology with ING1 (He *et al*, 2005). This suggests that the ING1-PCNA and ING2-PCNA interactions have different roles in the cells. The ING2-PCNA interaction would occur during normal DNA synthesis to regulate the amount of PCNA chromatin, enhancing elongation complex processivity, whereas ING1 might interact with PCNA in response to DNA damage. This is in accordance with our observation that siING1 cells show a normal rate of BrdU incorporation, compared with that in siING2 cells (supplementary Fig S1 online). However, this does not rule out the possibility that the ING2-PCNA interaction might also have a function in DNA repair.

ING2 regulates the amount of PCNA to the chromatin

ING2 might be important for the presence of PCNA in the chromatin fraction when the elongation complex is assembling in early S-phase or, alternatively, ING2 might intervene later during S-phase progression to stabilize PCNA at the chromatin until replication is complete. To distinguish between these two possibilities, cells transfected with siCT or siING2 were synchronized in G1-S-phase and collected for 8 h during S-phase progression (T0–T8 h), as previously established (supplementary Fig S4A online). FACS analysis confirmed that siCT and siING2 cells entered the cell cycle with the same kinetics (Fig 4C), and presented the same amount of replication protein A (a single-strand DNA binding protein) to the CEF (data not shown), suggesting that initiation might occur properly in siING2 cells. However, siCT cells reached late S-phase slightly faster than siING2 cells, showing that completion of DNA synthesis is delayed by ING2 downregulation (supplementary Fig S4B online). The expression of ING2 and PCNA was assessed by western blot in the whole-cell extract and in the CEF (Fig 4D). In the whole-cell extract, we observed that ING2 downregulation had no consequence on the overall amount of

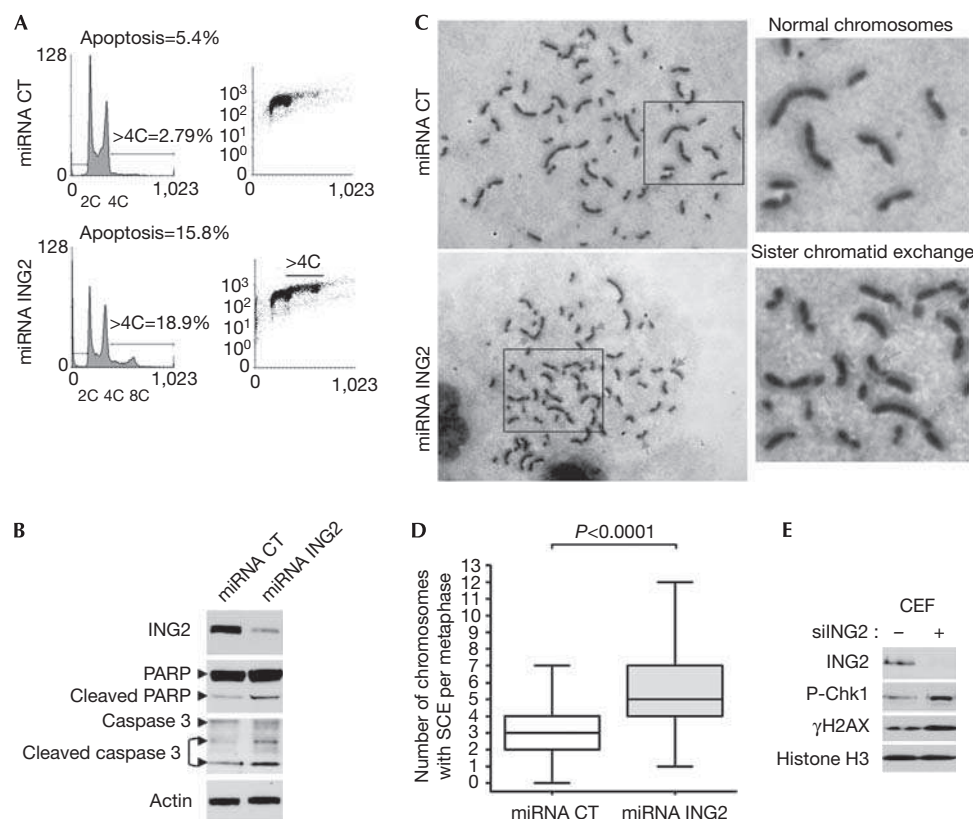


Fig 5 | ING2 protects DNA integrity. Stable U2OS clones were established using miRNA. (A) Propidium iodide (left panels) and BrdU incorporation (right panels) were analysed by FACS to detect genome instability (>4C cells), endoreduplication (8C cells) and apoptosis (sub-G1 population). (B) Western blot analysis of caspase 3 and PARP in miRNA cells shown in (A). (C) Representative images of SCEs assessed in BrdU-labelled, giemsa-stained chromosome spreads from miRNA CT and miRNA ING2 cells. (D) At least 45 metaphases were counted for each condition and the number of SCE was normalized to the number of chromosomes per metaphase. The boxplots represent interquartile ranges and extreme values of SCEs per cell. The horizontal bars denote the median. The *P*-value was measured using an analysis of variance test followed by a Mann-Whitney *U*-test. (E) Western blot analysis of γ H2AX and phospho-Chk1 (P-Chk1) in the CEF in siCT and siING2 cells. Histone H3 was used as a loading control. BrdU, bromodeoxyuridine; FACS, fluorescence-activated cell sorting; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; miRNA, microRNA; SCE, sister chromatid exchange; siCT, small interfering RNA control.

PCNA, regardless of S-phase progression. In the CEF of siCT cells, a small amount of PCNA was present in the chromatin at T0. At 2 h after G1/S release, when cells entered S-phase, the amount of PCNA to the chromatin had markedly increased and remained high and stable throughout S-phase progression (from T2 h to T8 h). By contrast, in siING2 cells the amount of PCNA in the CEF was barely detectable at T0. At T2 h, the amount of PCNA increased but remained markedly lower throughout S-phase until T8 h. These results show that ING2 regulates the amount of PCNA to the chromatin fraction from the moment the elongation complex forms at the chromatin until replication is complete. Altogether, these data show that the downregulation of ING2 leading to the decrease of chromatin-bound PCNA during S-phase progression is associated with a defect in the elongation process. To exclude any function of ING2 in the initiation process, further investigations are necessary to determine whether siING2 cells would present the same density of active forks as do control cells.

ING2 maintains genome stability

PCNA has been shown previously to be involved in normal S-phase progression and in the maintenance of genome stability (Nedelcheva-Velva *et al*, 2006; Urtishak *et al*, 2009). To determine the consequences of the deregulated replication observed in siING2 cells after several rounds of DNA replication, we established stable clones downregulated for ING2. The cell-cycle profiles of three different stable U2OS clones maintained in culture for two weeks were assessed and the representative cell-cycle profile of one clone is presented in Fig 5A (micro RNA (miRNA) ING2). FACS analysis of propidium iodide (left panel) and BrdU incorporation (right panel) clearly showed that the downregulation of Ing2 (see western blot, Fig 5B) markedly increased the percentage of cells with more than 4C in DNA content to almost 20% compared with only 3% in miRNA CT cells. More specifically, we detected a distinct population of 8C cells, which are indicators of genome endoreduplication. Endoreduplication of the genome can initiate chromosomal aberrations.

This was assessed by a sister chromatid exchange (SCE) experiment (Fig 5C), showing an increase in the number of SCE counted per metaphase in miRNA ING2 cells with a mean of 5.4 SCE per cell compared with a mean of 2.9 SCE per cell in miRNA CT cells (Fig 5C,D). Furthermore, this genome instability can generate DNA double-strand breaks. Indeed, in siING2 cells, we detected an increase of H2AX phosphorylation (Fig 5E), a marker of DNA double-strand breaks (Bonner *et al*, 2008), as well as the activation of the DNA damage checkpoint Chk1, seen by its phosphorylation. Activation of DNA damage checkpoint pathways can drive cells into apoptosis or senescence, which are two mechanisms that protect cells against neoplastic transformation; FACS analysis showed that nearly 16% of cells downregulated for ING2 underwent apoptosis (Fig 5A), and western blotting revealed the cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase and caspase 3 (Fig 5B). This 10% increase of cells undergoing apoptosis might account, in part, for the 30% decrease in proliferation (supplementary Fig S5A online). Senescence-associated β -galactosidase assay showed that the occurrence of senescence was almost double in these cells compared with control cells (supplementary Fig S5B online), as previously described for another cell line downregulated for ING2 (Kumamoto *et al*, 2008). Thus, ING2 downregulation enhances genome instability.

Our study shows, for the first time to our knowledge, that loss of ING2, which occurs in human tumours, results in an impaired DNA replication process and increased genome instability. Thus, ING2 could function as a caretaker tumour suppressor protein to prevent tumorigenesis. A previous study of ING5 has shown its interaction with the MCM helicase complex (Doyon *et al*, 2006), suggesting a potential model in which ING5 would be involved in DNA unwinding, whereas ING2 would simultaneously enhance the processivity of the elongation complex in association with PCNA. As each ING protein associates with a specific histone acetyltransferase or HDAC complex, we can hypothesize that different ING proteins in complex with various histone acetyltransferases and HDACs might be required at different steps during the initiation and progression of DNA replication.

METHODS

Cell lines. U2OS osteosarcoma cells and hTERT MRC5 normal lung fibroblasts were used.

RNA-mediated interference. Stealth RNA-mediated interference (RNAi) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used for ING2 downregulation (siING2). The universal RNAi negative control (#12935-110, Invitrogen) was used (siCT). Transfections were carried out using lipofectAMINE RNAimax (#13778-075, Invitrogen). For stable clones downregulated for ING2, we used the BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (# K4936-00, Invitrogen). The miRNA duplex was inserted into the pcDNA 6.2-GW miR. Stable transfected clones were selected by the addition of 5 mg/ml of blasticidin to the culture medium.

Western blotting of chromatin-enriched fraction. Nuclear fraction was isolated using the NE-PER kit (#78833, Pierce, Rockford, IL, USA). The CEF was then isolated by re-suspending cell nuclei in an ice-cold hypotonic buffer (3 mM EDTA, 0.2 mM EGTA and 1 mM DTT (pH 7.85) with protease inhibitor cocktail). Soluble fraction was removed and the pellet (CEF) was washed twice in the hypotonic buffer. The CEF was re-suspended and sonicated in a sonication buffer (10 mM Tris, 10% sucrose, 10 mM MgCl₂ (pH 7.4) with protease inhibitor cocktail).

DNA fibre spreading. Asynchronous cells were pulsed sequentially with 100 μ M BrdU (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA) and 100 μ M IdU (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) for 20 min each. Cells were collected and DNA fibres were spread onto microscope slides as described by Jackson & Pombo (1998).

Immunofluorescence staining. Immunofluorescences were carried out as described previously by Sengupta *et al* (2003). An Axiolmager Apotome (Zeiss, Germany) microscope was used.

Sister chromatid exchange experiment. SCE was carried out on stable U2OS clones as described previously by Perry & Wolff (1974). At least 45 metaphases were counted for each condition.

Supplementary information is available at *EMBO reports* online (<http://www.emboreports.org>).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank O. Gozani for providing the ING2 antibody and T. Gostan (Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier) for the fibre spreading analysis using the IDeFlx software. This study was supported by the International Association for the Study of Lung Cancer, an 'Agir à dom' grant and a Marie Curie International Reintegration Grant (MIRG-CT-2006-042148) (RP); DL, DY and RB are funded by the French Ministry of Education and Research, Institut National du Cancer and Fondation pour la Recherche Médicale, respectively. SS was supported by National Institute of Immunology core funds and the National Institutes of Health (BT/PR5936/BRB/10/408/2005).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Bell SP, Dutta A (2002) DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **71**: 333–374
- Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y (2008) GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* **8**: 957–967
- Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, Landry AJ, Cote V, Selleck W, Lane WS, Tan S, Yang XJ, Cote J (2006) ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell* **21**: 51–64
- Garkavtsev I, Kazarov A, Gudkov A, Riabowol K (1996) Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat Genet* **14**: 415–420
- Gozani O *et al* (2003) The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* **114**: 99–111
- Hao H, Xin T, Nancai Y, Yanxia W, Qian L, Wei M, Yandong Y, Hanju H (2008) Short-interfering RNA-mediated silencing of proliferating cell nuclear antigen inhibit proliferation and induce apoptosis in HeLa cells. *Int J Gynecol Cancer* **18**: 36–42
- He GH, Helbing CC, Wagner MJ, Sensen CW, Riabowol K (2005) Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins. *Mol Biol Evol* **22**: 104–116
- Jackson DA, Pombo A (1998) Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. *J Cell Biol* **140**: 1285–1295
- Kumamoto K, Spillare EA, Fujita K, Horikawa I, Yamashita T, Appella E, Nagashima M, Takenoshita S, Yokota J, Harris CC (2008) Nutlin-3a activates p53 to both down-regulate inhibitor of growth 2 and up-regulate mir-34a, mir-34b, and mir-34c expression, and induce senescence. *Cancer Res* **68**: 3193–3203
- Nedelcheva-Velleva MN, Krastev DB, Stoynov SS (2006) Coordination of DNA synthesis and replicative unwinding by the S-phase checkpoint pathways. *Nucleic Acids Res* **34**: 4138–4146
- Pacek M, Tutter AV, Kubota Y, Takisawa H, Walter JC (2006) Localization of MCM2-7, Cdc45, and GINS to the site of DNA unwinding during eukaryotic DNA replication. *Mol Cell* **21**: 581–587

- Pedoux R *et al* (2005) ING2 regulates the onset of replicative senescence by induction of p300-dependent p53 acetylation. *Mol Cell Biol* **25**: 6639–6648
- Perry P, Wolff S (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* **251**: 156–158
- Sarker KP, Kataoka H, Chan A, Netherton SJ, Pot I, Huynh MA, Feng X, Bonni A, Riabowol K, Bonni S (2008) ING2 as a novel mediator of transforming growth factor-beta-dependent responses in epithelial cells. *J Biol Chem* **283**: 13269–13279
- Scott M, Bonnefin P, Vieyra D, Boisvert FM, Young D, Bazett-Jones DP, Riabowol K (2001) UV-induced binding of ING1 to PCNA regulates the induction of apoptosis. *J Cell Sci* **114**: 3455–3462
- Sengupta S *et al* (2003) BLM helicase-dependent transport of p53 to sites of stalled DNA replication forks modulates homologous recombination. *EMBO J* **22**: 1210–1222
- Shi X *et al* (2006) ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* **442**: 96–99
- Urtishak KA, Smith KD, Chanoux RA, Greenberg RA, Johnson FB, Brown EJ (2009) Timeless maintains genomic stability and suppresses sister chromatid exchange during unperturbed DNA replication. *J Biol Chem* **284**: 8777–8785
- Vairapandi M, Azam N, Balliet AG, Hoffman B, Liebermann DA (2000) Characterization of MyD118, Gadd45, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interacting domains. PCNA impedes MyD118 AND Gadd45-mediated negative growth control. *J Biol Chem* **275**: 16810–16819
- Wang J, Chin MY, Li G (2006) The novel tumor suppressor p33ING2 enhances nucleotide excision repair via inducement of histone H4 acetylation and chromatin relaxation. *Cancer Res* **66**: 1906–1911
- Ythier D, Larrieu D, Brambilla C, Brambilla E, Pedoux R (2008) The new tumor suppressor genes ING: genomic structure and status in cancer. *Int J Cancer* **123**: 1483–1490

3. PUBLICATION N°5

SUMOYLATION OF ING2 REGULATES THE TRANSCRIPTION MEDIATED BY SIN3A.

Ythier D, Larrieu D, Binet R, Binda O, Brambilla C, Gazzeri S,
Pedoux R.

Oncogene. 2010 Nov 4;29(44):5946-56. Epub 2010 Aug 2

ORIGINAL ARTICLE

Sumoylation of ING2 regulates the transcription mediated by Sin3A

D Ythier^{1,4}, D Larrieu^{1,4}, R Binet¹, O Binda^{2,5}, C Brambilla¹, S Gazzeri¹ and R Pedoux^{1,3}

¹Molecular Bases of Lung Cancer Progression, INSERM U823, Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier, Grenoble, France; ²Department of Biological Sciences, Stanford University, Stanford, CA, USA and ³INSERM U917, IFR140, Faculté de Médecine, Université de Rennes 1, Rennes, France

ING2 (inhibitor of growth 2) is a candidate tumor-suppressor gene involved in cell cycle control, apoptosis and senescence. Although the functions of ING2 within the chromatin remodeling complex Sin3A/histone deacetylase (HDAC) and in the p53 pathway have been described, how ING2 itself is regulated remains unknown. In this study we report for the first time that ING2 can be sumoylated by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO1) on lysine 195 both *in vitro* and *in vivo*. Strikingly, ING2 sumoylation enhances its association with Sin3a. We provide evidences that ING2 can bind to the promoter of genes to mediate their expression and that sumoylation of ING2 is required for this binding to some of these genes. Among them, we identified the gene *TMEM71* (transmembrane protein 71), whose expression is regulated by ING2 sumoylation. ING2 must be sumoylated to bind to the promoter of *TMEM71* and to recruit the Sin3A chromatin-modifying complex to this promoter, in order to regulate *TMEM71* transcription. Hence, sumoylation of ING2 enhances its binding to the Sin3A/HDAC complex and is required to regulate gene transcriptions. *Oncogene* (2010) 29, 5946–5956; doi:10.1038/onc.2010.325; published online 2 August 2010

Keywords: sumoylation; Sin3A; SUMO1; transcription

Introduction

ING2 is a member of the ING (INHibitor of Growth) candidate tumor-suppressor gene family. The founding member of the family, ING1, was initially discovered by a screen designed to identify genes that allow neoplastic transformation when repressed (Garkavtsev *et al.*, 1996). Subsequently, four other members of the family, ING2–ING5, were identified by a homology search (Nagashima *et al.*, 2001, 2003; Shiseki *et al.*, 2003). INGs are nuclear proteins and one important structural feature of these

proteins is the presence of a highly conserved plant homeodomain zinc-finger in their C-terminal part. Such domains are commonly found in proteins involved in modifying chromatin (Bienz, 2006; Mellor, 2006). Accordingly, all ING proteins have been described as being associated with either histone acetyltransferase or histone deacetylase (HDAC) complexes that implicate them in chromatin remodeling (Doyon *et al.*, 2006).

ING2 has been described as a stable component of the HDAC complex Sin3A/HDAC1/2 and also interacts with the acetyltransferase protein p300 (Pedoux *et al.*, 2005; Doyon *et al.*, 2006). Subsequently, the plant homeodomain of ING2 was shown to have a high affinity for the histone 3 tri-methylated on the lysine 4. The interaction between ING2 and this modified histone allows the stabilization of the Sin3A/HDAC complex onto the promoter of the proliferative genes *c-myc* and *cyclin D1* to mediate their repression (Shi *et al.*, 2006). Initially, ING2 was reported to enhance p53 acetylation to negatively regulate cell growth, to induce apoptosis and to regulate the onset of replicative senescence (Nagashima *et al.*, 2001; Pedoux *et al.*, 2005). In these pathways, it has been reported that the lipid signaling molecule phosphatidylinositol-5-phosphate binds and activates ING2 (Gozani *et al.*, 2003). Recently, it was reported that ING2 could mediate transforming growth factor- β -dependent responses (Sarker *et al.*, 2008). Altogether, these studies indicate that ING2 may have tumor-suppressor functions. Accordingly, ING2 is frequently lost in human tumors (Ythier *et al.*, 2008). Indeed, ING2 locus is deleted in the head and neck squamous cell carcinomas (Borkosky *et al.*, 2009). In melanoma and in hepatocellular carcinoma a loss of ING2 nuclear expression has been observed (Lu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008). Moreover, we have recently shown a strong decrease of ING2 expression, both at the protein and the mRNA level, in a large proportion of non-small cell lung carcinoma (Ythier *et al.*, 2009).

Sumoylation is a reaction in which the small ubiquitin-like modifier (SUMO), a polypeptide of 11kDa, is covalently linked to a variety of proteins. Similarly to ubiquitination, sumoylation is achieved by activating E1, conjugating E2 and ligating E3 enzymes. In contrast to ubiquitination, sumoylation has been implicated in various cellular processes such as the regulation of protein subcellular localization, protein stabilization by competition with ubiquitination, protein–protein interaction and transcription factor

Correspondence: Dr R Pedoux, INSERM U917-MICA, Faculté de médecine de Rennes, Bâtiment 2, Pièce 117, 2 avenue du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes, France.

E-mail: remy.pedoux@univ-rennes1.fr

⁴These authors contributed equally to this work.

⁵Current address: Lady Davis Institute for Medical Research, McGill University, Montréal, Québec, Canada.

Received 21 December 2009; revised 11 June 2010; accepted 26 June 2010; published online 2 August 2010

activity (Hay, 2005). Many studies have reported the sumoylation of transcription factors (for example, Sp3, Smad4, Elk-1 and so on) and most of the time, it was associated with transcriptional repression (Gill, 2005). However, in a limited number of cases, sumoylation was reported to increase transcriptional activity of proteins such as the HSF1 (heat shock factor 1) or the NFAT-1 (nuclear factor of activated T cells) (Hong *et al.*, 2001; Terui *et al.*, 2004).

Although the functions of ING2 in cellular processes have received much attention, how ING2 itself may be regulated remains poorly understood. In this study, we report that ING2 can be sumoylated by SUMO1 and that sumoylation enhances ING2 association with Sin3A. We also show that the transcriptional regulation of several genes requires ING2, among which some of them are also dependent on ING2 sumoylation. Moreover, detailed analysis of one of these genes shows that the sumoylation of ING2 is required for the presence of both ING2 and Sin3A on its promoter to allow its expression. Thus, we identified for the first time a mechanism of ING2 regulation by a post-translational modification.

Results

ING2 is sumoylated by SUMO1 in vitro and in vivo
ING2 was previously described as a component of the Sin3A/HDAC1/2 complex. Indeed, ING2 and a second band approximately 10 kDa higher are detected in mSin3a immunoprecipitation (Figure 1a). Importantly, the level of Sin3a expression was not affected by ING2 downregulation (Figure 1a and Supplementary Figure 1). The reduced intensity of slow-migrating band in cells transfected with a small interfering RNA (siRNA) targeting ING2 indicates that it is specific to ING2 and therefore it may be a post-translationally modified form of ING2. Consequently, we hypothesized that the higher band could be a sumoylated ING2 protein. *In vitro* sumoylation experiments show that glutathione *S*-transferase-ING2 can be sumoylated twice by SUMO1. Unlike ubiquitin, SUMO1 does not form chains (Hay, 2005). We thus concluded that ING2 can be sumoylated on two residues *in vitro* (Figure 1b). In U2OS cells, co-transfection of ING2 and SUMO1 fused to a histidine tag (His-SUMO1) followed by a histidine purification results in the detection of two ING2 sumoylated forms (Figure 1c). Taken together, these results indicate that ING2 can be sumoylated by SUMO1 both *in vitro* and *in vivo*.

ING2 is sumoylated by SUMO1 on lysine 195

To determine which region of the ING2 protein is sumoylated, we generated ING2 mutants truncated in their amino (N) or carboxy (C) terminal part (ING2- Δ C165, ING2- Δ C204 and ING2- Δ N240; Figure 2a). The ING2-truncated mutants were co-transfected with His-SUMO1 and the resulting protein extracts were subjected to histidine purification (Figure 2b). The

KMP1 antibody that recognizes the N-terminal part of ING2 was used to detect ING2- Δ C165 and ING2- Δ C204 truncated constructs. The 14H3D2 antibody that recognizes the C-terminal part of ING2 was used to detect the ING2- Δ N240 truncated construct. Similarly to what is observed for full-length ING2, ING2- Δ C204 and ING2- Δ N240 are sumoylated on two residues (Figure 2b). On the contrary, ING2- Δ C165 shows a weak sumoylation signal and only one sumoylated form (Figure 2b). This result indicates that the predominantly sumoylated lysine residue of ING2 may be located between the residues 165 and 204. Lysines subjected to sumoylation are commonly found in a sumoylation consensus motif, ψ KxE (where ψ is a hydrophobic residue, K the sumoylated lysine, x is any residue and E a glutamic acid) (Rodriguez *et al.*, 2001).

Bioinformatic analysis of the amino acid sequence of ING2 using the SumoPlot software (<http://www.abgent.com.cn/doc/sumoplot/sendmail.asp>) revealed the presence of three potential consensus sites for sumoylation (Figure 2a). To identify the sumoylated lysine residues, we generated ING2 mutants in which the lysine corresponding to the three potential sumoylated consensus sites were individually replaced by an arginine (R) (ING2 K72R, ING2 K139R and ING2 K195R). Co-transfection of these mutants with His-SUMO1 followed by a histidine purification shows that the mutants ING2 K72R and ING2 K139R are sumoylated like wild-type (WT) ING2. On the contrary, in accordance with the result obtained with the truncated form of ING2, the ING2 K195R mutant is not sumoylated (Figure 2c). This result indicates that ING2 is mainly sumoylated on the K195 residue.

Mutation of lysine 195 prevents not only ING2 sumoylation but also other potential post-translational modifications such as ubiquitination or acetylation. Thus, we generated a mutant of ING2 within the consensus sequence by changing the glutamic acid 197 into an alanine (ING2 E197A). Such mutation is reported to disrupt sumoylation by affecting the interaction of the substrate with the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 (Bernier-Villamor *et al.*, 2002). Consequently, this mutant may be post-translationally modified on K195 but not sumoylated. As a matter of fact, co-transfection of the ING2 E197A mutant with His-SUMO1 followed by histidine purification shows that ING2 E197A cannot be sumoylated (Figure 2d).

Subcellular localization of ING2 is independent on sumoylation

Initially, SUMO modifications have been reported to regulate protein subcellular localization. Indeed, Ran-GAP sumoylation was shown to regulate its targeting to nuclear pore complexes (Matunis *et al.*, 1996). As the sumoylated residue K195 is found within the nuclear localization signal, we hypothesized that ING2 sumoylation may be involved in its subcellular localization. To test this hypothesis, we performed immunofluorescent staining of ING2 in U2OS cells overexpressing ING2, ING2 K195R or ING2 E197A. Overexpressed ING2,

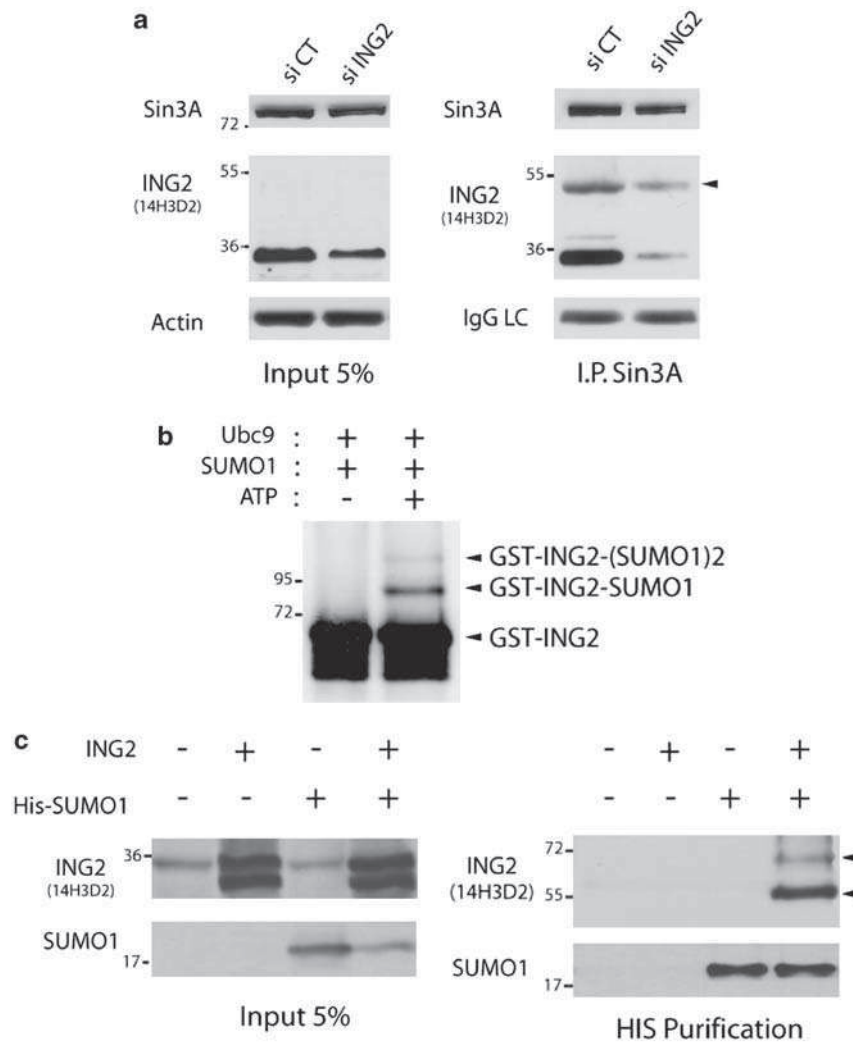


Figure 1 ING2 is sumoylated *in vitro* and *in vivo*. (a) Immunoprecipitation (IP) of endogenous Sin3A in U2OS transfected with stealth control (siCT) or stealth ING2 (siING2). Proteins were detected using the indicated antibodies. ING2 post-translationally modified forms are indicated (black arrows). Actin and IgG light chain (IgG LC) were used as loading control for the input and the IP, respectively. (b) Western blot analysis of GST-ING2 *in vitro* sumoylation. Unmodified ING2 and ING2 sumoylated forms are indicated. (c) Western blot analysis of proteins from histidine purification in U2OS cells transfected with the indicated vectors. ING2 sumoylated forms are indicated (black arrows).

ING2 K195R and ING2 E197A are targeted to the nucleus (Figure 3a). Thus, ING2 sumoylation on lysine 195 is not involved in its nuclear targeting. Furthermore, as ING2 has been reported to bind to the chromatin, we hypothesized that ING2 sumoylation may be involved in its targeting to the chromatin (Shi *et al.*, 2006). To test this hypothesis we performed chromatin-enriched fraction (CEF) isolation in cells overexpressing ING2, ING2 K195R or ING2 E197A. This experiment shows that the same amount of protein is present in the CEF for all the constructs (Figure 3b). Taken together, these results suggest that sumoylation of ING2 is not required for the targeting of ING2 to the nucleus or to the chromatin.

ING2 sumoylation on residue K195 enhances its binding to the Sin3A complex

As we initially identified ING2 sumoylation in the Sin3A complex, we hypothesized that ING2 binding

to the Sin3A complex may be regulated by its sumoylation. To test this hypothesis, we performed Sin3A immunoprecipitation (IP) in U2OS cells co-transfected with a siRNA targeting the 3'-untranslated region (UTR) of ING2 mRNA (to suppress ING2 endogenous expression) and plasmids expressing either ING2 WT, ING2 K195R or ING2 E297A. WT ING2 co-immunoprecipitates (co-IP) with Sin3A whereas, strikingly, both ING2 K195R and ING2 E197A co-IP more weakly with Sin3A (Figure 4a). This result suggests that sumoylation of ING2 enhances its association with Sin3A. However, the decreased affinity observed between ING2 mutants and Sin3A could also be because of the mutation being present in the domain of ING2 necessary for the physical interaction with Sin3A. Consequently, we determined which region of ING2 is involved in its binding to Sin3A (Figures 4b and c). Sin3A IP in U2OS cells overexpressing ING2-truncated forms, ING2 Δ N140

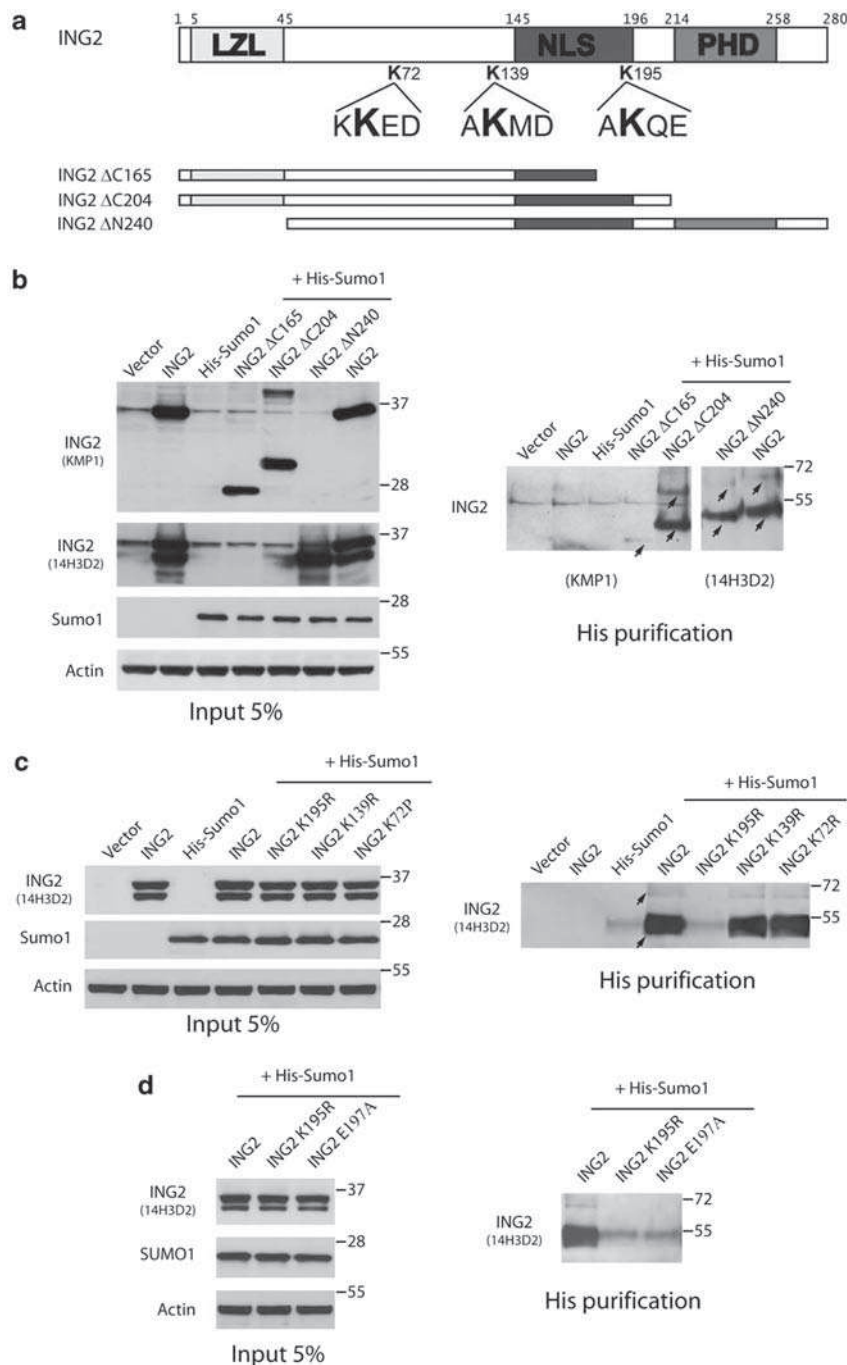


Figure 2 ING2 is sumoylated on lysine 195. **(a)** Schematic representation of ING2 amino acid sequence. Sumoylation consensus sites identified by SumoPlot bioinformatic analysis and ING2 truncated mutants are represented. **(b)** Western blot (WB) analysis of proteins from histidine purification in U2OS cells co-transfected with His-SUMO1 and the different ING2 truncated forms. ING2 sumoylated forms are indicated by black arrows. **(c)** WB analysis of proteins from histidine purification in U2OS cells co-transfected with His-SUMO1 and the different indicated ING2 mutants for sumoylation consensus sites. **(d)** WB analysis of proteins from histidine purification in U2OS cells co-transfected with His-SUMO1 and the indicated vectors.

and ING2 ΔN240, shows that ING2 ΔN240, but not the ING2 ΔN140, co-IP with Sin3A (Figures 4b and c). This result indicates that, as previously described for p33ING1b (Skowrya *et al.*, 2001), the region of ING2 protein responsible for the association with the Sin3A complex is located between the amino acid 40 and 140.

Thus, as the lysine 195 is outside the 40–140 region, the decreased interaction between ING2 K195R or ING2 E197A and Sin3A is due to the absence of sumoylation. Taken together, these results indicate that ING2 binding to the Sin3A complex may be enhanced by sumoylation of ING2.

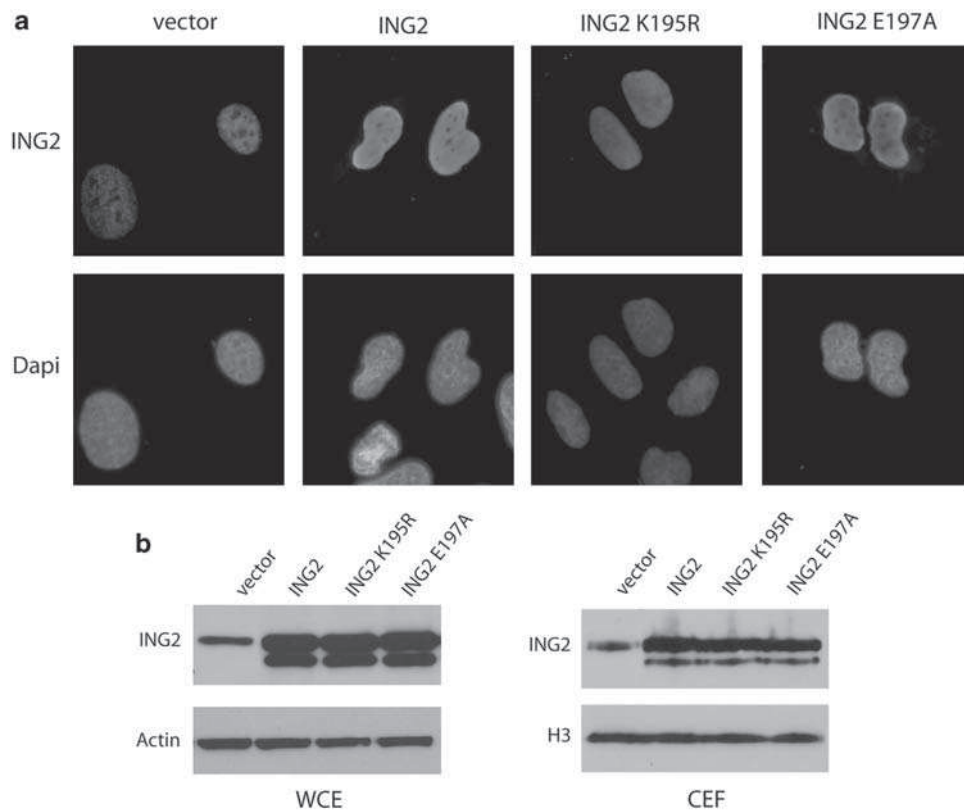


Figure 3 ING2 sumoylation on K195 is not required for its targeting to the nucleus or the CEF. (a) Immunofluorescence pictures of ING2 or DNA staining (Dapi) in U2OS cells transfected with the indicated vectors. Pictures of cells overexpressing ING2, ING2 K195R or ING2 E197A were acquired with the same exposure time. To detect the staining of endogenous ING2, exposure time was increased three times. (b) Western blot analysis of the whole cell extract (WCE) or the chromatin-enriched fraction (CEF) of U2OS cells transfected with the indicated vectors. Actin and histone 3 (H3) were used as loading controls.

Sumoylation of ING2 regulates gene expression

Accumulating evidences have involved ING2 in the regulation of gene expression. Indeed, one study has shown that in response to the stress induced by doxorubicin, exogenously expressed ING2 recruits the Sin3A/HDAC complex to the promoter of *cyclin D1* and *c-myc* to repress their expression (Shi *et al.*, 2006). Another study has identified eight genes that are upregulated after ING2 overexpression (Feng *et al.*, 2006). However, in these two studies, genes regulated by ING2 were identified after a stress or under non-physiological conditions. Thus, to identify genes that are regulated by ING2 in normal cell growth conditions, we inhibited ING2 expression by transfection of a siRNA targeting ING2 (siING2) into two different cell lines (U2OS and RKO) and we analyzed gene expression by microarrays (Supplementary Tables 2 and 3). This experiment allowed the identification of seven genes strongly downregulated after ING2 silencing in both U2OS and RKO cell lines (Figure 5a and Supplementary Table 4). Using quantitative real-time PCR the expression fold change of these seven genes after ING2 downregulation was confirmed (Figure 5c), whereas the efficiency of ING2 downregulation was verified by western blot (Figure 5b). Among these genes, *SPP1* (*secreted phosphoprotein 1*) and *TMEM71* (*transmembrane protein 71*) are most strongly affected by ING2

repression. Thus, to determine whether these two genes are directly regulated by ING2, we assessed the presence of ING2 on their promoter region by chromatin immunoprecipitation (ChIP) followed by PCR analysis (Figure 5d and Supplementary Figure 2a). This experiment shows that ING2 is present on *SPP1* and *TMEM71* promoters in siCT-transfected cells, but not in siING2-transfected cells. This indicates that the regulation of these two genes may be directly mediated by ING2. As many studies have reported that sumoylation of proteins can regulate their transcriptional activities, we hypothesized that ING2 sumoylation could be involved in the regulation of its targeted genes. To address this possibility, we analyzed the expression level of the seven genes previously identified, in cells expressing WT ING2 or the non-sumoylated mutant ING2 E197A. Hence, cells were co-transfected with a siRNA targeting the 3'UTR of ING2 mRNA (to suppress ING2 endogenous expression) and with a plasmid expressing either WT ING2 complementary DNA (cDNA) or ING2 E197A cDNA (Supplementary Figure 2b). Such co-transfection allows obtaining cells expressing WT ING2 or ING2 E197A with reduced endogenous ING2 expression. The equal expression level of these two forms of ING2 was verified by western blot (Figure 5e). Quantitative real-time PCR analysis shows that *SPP1*, *TMEM71*, *LY96* and *H6PD* genes

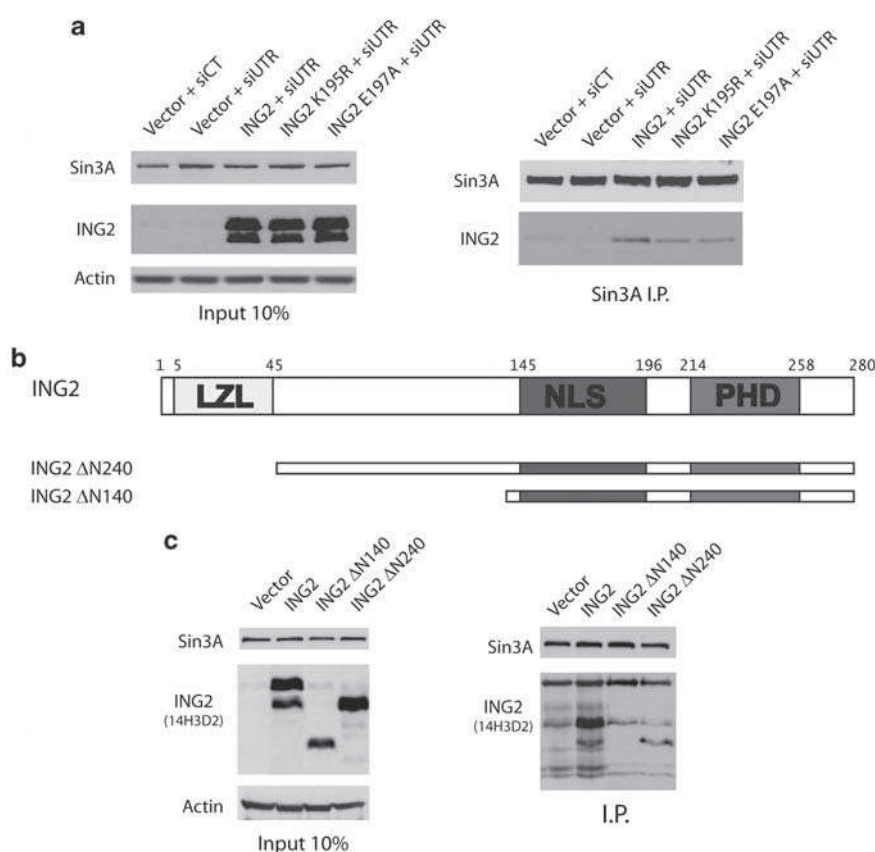


Figure 4 ING2 sumoylation on K195 is required for its binding to the Sin3A complex. **(a)** Western blot analysis of ING2 after endogenous Sin3A IP in U2OS cells transfected with the indicated vectors and siRNA. **(b)** Schematic representation of ING2 truncated mutants (ING2 ΔN140 and ING2 ΔN240) used. **(c)** Western blot analysis of endogenous Sin3A IP in U2OS cells transfected for 24h with the indicated vectors.

have a significantly lower expression in cells over-expressing ING2 E197A when compared with WT ING2, indicating that their expression is dependent on ING2 sumoylation (Figure 5f and Supplementary Figure 2c). On the contrary, *CMKOR1*, *SLC26A4* and *DUSP19* have the same level of expression in cells expressing both WT ING2 and ING2 E197A, suggesting that in these conditions ING2 sumoylation is not involved in their regulation (Figure 5f). Overall, these results show that ING2 directly regulates the expression of several genes and that the regulation of a subset of these genes also requires the sumoylation of ING2.

ING2 sumoylation and Sin3a mediate gene expression

As we have shown that the sumoylation of ING2 enhances its association with Sin3A and is required for the mediation of gene expression, we hypothesized that ING2 sumoylation, in association with Sin3A, could mediate gene expression. To address this question, we further analyzed the regulation of *TMEM71* gene whose expression appeared to be the most dependent on ING2 sumoylation (Figure 5f). In the first step, we analyzed the expression level of *TMEM71* in cells transfected with either a siCT or a siRNA directed against Sin3A (siSin3A). The efficiency of Sin3A downregulation was

analyzed by western blot (Figure 6a), and quantitative real-time PCR analysis showed a strong reduction of *TMEM71* expression in siSin3A-transfected cells when compared with control (Figure 6b). This result indicates that *TMEM71* expression is also dependent on Sin3A. To gain further insights into the mechanism of *TMEM71* regulation by Sin3A and its relationship with ING2, we performed a Sin3A ChIP on siCT- or siING2-transfected cells. PCR analysis of ChIP products (Figure 6c and Supplementary Figure 3) shows that Sin3A is present on the promoter of *TMEM71* in siCT cells but not in siING2 cells, indicating that the regulation of *TMEM71* expression by Sin3A may be direct and that its presence on this promoter is dependent on ING2. To further determine whether ING2 sumoylation is involved in this process, we performed another ChIP experiment of ING2 or Sin3A in cells co-transfected with siING2 3'UTR and WT ING2 or ING2 E197A. PCR analysis of these ChIPs shows that Sin3A targeting on this promoter required ING2 sumoylation and that ING2 itself needs to be sumoylated to bind to *TMEM71* promoter (Figure 6c). Altogether, these results show that both ING2 and Sin3A are present on *TMEM71* promoter in an ING2 sumoylation-dependent manner to mediate the expression of this gene.

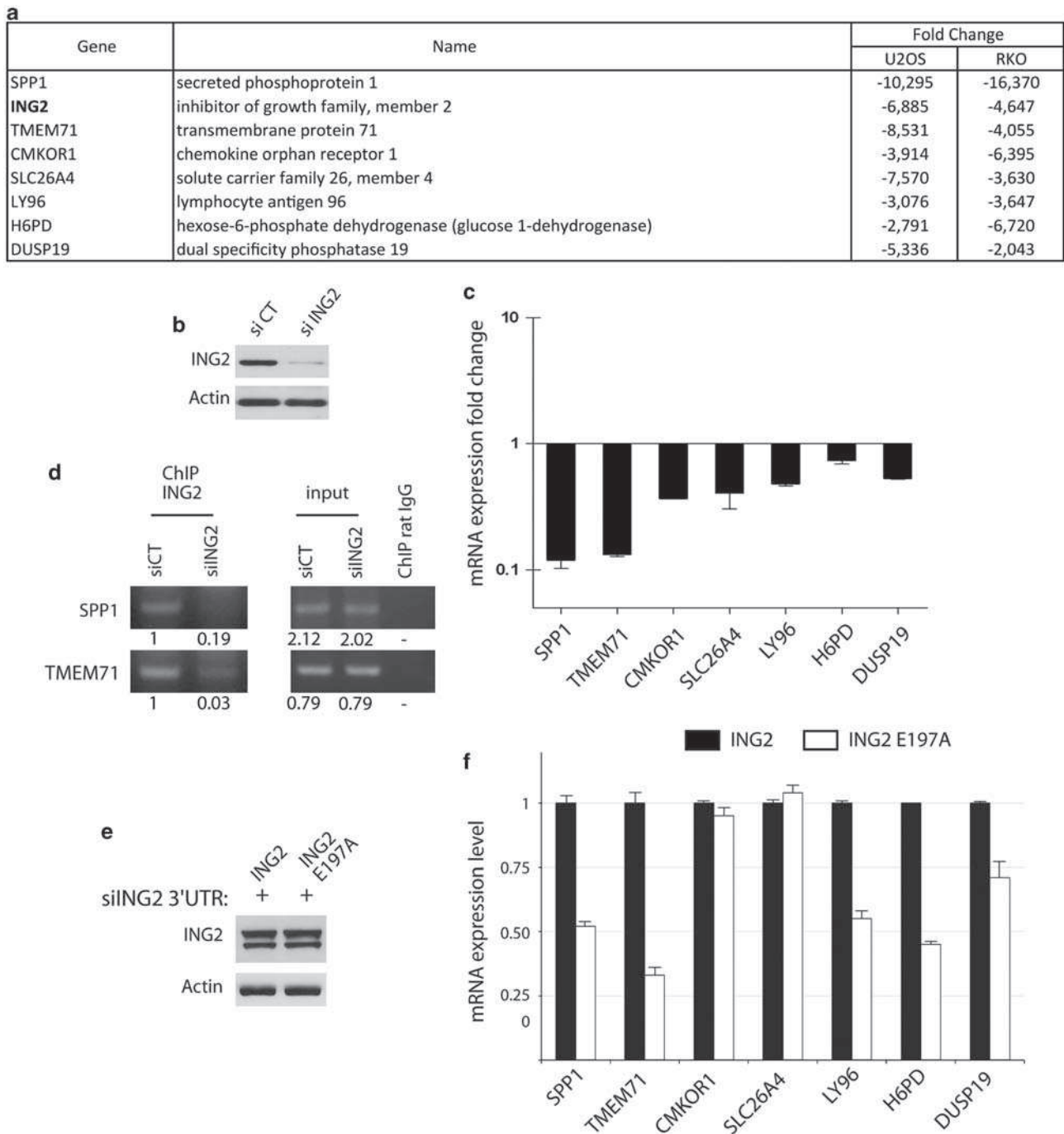


Figure 5 ING2 sumoylation mediates gene expression. (a) Summary of genes identified by microarray showing the strongest reduced expression after ING2 downregulation in both U2OS and RKO cell lines. (b) Western blot (WB) analysis of U2OS cells transfected with the indicated siRNA. (c) Quantitative real-time PCR (qPCR) analysis showing the mean of expression change for the indicated genes in cells transfected with siING2 (shown in b) compared and normalized with control cells. (d) PCR products of ChIP analysis performed with rat monoclonal ING2 antibody in cells transfected with the indicated siRNA, using specific primers for the indicated gene promoters. Input corresponds to 2% of cell lysates used for ChIP, and rat IgGs were used as control of ChIP specificity. PCR product signals were quantified using ImageJ (Bethesda, MD, USA). (e) WB analysis of U2OS co-transfected with the indicated siRNA and plasmid. (f) qPCR analysis of the indicated genes from cells shown in (e). The level of expression in WT ING2 cells was normalized to 1.

Discussion

Previous studies based on overexpression experiments have shown that ING2 acts as a cell proliferation inhibitor by regulating cell cycle progression, apoptosis

and senescence. As a matter of fact, it has been proposed to act as a type II (or gatekeeper) tumor-suppressor gene. Recently, we have shown that reduced ING2 expression, as it occurs in human tumors, results in an impaired DNA replication process and increased

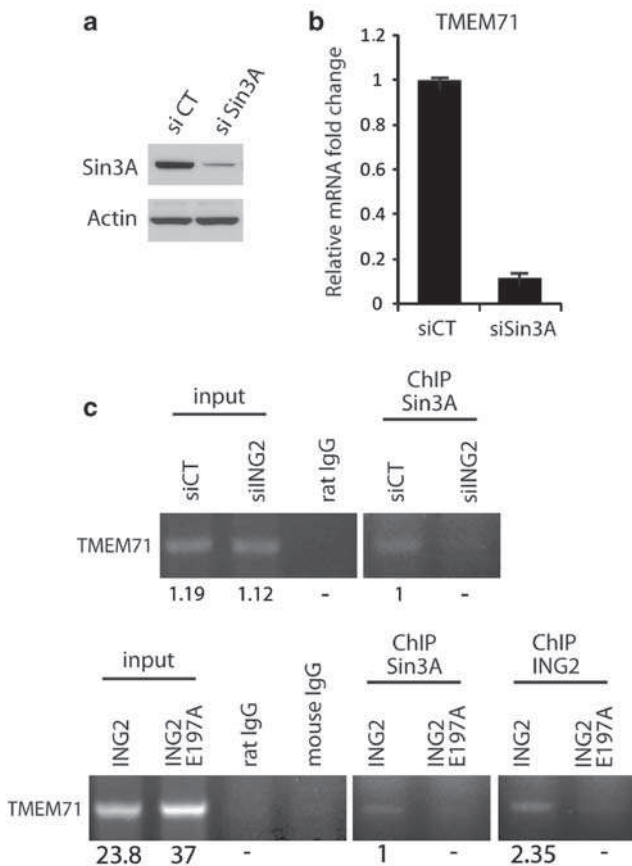


Figure 6 Sumoylation of ING2 is required for ING2 and Sin3A binding to *TMEM71* promoter. (a) Western blot (WB) analysis of U2OS transfected with the indicated siRNA. (b) Quantitative real-time PCR (qPCR) analysis of the indicated genes from cells shown in (a). The level of expression in control cells was normalized to 1. (c) PCR products of ChIP analysis performed with rat monoclonal ING2 or mouse monoclonal Sin3A antibodies in cells transfected or co-transfected with siRNA and plasmids when indicated, using specific primers for the *TMEM71* promoter. Input corresponds to 2% of cell lysates used for ChIP, and rat or mouse IgGs were used as control of ChIP specificity. PCR product signals were quantified using ImageJ.

genome instability (Larrieu *et al.*, 2009). Thus, ING2 would also act as a caretaker tumor-suppressor protein to prevent tumorigenesis and all ING proteins could have a role in the replication process (Larrieu and Pedoux, 2009). However, how ING2 itself is regulated is unknown.

In this study, we show that ING2 can be post-translationally modified by SUMO1 on lysine 195 (K195), both *in vitro* and *in vivo*. This residue is found within the sumoylation consensus motif A194KQE197. Thus, it is the first time that a post-translational modification of ING2 is reported. Bioinformatic analysis of the amino acid sequence of the other members of the ING proteins family with the SumoPlot online software shows the presence of several sumoylation consensus sequences. This suggests that all ING proteins could also be subjected to sumoylation. Thus, our findings provide new insights into how INGs could be regulated.

Interestingly, the sumoylated consensus site that we identified on ING2 is found within a PDSM (phosphorylation-dependent sumoylation motif). Such domain has recently been described and is composed of a sumoylation consensus site followed two or three amino acids further, by a serine and a proline (ψ KxExxSP) (Hietakangas *et al.*, 2006). In this study the authors show that the phosphorylation of the serine can regulate the sumoylation of the juxtaposed sumoylation consensus site. The potential PDSM of ING2 (A194KQEREASP202) is conserved on p33ING1b (A192KAEREASP200), suggesting that p33ING1b could also be sumoylated. p33ING1b has been reported to be phosphorylated on serine 199 (S199) to regulate its amount in the nucleus. Indeed, this phosphorylation event was shown to be required for p33ING1 binding to the 14-3-3 η cargo protein in order to be exported from the nucleus (Gong *et al.*, 2006). Interestingly, the serine 199 of ING1 is the serine residue belonging to the potential PDSM. As the potential PDSMs of ING2 and p33ING1b are sumoylated or phosphorylated, respectively, this strongly suggests that ING2 sumoylation could be regulated by an adjacent phosphorylation site and, reciprocally, that ING1 phosphorylation could regulate its potential sumoylation. Gong *et al.* (2006) observed p33ING1b exportation from the nucleus after 14-3-3 η overexpression. Thus, even if under our experimental conditions we observed that ING2 sub-cellular localization is independent on its sumoylation, we cannot exclude that in other conditions sumoylation of ING2 could be involved in this process.

As we initially hypothesized that ING2 could be sumoylated in the Sin3A complex, we investigated the role of ING2 sumoylation for its association with Sin3A. We show that ING2 sumoylation enhances its association with Sin3A. Sin3A is a stable component of the Sin3A/HDAC chromatin-modifying complex and is thus involved not only in the repression but also in the activation of a large number of genes (Dannenberg *et al.*, 2005; Farhana *et al.*, 2009). ING2 and Sin3A were previously shown to associate to regulate gene expressions (Shi *et al.*, 2006). Therefore, we investigated the role of ING2 sumoylation in this process. We found that among seven genes identified as regulated by ING2 (*SPP1*, *TMEM71*, *LY96*, *H6PD*, *CMKOR1*, *SLC26A4* and *DUSP19*), four of them (*SPP1*, *TMEM71*, *LY96* and *H6PD*) were also dependent on ING2 sumoylation. We also show that this regulation can occur directly via the recruitment of ING2 and Sin3A on the promoter of genes in a sumoylation-dependent manner. Interestingly, some of these genes have been associated with cellular processes in which ING2 is known to be involved. It is the case for the *SPP1* gene that has been shown to be an effector of p53 that is upregulated by p53 in response to DNA damage (Morimoto *et al.*, 2002). As ING2 has been previously described as being able to activate p53 in response to DNA damage, it could be interesting to investigate the potential link between the decrease in *SPP1* observed after ING2 downregulation and the activation of p53. Moreover, in addition to the genes identified in this study, it would be

interesting to determine whether ING2 sumoylation could be involved in the regulation of the genes that were previously identified in response to genotoxic stress (Shi *et al.*, 2006) or after overexpression of ING2 (Feng *et al.*, 2006). This would help determining in which condition ING2 is sumoylated and how this sumoylation is regulated.

As we show that ING2 sumoylation enhances its association with Sin3A, it is then possible that it can also regulate its association with other protein partners. For example, we have recently identified that ING2 can interact with the DNA replication elongation protein PCNA (proliferating cell nuclear antigen) to regulate normal DNA replication (Larrieu *et al.*, 2009). Thus, it would be interesting to investigate the role of ING2 sumoylation in this process. Further investigations on the sumoylation of other ING proteins could provide information on how their association with their known partners such as histone acetyltransferase and HDAC complexes could be regulated. Overall, this study highlights the first mechanism of ING2 post-translational regulation by sumoylation to regulate gene expression mediated by Sin3A and thus provides new insights into how ING proteins could be regulated.

Materials and methods

Cell culture

The colon carcinoma cell line, RKO, and the osteosarcoma cell line, U2OS, were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium and McCoy's 5A medium, respectively, supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 Ag/ml streptomycin. Cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Plasmid construction, siRNA and transfections

The truncated ING2 sequences, ING2 ΔC165, ING2 ΔC204, ING2 ΔN240 and ING2 ΔN140, were generated with PCR from pcDNA3.1-ING2 (Nagashima *et al.*, 2001) using site-specific primers and subcloned into the pcDNA3.1 between *Bam*HI and *Eco*RV. The primers were: 5'-GAGCTCGGATCATGTTAGGG-3' (sense) and 5'-CGGCGATATCCTAGTGACATAAATCACGGCTTTC-3' (anti-sense) for ING2 ΔC165; 5'-GAGCTCGGATCCATGTTAGGG-3' (sense) and 5'-CGGCGATATCCTACTCAACAGGTGAAGCTTCCC-3' (anti-sense) for ING2 ΔC204; 5'-GTCGGGATCCGACATGCAGAGGAACGTGTCTG-3' (sense) and 5'-GCGGCCGCCACTGTGCTGG-3' (anti-sense) for ING2 ΔN240; and 5'-GTCGGGATCCATGGATTCCAGCCAACCAG-3' (sense) and 5'-GCGGCCGCCACTGTGCTGG-3' (anti-sense) for ING2 ΔN140. The ING2 mutants, ING2 K72R, ING2 K139R, ING2 K195R and ING2 E197A were generated with the QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) from pcDNA3.1-ING2. The primers were: 5'-GAAAAATATAAGAGAGAAGATGATTTAAAC-3' (sense) and 5'-GTTTAAATCATCTTCTCTTATATTTTTTC-3' (anti-sense) for ING2 K72R; 5'-CCTCAGATAAAGCAAGGATGGATTCCAGCC-3' (sense) and 5'-GGCTGGAATCCATCCTTGCTTATCTGAGG-3' (anti-sense) for ING2 K139R; 5'-AACCAGTCCAAGGCCAGGCAGGAAAGGGAAG-3' (sense) and 5'-CTTCCCTTTCCTGCCTGGCCTTGG-3' (anti-sense) for ING2 K195R; and 5'-CCAAGGCCAAGCAGGCAAGGCTTCACC-3' (sense) and 5'-GGTGAAGCTTCCCTTGCCTGCTTGGCCTTGG-3' (anti-sense) for ING2 E197A. All the truncated and mutated ING2 were verified by sequencing. Stealth siRNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) sequence targeting the coding region of ING2 mRNA (siING2) or the 3'UTR of ING2 mRNA (siING2 3'UTR) were: 5'-CAAUGGAGUUACACUCACAGUGUU-3' and 5'-AGGGUAAAUGCAUAAGACUAUGCAAUAAU-3', respectively. For the control (siCT), the universal stealth siRNA negative control (Invitrogen) was used.

Plasmids were transfected using Lipofectamine reagent in combination with PLUS Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Stealth siRNAs were transfected using Lipofectamine RNAimax (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Plasmids and stealth siRNA were co-transfected using Lipofectamine2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Protein samples were subjected to electrophoresis using the NuPAGE Novex Bis-Tris Gel Electrophoresis system (Invitrogen). The antibodies used in this study included rabbit polyclonal anti-ING2 (Ping2) (Nagashima *et al.*, 2001), rat monoclonal anti-ING2 (Gozani *et al.*, 2003), mouse monoclonal anti-Sin3A (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and anti-β-actin (Invitrogen).

Western blot

Protein samples were subjected to electrophoresis using the NuPAGE Novex Bis-Tris Gel Electrophoresis system (Invitrogen). The antibodies used in this study included rabbit polyclonal anti-ING2 (Ping2) (Nagashima *et al.*, 2001), rat monoclonal anti-ING2 (Gozani *et al.*, 2003), mouse monoclonal anti-Sin3A (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and anti-β-actin (Invitrogen).

Immunoprecipitation

At 48 h after siRNA transfection or 24 h after plasmid transfection, cells were harvested in IP buffer (50 mM Tris pH 8, 500 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, 20% glycerol and 0.1% NP40) containing protease inhibitor cocktail (Roche, Meylan, France) and were subjected to freeze (liquid nitrogen) and thaw (37 °C) three times. Cells extracts were centrifuged at 12 000 g for 10 min and supernatants were recovered. Equal amount of protein extracts were incubated with the Sin3A antibody bound to protein A coupled to agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) for 4 h with rocking at 4 °C. Agarose beads were washed four times with IP buffer. Immunoprecipitated samples were analyzed by western blotting.

Histidine purification

At 24 h after plasmid transfection, cells were harvested and subjected to histidine purification under denaturing conditions using the ProBond™ Purification System (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The purified extracts were analyzed by western blotting.

CEF isolation

At 24 h after plasmid transfections, cells were harvested and their nuclei were isolated using the Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent kit (NE-PER; Pierce, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's instructions. The CEF was then isolated by resuspending cell nuclei in ice-cold hypotonic buffer (3 mM EDTA, 0.2 mM EGTA and 1 mM dithiothreitol, pH 7.8) containing protease inhibitor cocktail (Roche). After centrifugation at 1700 g for 5 min, the soluble fraction (supernatant) was removed and the CEF (pellet) was washed twice with the hypotonic buffer. The CEF was then resuspended by sonication in sonication buffer (10 mM Tris pH 7.4, 10 mM MgCl₂ and 10% sucrose) containing protease inhibitor cocktail (Roche, no. 362). Same protein amounts of CEF were analyzed by western blotting.

In vitro sumoylation

GST-ING2 (Abnova, Taipei, Taiwan) was subjected to *in vitro* sumoylation by SUMO1 using the SUMOylation kit (BIOMOL, Plymouth Meeting, PA, USA) according to the manufacturer's instructions. As sumoylation reaction required ATP, negative *in vitro* sumoylation reaction control was done without ATP. The resulting reaction products were analyzed by western blotting.

Immunofluorescence staining

U2OS cells were grown on coverslips in six-well plates. At 24 h after transfection, immunofluorescences were carried out as described previously (Sengupta *et al.*, 2003) with rat monoclonal anti-ING2. Images were visualized using ultraviolet microscope.

RNA isolation and reverse transcriptase-PCR analysis

Cells were lysed with TRIzol reagent (Invitrogen) and total RNA was isolated according to the manufacturer's instructions. RNA integrity was assessed by spectrophotometry with A260/A280 ratios of >1.7. In all, 1 µg of RNA was used for reverse transcription using the SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Obtained cDNAs were subjected to real-time PCR using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) with the Mx3005P Real-Time PCR System (Stratagene). Gene expres-

sion was calculated following normalization to 18S levels by the comparative Ct (Cycle threshold) method. Sequences of the primers used are summarized in Supplementary Table 1.

Chromatin immunoprecipitation

ChIP experiments were performed using the EZ-Magna ChIP kit (Millipore, Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank D Nissou for technical assistance; Dr O Gozani and C Harris for antibodies, plasmids and scientific discussion, and Dr Marc Piechaczyk and Dr Guillaume Bossis for scientific discussion and advising. RP was supported by ARC, the IASLC, an 'Agir à dom' grant and a Marie Curie International Reintegration Grant (MIRG-CT-2006-042148). DY, RB and DL were funded by the INCa, ARC, the FRM (Prix Mariane Josso) and the French Ministry of Education and Research, respectively.

References

- Bernier-Villamor V, Sampson DA, Matunis MJ, Lima CD. (2002). Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* **108**: 345–356.
- Bienz M. (2006). The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem Sci* **31**: 35–40.
- Borkosky SS, Gunduz M, Nagatsuka H, Beder LB, Gunduz E, Ali MA *et al.* (2009). Frequent deletion of ING2 locus at 4q35.1 associates with advanced tumor stage in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **135**: 703–713.
- Dannenberg JH, David G, Zhong S, van der Torre J, Wong WH, Depinho RA. (2005). mSin3A corepressor regulates diverse transcriptional networks governing normal and neoplastic growth and survival. *Genes Dev* **19**: 1581–1595.
- Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, Landry AJ, Cote V, Selleck W *et al.* (2006). ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell* **21**: 51–64.
- Farhana L, Dawson MI, Dannenberg JH, Xu L, Fontana JA. (2009). SHP and Sin3A expression are essential for adamantyl-substituted retinoid-related molecule-mediated nuclear factor-kappaB activation, c-Fos/c-Jun expression, and cellular apoptosis. *Mol Cancer Ther* **8**: 1625–1635.
- Feng X, Bonni S, Riabowol K. (2006). HSP70 induction by ING proteins sensitizes cells to tumor necrosis factor alpha receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* **26**: 9244–9255.
- Garkavtsev I, Kazarov A, Gudkov A, Riabowol K. (1996). Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat Genet* **14**: 415–420.
- Gill G. (2005). Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev* **15**: 536–541.
- Gong W, Russell M, Suzuki K, Riabowol K. (2006). Subcellular targeting of p33ING1b by phosphorylation-dependent 14-3-3 binding regulates p21WAF1 expression. *Mol Cell Biol* **26**: 2947–2954.
- Gozani O, Karuman P, Jones DR, Ivanov D, Cha J, Lugovskoy AA *et al.* (2003). The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* **114**: 99–111.
- Hay RT. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell* **18**: 1–12.
- Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A *et al.* (2006). PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 45–50.
- Hong Y, Rogers R, Matunis MJ, Mayhew CN, Goodson ML, Park-Sarge OK *et al.* (2001). Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem* **276**: 40263–40267.
- Larrieu D, Ythier D, Binet R, Brambilla C, Brambilla E, Sengupta S *et al.* (2009). ING2 controls the progression of DNA replication forks to maintain genome stability. *EMBO Rep* **10**: 1168–1174.
- Larrieu D, Pedoux R. (2009). SharLING out the roles in replicating DNA. *Cell Cycle* **8**: 3623–3624.
- Lu F, Dai DL, Martinka M, Ho V, Li G. (2006). Nuclear ING2 expression is reduced in human cutaneous melanomas. *Br J Cancer* **95**: 80–86.
- Matunis MJ, Coutavas E, Blobel G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **135**: 1457–1470.
- Mellor J. (2006). It takes a PHD to read the histone code. *Cell* **126**: 22–24.
- Morimoto I, Sasaki Y, Ishida S, Imai K, Tokino T. (2002). Identification of the osteopontin gene as a direct target of TP53. *Genes Chromosomes Cancer* **33**: 270–278.
- Nagashima M, Shiseki M, Miura K, Hagiwara K, Linke SP, Pedoux R *et al.* (2001). DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9671–9676.
- Nagashima M, Shiseki M, Pedoux RM, Okamura S, Kitahama-Shiseki M, Miura K *et al.* (2003). A novel PHD-finger motif protein, p47ING3, modulates p53-mediated transcription, cell cycle control, and apoptosis. *Oncogene* **22**: 343–350.

- Pedoux R, Sengupta S, Shen JC, Demidov ON, Saito S, Onogi H *et al.* (2005). ING2 regulates the onset of replicative senescence by induction of p300-dependent p53 acetylation. *Mol Cell Biol* **25**: 6639–6648.
- Rodriguez MS, Dargemont C, Hay RT. (2001). SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* **276**: 12654–12659.
- Sarker KP, Kataoka H, Chan A, Netherton SJ, Pot I, Huynh MA *et al.* (2008). ING2 as a novel mediator of transforming growth factor-beta-dependent responses in epithelial cells. *J Biol Chem* **283**: 13269–13279.
- Sengupta S, Linke SP, Pedoux R, Yang Q, Farnsworth J, Garfield SH *et al.* (2003). BLM helicase-dependent transport of p53 to sites of stalled DNA replication forks modulates homologous recombination. *EMBOJ* **22**: 1210–1222.
- Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T *et al.* (2006). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* **442**: 96–99.
- Shiseki M, Nagashima M, Pedoux RM, Kitahama-Shiseki M, Miura K, Okamura S *et al.* (2003). p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity. *Cancer Res* **63**: 2373–2378.
- Skowyra D, Zeremski M, Neznanov N, Li M, Choi Y, Uesugi M *et al.* (2001). Differential association of products of alternative transcripts of the candidate tumor suppressor ING1 with the mSin3/HDAC1 transcriptional corepressor complex. *J Biol Chem* **276**: 8734–8739.
- Terui Y, Saad N, Jia S, McKeon F, Yuan J. (2004). Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1. *J Biol Chem* **279**: 28257–28265.
- Ythier D, Larrieu D, Brambilla C, Brambilla E, Pedoux R. (2008). The new tumor suppressor genes ING: genomic structure and status in cancer. *Int J Cancer* **123**: 1483–1490.
- Ythier D, Brambilla E, Binet R, Nissou D, Vesin A, de Fraipont F *et al.* (2009). Expression of candidate tumor suppressor gene ING2 is lost in non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer* **69**: 180–186.
- Zhang HK, Pan K, Wang H, Weng DS, Song HF, Zhou J *et al.* (2008). Decreased expression of ING2 gene and its clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* **261**: 183–192.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

Résumé

La sénescence cellulaire est un mécanisme de suppression cellulaire caractérisé par un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Les cellules sénescents ont également un secrétome spécifique qui influe sur les cellules voisines, pouvant induire leur entrée prématurée en sénescence, l'apoptose, la prolifération cellulaire et le développement tumoral. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse était d'identifier une nouvelle protéine sécrétée par les fibroblastes sénescents et de caractériser ses fonctions dans les cellules sénescents et dans les cellules tumorales.

Nous avons mis en évidence la protéine WNT16B. Elle est surexprimée dans plusieurs modèles de sénescence cellulaire obtenus à partir de fibroblastes pulmonaires. Dans un modèle de souris transgénique, WNT16B est également associée avec l'accumulation de cellules sénescents dans les lésions précancéreuses pulmonaires. WNT16B est impliqué dans le mécanisme de sénescence cellulaire. En effet, l'inhibition de WNT16B prévient l'entrée en sénescence, en empêchant l'activation de p53 et l'expression de p21/WAF1, et donc l'arrêt du cycle cellulaire. Nous avons finalement associé l'expression de WNT16B avec la présence de cellules sénescents dans des tumeurs prélevées chez des patients atteints de carcinomes pulmonaires non à petites cellules. Cette expression est corrélée avec une meilleure survie pour les patients ayant reçu un traitement chimiothérapeutique. Ce dernier résultat fait donc le lien entre traitement, sénescence cellulaire et survie, et illustre le rôle potentiel des marqueurs des cellules sénescents pour le suivi des patients.

Globalement, ces travaux ont donc non seulement permis d'identifier WNT16B comme nouveau marqueur des cellules sénescents, mais ils ont également ouvert des perspectives d'utilisation de ce marqueur pour l'identification, le traitement et le suivi des patients atteints d'un cancer.

Abstract

Cellular senescence is a tumor suppression mechanism consisting of an irreversible cell cycle arrest. Senescent cells also express a specific secretome that plays a role in the microenvironment. It may induce premature senescence, apoptosis, cellular proliferation or tumor development in the neighboring cells. In this context, my thesis aimed to identify and characterize a new senescence-associated secreted protein, before highlighting its role in tumorigenesis.

We identified the WNT16B protein. It was overexpressed in various cellular senescence models obtained from lung fetal fibroblasts. Moreover, WNT16B expression was associated with the accumulation of senescent cells in precancerous lesions in a transgenic mice model. WNT16B is also involved in the senescence machinery. Indeed, WNT16B inhibition prevented the senescence onset through inactivation of the p53/p21 pathway, thus stopping the cell cycle progression. Finally, we observed a correlation between the WNT16B expression and the occurrence of senescent tumoral cells in NSCLC samples. This expression was also correlated with a better patient outcome after chemotherapeutical treatment. Thus, this last result linked the treatment efficiency, the occurrence of senescence and the patient survival.

Overall, my thesis established elevated WNT16B levels as a novel biomarker for senescence that might be useful for the identification, the treatment follow-up and the prognosis of patient outcome.