



Caractérisation de la sénescence des cardiomyocytes et identification de marqueurs associés

Damien Maggiorani

► To cite this version:

Damien Maggiorani. Caractérisation de la sénescence des cardiomyocytes et identification de marqueurs associés. Pharmacologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30320 . tel-02009859

HAL Id: tel-02009859

<https://theses.hal.science/tel-02009859>

Submitted on 6 Feb 2019

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

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Damien Maggiorani

le lundi 18 Décembre 2017

Titre :

Caractérisation de la sénescence des cardiomyocytes et identification de marqueurs associés

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Pharmacologie

Unité de recherche :

INSERM U1048 - I2MC - Equipe 6 & 7

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr. Jeanne Mialet-Perez et Dr. Victorine Douin-Echinard

Jury :

Pr. Serge Adnot, professeur des universités, PARIS - Rapporteur

Pr. Bertrand Friguet, professeur des universités, PARIS - Rapporteur

Pr. Bettina Couderc, professeur des universités, TOULOUSE - Présidente du jury

Dr. Jean-marc Brondello, chargé de recherches INSERM, MONTPELLIER - Examineur



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Damien Maggiorani

le lundi 18 Décembre 2017

Titre :

Caractérisation de la sénescence des cardiomyocytes et identification de marqueurs associés

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Pharmacologie

Unité de recherche :

INSERM U1048 - I2MC - Equipe 6 & 7

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr. Jeanne Mialet-Perez et Dr. Victorine Douin-Echinard

Jury :

Pr. Serge Adnot, professeur des universités, PARIS - Rapporteur

Pr. Bertrand Friguet, professeur des universités, PARIS - Rapporteur

Pr. Bettina Couderc, professeur des universités, TOULOUSE - Présidente du jury

Dr. Jean-marc Brondello, chargé de recherches INSERM, MONTPELLIER - Examineur

A toi, Andie

Remerciements

J'ai effectué mes travaux de thèse au sein des équipes 6 & 7 de l'institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (I2MC) situé au CHU de Toulouse Rangueil. De ce fait, je tiens tout d'abord à remercier le **Pr. Angelo Parini** et le **Pr. Daniel Cussac** ainsi que le **Dr. Frank Lezoualc'h** de m'avoir accepté au sein de leur équipe respective.

Avant de faire des remerciements plus personnels je tiens à remercier toutes les personnes qui ont activement participé à ce travail de thèse et qui, un jour ou l'autre, ont apporté une pierre à l'édifice.

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail. Ainsi, je remercie vivement le **Pr. Serge Adnot** et le **Pr. Bertrand Friguet** qui, en tant que rapporteurs, ont accepté de passer du temps à lire et d'évaluer ce mémoire, ainsi que le **Pr. Bettina Couderc** en tant que présidente du jury et le **Dr. Jean-Marc Brondello** pour sa participation en tant qu'examinateur de Thèse.

Je tiens aussi à remercier tout spécialement le **Pr. Bernard Ducommun** et le **Pr. Bettina Couderc** (encore une fois), qui, en tant que membres de mon comité de Thèse, ont à deux reprises accorder de leur temps et de l'énergie pour examiner l'avancée du projet afin d'en apporter une aide et une expertise extérieure précieuse.

Bien entendu, et puisque ce travail ne serait rien sans elles, je tiens à remercier (et féliciter) les deux personnes qui ont encadré ce projet, **Jeanne Mialet-Perez & Victorine Douin-Echinard**. C'est grâce à elles et à leur capacité à rendre ce travail pleinement coopératif entre les équipes 6 et 7 que ce projet a abouti. Même si le chemin fût parfois sinueux l'implication totale du duo a permis, à plusieurs reprises, de réorienter le projet vers une meilleure direction. Vous avez su faire en sorte que ce projet grandisse de concert avec nos idées et vous n'avez jamais négligé mon point de vue. De plus, j'ai toujours pu compter sur vous deux, que ce soit dans les phases de doutes, de flous ou de "toutvabien" pour m'aiguiller et m'encourager. Aujourd'hui, après cette Thèse je ressors plus grand, plus robuste et plus rigoureux et c'est en grande partie grâce à vous deux. Merci !

Je remercie aussi l'ensemble de l'équipe **Vectalys** pour leur implication dans le projet et leur coopération dans la mise au point des protocoles de transfection. De plus, je tiens à souligner la qualité des lentivecteurs fournis qui ont largement contribué à l'obtention de résultats fiables.

Je tiens aussi à chaleureusement remercier le **Dr. Joao Passos** de « l'institute for Ageing » de Newcastle, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pendant 2 mois, pour le partage de sa richesse intellectuelle et pour m'avoir inculqué son savoir-faire concernant l'étude des télomères. Je tiens aussi à le remercier pour sa disponibilité et son écoute lorsque j'ai eu des questions techniques ou théoriques sur la sénescence. Merci au **Pr. Peter Adams** du Beatson à Glasgow pour son analyse du RNA-seq et le partage des résultats.

Certains ne m'ont qu'aperçus, d'autres m'y ont vu plus souvent, mais le personnel des **plateaux techniques** de l'I2MC tient aussi une place importante dans ce travail. Merci à **Jean-José Maoret**, et **Frédéric Martins** du plateau Get-TQ, pour leur expertise et leur aide dans l'analyse transcriptomique. A l'heure où j'écris ces lignes, je suis à 117 plaques analysées sur votre plateau, donc oui, vous êtes des contributeurs majeurs. Merci à **Lucie Fontaine** du plateau d'histologie pour la formation sur le cytospin avec ces fameux cardiomyocytes bien trop fragiles. Enfin, merci à **Madjid Zanoun** et **Romina D'Angelo**, pour leurs conseils et la formation sur la microscopie confocale.

Toujours au sein de l'I2MC il y a deux équipes que je tiens à spécialement remercier, **l'équipe 6** et **l'équipe 7**.

Je tiens à remercier les acteurs principaux de l'équipe 6, mon équipe de résidence. Tout d'abord, les 3 thésards de l'équipe : **Hélène Martini**, avec sa bonne humeur (et son rire !) qui rayonne jusqu'au pays du beurre salé, **Julien Santelli**, toujours à 100%, mais qui nous alloue tout de même une bonne partie de son énergie pour nous donner un coup de main quand il le faut, et enfin **Mathilde Bizou** drôle et audacieuse elle reste une personnalité unique de cette équipe. Vous êtes devenus de vrais amis, alors encore merci !

Un merci vraiment spécial pour toi **Marianne Dutaur**, tu n'es jamais avare quand il s'agit de m'aider ou de NOUS aider, cette implication est précieuse et je pense sincèrement que tu es une perle dans ce laboratoire. Nous avons eu besoin de toi et la prochaine génération aura aussi besoin de toi. Puisses-tu revenir vite.

Merci à toi **Dimitri Marsal**, on se connaît depuis maintenant 4 ans et c'est vrai que ça a toujours été un plaisir de discuter (et de déconner) avec toi mais aussi parce que tu as toujours su voir les "erreurs" qui se glissent dans mes résultats.

Enfin, je remercie aussi **Nathalie Pizzinat** et **Lise Lefevre** qui ont toujours su me donner des conseils efficaces et bien sûr, et parce que c'est quelque chose qui se transmet, ici, dans l'équipe 6, merci pour votre sourire et votre bonne humeur.

Une pensée spéciale à toute l'équipe 7. Une équipe qui a beaucoup évolué pendant ma thèse, et dont certaines personnes, aujourd'hui ailleurs en France ou dans le monde, resteront inoubliables d'un point de vu professionnel et personnel. Je pense d'abord à toi **Nicola Manzela**, nos longues discussions "sénescence-football" me manquent déjà et j'espère vraiment te recroiser un jour en Italie. Je te souhaite dans tous les cas beaucoup de réussite dans ta nouvelle vie d'enseignant. Merci aussi à toi **Loubina Fazal** puisque tu es restée une parfaite camarade dans la mise au point et le perfectionnement de l'isolement des cardiomyocytes. Je te souhaite le meilleur sur Paris avec ta jeune famille. Parmi les vétérans de l'équipe 7, je remercie bien évidemment **Yohan Santin**, qui a toujours répondu présent, même le dimanche soir lorsque j'avais besoin d'une référence ou d'un protocole, tu es vraiment une personne sur laquelle on peut compter. Merci à vous aussi, **Marion Laudette**, **Loubna Kehal** et **Roberto Pane** car, même si je n'étais parfois qu'un fantôme, (là-haut) dans l'équipe 7 vous ne m'avez jamais ignoré et votre bon cœur m'a toujours soutenu et guidé aux travers des différents laboratoires que vous avez arpenté. TOP !

Merci **Florence Tortosa** pour ton implication dans tous les projets de l'équipe et pour ton énergie. Je remercie aussi, **Yannis Sainte-Marie** pour ses conseils aussi bien dans le domaine de l'*in vivo* que dans l'ensemble des sujets abordés et **Caroline Conte** pour son expertise incroyable en biologie moléculaire.

Je remercie aussi **Bénédicte Buffin-Meyer** et **Stéphanie Gayral** qui m'ont encadré lors de mes stages de M2 et de M1 respectivement, et dont les enseignements furent d'une aide remarquable. Vous avez été pour moi de véritables tremplins pour voir plus loin, plus haut.

D'un côté beaucoup plus personnel, la liste des personnes à remercier est longue.

Je vais commencer par vous, ma famille, **les Maggio** de Cornebarrieu, parce que vous me soutenez déjà depuis maintenant 27 ans, et c'est déjà conséquent. **Maman**, **Papa**, vous m'avez toujours boosté, vous avez toujours su comprendre mes souhaits et trouver les mots pour consolider mes espoirs, mêmes fragiles. Si j'en suis là aujourd'hui, à écrire les remerciements d'une Thèse dont je

suis fier, c'est parce que vous avez été des acteurs à part entière. Croyez-le, aujourd'hui, c'est à moi d'être fier de vous. Merci infiniment pour ce que vous êtes.

Loïc, Nicolas, mes deux frères, qu'importent l'ordre et l'âge vous avez une place égale dans mon cœur. Vous étiez là quand ça n'allait pas et c'est devenu beaucoup mieux grâce à vous. Entre les goûters gargantuesques à Merville, et la route des bières à Lille, je suis servi ! Entre vos mains se dessinent de superbes projets, qui j'espère, seront aussi puissants que l'énergie que vous m'avez transmis. Merci les roy !

Les belles sœurs, vous le savez déjà, mais je vais le redire, juste au cas-où, vous êtes parfaites. Toi **Amandine**, pour tes talents en pâtisserie et pour ce magnifique trésor de quelques centimètres, désormais bipède, mais aussi toi **Marie** qui nous a offert quelques clés pour la découverte de ce splendide pays basque, je vous remercie, bien haut, du sommet du Mondarrain.

A toi **Hina**, hug, akipalo, ba ba ba, og og, gal gla bla. Je traduis pour ceux qui ne parlent pas le bébé : tu m'as donné beaucoup de joies durant ces premières années d'existence, bravo ! Tu es pleine de malice. Une vraie Maggio !

Merci aussi la famille **Maggio** de toute la France, les cousines, **Chacha, Bubu, Marion** (ouais je ne suis pas encore adepte de Pouthci), le cousin **YoYo** et les oncles et tantes, **Jean-charles & Vero, Jean-Mi & Fred** parce qu'on ne va pas se mentir, les cousinades, les repas de famille, ça peut paraître ennuyeux, mais avec vous c'est autre chose, c'est vraiment cool ! Et ce genre de moments, pendant un travail de thèse, c'est d'une importance capitale. Merci beaucoup, j'ai de la chance de vous avoir ! Ah et YoYo, t'es le prochain si je ne me trompe pas ! Courage !

Toujours coté famille je remercie l'ensemble de la famille **Casalé. Tati-LoL & Alain** ainsi que **Nath & Jean-Marc** et toute votre tribu, même si on ne s'est (malheureusement) pas beaucoup vu durant ces 3 dernières années je garde en mémoire les nombreuses invitations refusées pour les balayer très bientôt et enfin se retrouver autour d'une belle table, parce qu'avec vous aussi c'est chouette les repas de famille. A très vite je l'espère !

Une place spéciale aux piliers familiaux, les doyens, les artistes qui ont façonné ces deux familles : les grands parents, **Papy Riton & Mamy Tinou** ainsi que **Mamy Raymonde & Papy Moustache**. C'est grâce à eux finalement tout ceci ! Ils ont tout bâti de leurs petites mains, ont vécu bien des difficultés, mais ils sont toujours là et c'est magnifique. C'est un véritable trésor que de vous avoir avec nous. Merci infiniment.

Enfin, j'ai de nombreux **amis** à remercier.

Remi, comme tu le sais, cette Thèse aura été marquée par de nombreux bouleversements dans ma vie et tu as vraiment toujours été là. Aujourd'hui, tu tiens une place vraiment spéciale dans mon existence. Pour faire simple on va dire que t'es un VIP parmi les VIP, le président de l'univers sur terre, les gros morceaux de chocolats sur les cookies, la chantilly sur les gaufres, l'excès de Nutella accumulé dans le coin de la crêpe, la glace au goût malabar, le kilo de bonbon offert à Glup's lors des soldes, le *double-coat* des Tim-Tam, les MAO-Croqui et le saucisson au cinéma ou peut-être même le dernier dinosaure sur terre (oui je sais...ça en jette !). Pour le coup, je n'ai pas le mot pour dire merci, alors je vais l'inventer : Merciplusplusplus® !

Merci à toi **JC**, je te connais depuis maintenant très longtemps (je ne parviens plus à compter), et tu as eu le temps de me voir évoluer, tu sais aussi comment je fonctionne alors tes conseils ont toujours été précieux. Je tiens aussi à vous remercier **GoGo** et **Laetitia**, même si on est plus très proches (géographiquement) ces années de BTS resteront uniques et pleines d'expériences et c'est grâce à vous. Vous comptez toujours autant à mes yeux, c'est donc impossible de vous oublier ! Un merci particulier à toi **Simon**, on se croise toujours à l'I2MC et c'est vraiment appréciable de pouvoir garder le contact avec toi, l'homme curieux qui n'a de cesse de me surprendre. Par ailleurs, je te remercie aussi **Paul**, pour ton fabuleux talent de conteur d'histoires qui ouvre à l'imagination, une compétence essentielle en recherche, **Maxime**, pour ton sens critique aiguisé mais aussi et surtout pour ton implication dans tout ce que nous avons entrepris ensemble, **Brice**, pour m'avoir enseigné certains rouages du leadership et pour toutes ces soirées « gaming », **Avedis**, pour ta capacité incroyable à me faire rire de façon fortuite et pour ton aide lors de la rédaction du manuscrit et enfin **Michael** pour tes incroyables compétences de lanceur de fléchettes qui ont largement égayé nos soirées du Mercredi au Dubli.

Lors de l'écriture de ces remerciements, je pense aussi à l'ensemble de **l'équipe pédagogique du BTS Bioanalyses et contrôles** du lycée Saliège, **Tchoupie** la lapine malicieuse qui m'a accompagné lors de la rédaction du manuscrit, la team des **BFF** (dont je ne fais pas partie) pour m'avoir fait passer d'excellents moments, **Anthony Lagnado** qui devient aujourd'hui un grand champion du running et j'en suis fier, le **Sergent-chef Mortier**, l'ami du Tarmac, qui a accompli chaque missions avec une grande efficacité, **JJ-Soueix**, pour sa culture cinématographique burlesque et sa gentillesse qu'il distribue généreusement, à **Netflix** qui m'aide bien à changer d'air (et à perdre mon temps), **Gauthier Foucras** qui a été d'une grande aide lors de ma première année de Thèse, **Pierre Sicard** qui a été mon maitre Jedi de l'isolement de cardiomyocytes, **Henry** mon super ex-entraîneur de Roller qui m'a

appris à jongler avec la persistance, la patience et la motivation et **Laurent**, tu partages une passion pour la gastronomie que je trouve formidable j'ai hâte de découvrir ton nouveau projet de restauration. Enfin, merci à tous les bonbons et autres aliments excessivement sucrés qui m'ont permis de m'alimenter correctement durant ces quelques mois de rédaction.

Une dernière pensée émue, pour toi **Andie**.

A vous tous, à ceux que j'aurai oublié, je vous adresse un chaleureux Merci !

Liste des abréviations

36B4 : Ribosomal protein lateral stalk subunit P0
4E-BP : Eukaryotic initiation factor 4E-Binding Protein
4-HNE : 4-HydroxyNonEnal
8-oxo-dG : 8-OXO-2-deoxyGuanosine
ACE : Enzyme de Conversion
ADN : Acide désoxyribonucléique
AMPc : Adénosine MonoPhosphate Cyclique
ANP : Atrial Natriuretic Peptide
ARN : Acide ribonucléique
AT-1 -2 : Récepteur de l'Angiotensine 1 -2
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR : ATM and RAD3
BLSA : Cohorte Baltimore Longitudinal Study of Aging
BNP : Brain Natriuretic Peptide
BPCO : BronchoPneumopathie Chronique Obstructive
Ca²⁺ : Calcium
CaMKII : Protein kinase II dépendante de la calmoduline
CDK: Cycline Dependent Kinase
CDKi: Cycline Dependent Kinase Inhibitor
CR : Chaîne Respiratoire
CXCL : C-X-C Motif Chemokine Ligand
Cyp2b10 : cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10
D : Dasatinib
DDR : DNA Damage Response
Edn3 : Endothéline 3
EROs : Espèces Réactives de l'Oxygène
ET_{A/B} : Récepteur à l'endothéline A et/B
FA : Fibrillation Auriculaire
FE : Fraction d'Ejection
GAPDH : GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase

GDF : Growth Differentiation Factor

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HDAC : Histones DesACétylases

IC : Insuffisance Cardiaque

ICFEA : Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection altérée

ICFEP : Insuffisance cardiaque à fraction éjection préservée

IL-6 : Interleukine-6

IL-8 : Interleukine -8

INK4 : INhibitor of CDK4

KCNK1 : potassium two pore domain channel subfamily K member 1

L-Type Ca²⁺ : Canaux Calciques voltage-dépendants de type L

MAO-A : MonoAmine Oxydase-A

MAO-B : MonoAmine Oxydase-A

MDH1: Malate DesHydrogénase cytosolique 1

MDM2 : Murine Double Minute 2

MiDAS : Mitochondrial associated Dysfunction Associated-Senescence

MMP : Matrix MettaloProteinase

mnSOD : SuperOxyde Dismutase mitochondriale

mTOR : target of Rapamycine

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NO : Oxyde Nitrique

NRF1 -2 : Nuclear respiratory factor 1 -2

p38 MAPK : p38 Mitogen Activator Protein Kinase

Pah : Phenylalanine hydroxylase

PDGF-AA : Platelet-Derived Growth Factor AA

PGC-1 α – β : Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma, Coactivator 1 Alpha – beta

PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase

PINK1 : PTEN-Induced Putative Kinase 1

PKA : Protéine Kinase A

PNL : PhosphoLamban

Poly: Polymerase γ

POT1 : Protection Of Telomere 1

pRB : Protéine du RetinoBlastome

Prom2 : Prominin-2

Q : Quercetin

RAA : Rénine-Angiotensine-Aldostérone

RS : Reticulum Sarcoplasmique

RyR : Ryanodine Receptor

S6K : S6 Kinase

SA- β Gal : Senescence Associated β -Galactosidase

SERCA : sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase

SIPS : Stress Induced Premature Senescence

TAF : Telomere Associated Foci

TERC : TElomerase RNA Component

TERT : TElomerase Reverse Transcriptase

TFAM : Transcription Factor, Mitochondrial A

TGF β : Transforming Growth Factor β

TIN2 : TRF1-Interacting Nuclear Factor 2

TRF1-2 : Telomeric Repeat Binding Factor 1 -2

UV : UltraViolet

VD : Ventricule Droit

VG : Ventricule Gauche

α - β -MHC : α - β -Myosin Heavy Chain

β 2MG: MicroGlobuline Bêta 2

γ H2AX : Histone 2 AX phosphorylé

Sommaire

Remerciements	2
Liste des abréviations	8
Sommaire	11
Table des illustrations et des tableaux	15
Résumé des travaux	16
Summary	18
Introduction générale	20
I - Le vieillissement et les pathologies associées	20
1- Vieillesse de la population	20
2- Les pathologies associées au vieillissement	21
a) La fragilité	21
b) Le vieillissement pathologique et les pathologies associées	22
3- Le cœur et le vieillissement	24
a) Perturbation de la fonction cardiaque avec le vieillissement	25
b) Altération de la fonction rythmique cardiaque	26
c) Fibrose du tissu cardiaque	27
4- L'insuffisance cardiaque	28
a) Généralités sur l'insuffisance cardiaque	28
b) Les symptômes et la classification	29
c) Les marqueurs biologiques	30
d) Les comorbidités et étiologie de l'IC	31
d.1) Traitement de l'insuffisance cardiaque	31
5- Conclusion	32
II- La sénescence cellulaire	33
1- Découverte du concept de sénescence cellulaire par Hayflick et Moorhead	33
2- Caractéristiques générales de la sénescence	34
a) L'arrêt du cycle cellulaire	34
a.1) Activation de la voie p53/p21 ^{CIP1}	35
a.2) Expression des gènes de la famille INK4a	35
b) Modifications nucléaires	38

b.1) Perte de la lamine	38
b.2) Erosion télomérique	38
b.3) Foyers d'hétérochromatine et distension des satellites	39
c) Phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP)	40
c.1) Définition du SASP	40
c.2) Cytokines et chimiokines	41
c.3) Insulin growth factor binding protein (IGFBp)	41
c.4) Transforming growth factor (TGF β)	42
c.5) Métalloprotéinases	44
c.6) Inhibiteurs du plasminogène	45
c.7) Mécanismes d'induction du SASP	45
c.2) Variabilité du SASP	46
d) Hypertrophie cellulaire	46
e) Altération du lysosome	47
e.1) La SA- β Gal	47
e.2) L'accumulation de lipofuscine	48
f) Résistance à l'apoptose	48
g) Oxydation de macromolécules cellulaires	49
3- Les limites des marqueurs d'identification actuels et l'émergence de nouveaux outils	50
a) Les limites des marqueurs actuels	51
b) Vers l'utilisation de nouveaux outils d'identification spécifiques	52
III-Mécanismes inducteurs de la sénescence	54
1- Activation de la voie de dommage à l'ADN	54
a) La mécanistique de la DDR	54
b) Les mécanismes initiateurs de la DDR	56
c.1) Raccourcissement des télomères	56
c.2) Le stress oxydant	57
2- Altération de la fonction et de la dynamique mitochondriale	61
a) Modification de la fonction mitochondriale	62
b) Modifications de la dynamique mitochondriale	63
b.1) La biogénèse mitochondriale	63
b.2) Modifications du recyclage mitochondrial (mitophagie)	64
3- Activation des gènes du locus INK4	64

a)	Régulation des INK4 par la DDR	65
b)	Régulation indépendante de la DDR	65
4-	La sénescence induite par le stress	66
d.1)	Modèles in vitro	67
d.2)	Modèles in vivo	68
5-	Rôle de la sénescence cellulaire	69
a)	Aspects bénéfiques	69
a.1)	Rôle anti tumoral	69
a.2)	Rôle dans le développement	70
a.3)	Rôle dans la cicatrisation	71
b)	Aspects délétères	71
b.1)	Aspect pro-tumoral	72
b.2)	Rôles dans la survenue de pathologies chroniques	72
c)	Vers l'émergence de nouvelles thérapies	74
IV-	La sénescence des cardiomyocytes ?	76
1-	Les cardiomyocytes du cœur âgé	76
a)	Hypertrophie des cardiomyocytes	77
a.1)	Caractéristiques moléculaires de l'hypertrophie	78
a.2)	Mécanismes inducteurs de l'hypertrophie	78
b)	La mitochondrie des cardiomyocytes lors du vieillissement	81
c)	Altération de la fonction contractile des cardiomyocytes	82
d)	La présence de cardiomyocytes sénescents ?	83
2-	Les premiers travaux sur les cardiomyocytes	84
3-	Des études plus récentes	85
4-	La sénescence post-mitotique au sein d'autres cellules	86
c.1)	La sénescence des adipocytes	86
c.2)	La sénescence des neurones	87
5-	Problématiques actuelles concernant la sénescence des cardiomyocytes	88
V-	Conclusion de l'introduction et objectifs	88

Résultats 90

Etude 1 : Rôle des dommages aux télomères dans l'induction de la sénescence des cardiomyocytes	90
Avant-propos	90

Article 1 (en cours de soumission, nature communications)	91
Conclusion de la première étude	135
Etude 2 : Identification de marqueurs moléculaires spécifiques des cardiomyocytes	137
Avant-propos	137
Article 2 (en cours d'écriture)	138
Conclusion de la seconde étude	169
Conclusions et perspectives générales	170
Résultats complémentaires	174
Bibliographie	176
Annexes	198

Table des illustrations et des tableaux

Figures :

Figure 1. Prévision de la croissance de la population âgée de plus de 60 ans (d'après UN-DESA world population aging 2013).....	21
Figure 2. Evolution des pathologies chroniques avec l'âge (d'après Niccoli and Partridge, 2012)	23
Figure 3. Evolution de l'onde E/A dans la cohorte BLSA et Framingham au cours de l'âge (d'après Strait et Lakata 2012)	25
Figure 4 : Le réseau électrique cardiaque simplifié (d'après de la fédération française de cardiologie)	26
Figure 5. Les pathologies cardiaques associées à l'âge (d'après Steenman and Lande, 2017).....	28
Figure 6 : Classification NYHA, comportant les 4 stades cliniques.....	30
Figure 7. Les caractéristiques de la cellule sénescente (Image créée à partir de la banque d'images MedicalArt�).....	34
Figure 8 : Expression et cibles des gènes du locus INK4-Arf (d'après Sherr and Roberts, 1995)	36
Figure 9 : Rôle des inhibiteurs du cycle cellulaire CIP/KIP et INK (d'après Dehay and Kennedy, 2007).....	37
Figure 10. Voie du TGF� (d'après Neuzillet et al 2015).....	43
Figure 11. Les mécanismes de la DDR (d'après Dulic, 2013)	56
Figure 12 : Production d'ERO par la mitochondrie (d'après Finkel, 2011)	58
Figure 13. Structure du télomère et du complexe shelterin (d'après Calado and Young, 2008).....	61
Figure 14. Importance des télomères dans l'induction de la sénescence (d'après Victorelli and Passos, 2017) .	67
Figure 15. Modèle INK-ATTAC (d'après Baker et al., 2011).....	74
Figure 16. Mesure de l'épaisseur de la paroi postérieure cardiaque (d'après Lakata et Levy 2003)	77
Figure 17 : Homéostasie du cycle calcique (d'après Kawase & Hajjar 2008)	83
Figure 18. Evolution de l'architecture cardiaque avec l'âge (d'après Biernacka and Frangogiannis, 2011).....	84

Tableaux :

Tableau 1. Bilan des principales protéines du SASP (adapté d'après Kuilman and Peeper, 2009 et Coppé et al., 2010)	41
Tableau 2. Limite des marqueurs de sénescence actuels (inspiré de Bernardes de Jesus and Blasco, 2012; Sharpless and Sherr, 2015)	52
Tableau 3. Liste des gènes candidats marqueurs de sénescence spécifiques des cardiomyocytes sénescents.....	137

Résumé des travaux

Le vieillissement de l'organisme prédispose à de nombreuses pathologies chroniques telles que l'insuffisance cardiaque (IC). Des études récentes ont montré que l'accumulation de cellules sénescents dans les organes au cours du vieillissement est associée à l'apparition de ces pathologies. La sénescence cellulaire a initialement été décrite comme un arrêt stable du cycle cellulaire permettant de limiter la prolifération des cellules dont l'ADN est endommagé. Ce processus s'accompagne de profondes modifications de la fonction cellulaire, avec notamment l'acquisition d'un phénotype sécrétoire associé à la sénescence. La sénescence peut être induite par un raccourcissement des télomères ou par l'exposition à des signaux de stress, tels que le stress oxydant ou l'irradiation, qui entraînent l'activation de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN et l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs (p16^{INK4a}, p21^{CIP1}, p53). Ces inhibiteurs du cycle cellulaire sont classiquement utilisés comme marqueur de sénescence car leur expression augmente de manière ubiquitaire au cours du vieillissement. Toutefois, ces marqueurs ne sont pas spécifiques du tissu concerné et un des objectifs de ma thèse a été d'identifier de nouveaux marqueurs de sénescence tissu-spécifiques qui pourraient caractériser un vieillissement cardiaque pathologique. Le vieillissement cardiaque se caractérise par une hypertrophie des cardiomyocytes, une sensibilité accrue au stress et une prédisposition à l'IC. Les cardiomyocytes étant des cellules post-mitotiques, les mécanismes de sénescence mis en jeu, les marqueurs associés et leur rôle potentiel dans l'IC demeurent à l'heure actuelle peu caractérisés. Au cours de ce travail de thèse nous avons donc entrepris : 1) d'étudier le rôle des télomères et des dysfonctions mitochondriales dans l'induction de la sénescence du cardiomyocyte et 2) d'identifier des marqueurs spécifiques.

Nous avons tout d'abord montré que les cardiomyocytes de souris âgées expriment les marqueurs classiques de la sénescence comme p16^{INK4a}, p53 et p21^{CIP1}. Concernant les mécanismes inducteurs, nous avons étudié l'implication des dommages télomériques (telomere associated foci, TAF). Au cours du vieillissement, nous avons observé une augmentation du nombre de TAFs par cardiomyocytes en association avec l'hypertrophie. De plus, l'induction de TAFs *in vitro* est suffisante à l'activation de la voie de sénescence p53/p21^{CIP1} et l'hypertrophie dans une lignée de cardiomyoblastes H9c2. La formation des TAFs est augmentée chez des souris avec une dysfonction mitochondriale et est associée à l'activation des voies p53/p21^{CIP1}. Par ailleurs, les cardiomyocytes

âgés présentent une dérégulation des gènes impliqués dans la biologie mitochondriale pouvant rendre compte de l'augmentation des TAFs. Par l'analyse haut débit du transcriptome (RNAseq) nous avons identifié six nouveaux gènes qui sont surexprimés dans les cardiomyocytes sénescents (Prom2, Kcnk1, Pah, Edn3, Gdf15, Tgfb2). La comparaison d'expression de ces gènes dans le cœur avec d'autres tissus et avec le stroma cardiaque lors vieillissement a permis de confirmer la spécificité d'expression de ces marqueurs au niveau des cardiomyocytes. Nous avons validé cette signature dans deux modèles *in vitro* de sénescence induite par le stress et démontré que l'expression de certains de ces marqueurs est dépendante de la voie p53. De plus, l'expression de Prom2 est associée à l'hypertrophie des cardiomyocytes.

En conclusion, nous avons démontré, qu'avec le vieillissement, les cardiomyocytes présentent un programme de sénescence associé à une dysfonction mitochondriale et une augmentation des TAFs. Cette sénescence se caractérise par l'activation des voies classiques de sénescence (p16^{INK4}, p53/p21^{CIP1}), une hypertrophie et l'acquisition d'une signature spécifique. Ces marqueurs offrent de nouvelles perspectives dans la compréhension de la sénescence cardiaque et dans son implication potentielle dans l'IC.

Summary

Ageing of the organism is associated with several chronic pathologies such as heart failure (HF). Recent studies have demonstrated the link between the accumulation of senescent cells during ageing and age-associated diseases. Cellular senescence, originally defined as a stable cell cycle arrest, acts as a tumorigenic repressor by limiting the proliferation of DNA damaged cells. Despite this protective effect, senescence is characterized by deep remodeling of cell biology which drives functional disorders, such as the acquisition of a senescence-associated secretory phenotype (SASP). Senescence can be induced by telomeric attrition and by exposition to cellular stress signals such as oxidative stress or irradiation, which induce telomeric damage, activation of the DNA Damage Response (DDR) and increased expression of antitumoral genes (p16^{INK4a}, p21^{CIP1}, p53). These genes are classically used as markers of senescence because their expression increases in several tissues during ageing but they are not tissue-specific. Therefore, At the cardiac level, ageing is characterized by cardiomyocytes hypertrophy, increased sensitivity to stress and highest risk of developing HF. Cardiomyocytes are post-mitotic cells and the senescence inductor mechanisms, specific markers and their role in HF remains poorly understood. This thesis project is articulated around two aims, 1/ studying the role of telomeric damages and mitochondrial dysfunction in triggering cardiomyocyte senescence and 2/ identification of specific markers.

Firstly, we showed that aged cardiomyocytes overexpress classic markers of senescence such as p16^{INK4a}, p53 et p21^{CIP1}. Concerning the inductor mechanisms, we studied the implication of telomeric damages (telomere associated foci, TAF). During ageing, we found an increased number of TAFs per cardiomyocytes and their association with hypertrophy. Moreover, TAF-induction in cardiac H9c2 in vitro activated the p53/p21 pathway and induced senescence. These data confirmed the role of TAFs in cardiomyocyte senescence induction. Furthermore, aged cardiomyocytes exhibit a global alteration of genes involved in mitochondrial biology, oxidative stress and metabolism in aged cardiomyocytes that could play a prominent role in TAF accumulation with ageing. In a second part of the study, by using a next generation sequencing method (RNA-seq) we identified 6 new genes highly expressed in senescent cardiomyocytes (Prom2, Kcnk1, Pah, Edn3, Gdf15 and Tgfb2). Expression comparison with other senescent organs and cardiac stromal cells confirmed these new genes as cardiomyocyte specific. Thanks to an in vitro approach, we validated this signature by using different models of stress-induced senescence in cardiac H9c2 cells and demonstrated the implication of the

p53 in the regulation of some of these genes. Moreover, Prom2 expression is associated with cardiomyocytes hypertrophy.

In conclusion, we demonstrated that, with ageing, cardiomyocytes display a senescence phenotype associated with mitochondrial dysfunction and TAFs. This process is characterized by classic markers (p16^{INK4}, p53/p21^{CIP1}), hypertrophy and new identified signature. These new markers offer innovative perspectives in the understanding and the identification of the cardiac senescence and their potential deleterious role in heart failure.

Introduction générale

I – Le vieillissement et les pathologies associées

1- Vieillissement de la population

L'espérance de vie n'a cessé d'augmenter ces dernières années. En accord avec le dernier rapport de 2015 rédigé par l'United Nation DEpartement of Social Affairs (UN-DESA), il est estimé que d'ici à 2050 la population mondiale passera de 7,3 milliards à 9,7 milliards d'habitants, soit une croissance de 1.18% par année. Associé à cette augmentation, il est aussi estimé que la population des personnes âgées de plus de 65 ans augmentera de façon considérable (environ 28% en 2050 contre 16% en 2010), aussi bien dans les pays industrialisés que dans les pays en voie développement (UN-DESA world population aging 2013) (**Figure 1**). Ainsi, le nombre de personnes âgées de plus de 60 ans devrait doubler en 2050 et tripler en 2100, passant donc de 901 millions en 2015 à 2.1 milliards en 2050 et 3.2 milliards en 2100. De façon encore plus notable, la population âgée de plus de 80 ans devrait plus que tripler d'ici à 2050, augmentant par conséquent la population actuelle de 125 millions à 434 million en 2050.

L'évolution croissante de la population des personnes âgées n'est pas sans conséquence et intègre de nombreuses problématiques de santé publique. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) une personne dont l'âge est égal ou supérieur à 60 ans est considérée comme âgée. Toutefois, même si cette définition reste stricte, elle a surtout une valeur administrative, puisque le phénomène de vieillissement reste un processus extrêmement complexe et difficile à définir par l'utilisation de l'âge chronologique. D'un point de vu biologique, le vieillissement se caractérise par de nombreuses modifications d'ordre cellulaire pouvant avoir une influence sur la survenue de pathologies. Ainsi, en association avec le vieillissement, une diminution des fonctions vitales et de l'homéostasie de l'organisme est observée. Ces modifications sont par ailleurs variables d'une personne à l'autre et rendent compte des différences intrinsèques propres à chaque individu mais aussi des contraintes environnementales rencontrées au cours de leur existence. Par conséquent, certaines personnes vieilliront sans présenter de signes de pathologies alors que d'autres seront plus sujettes au déclin pathologique. Il est, par conséquent, possible de distinguer le vieillissement physiologique du

vieillesse pathologique, ce dernier étant caractérisé par le développement de maladies avec le cumul des années de vie.

Population aged 60 years or over by development region, 1950-2050

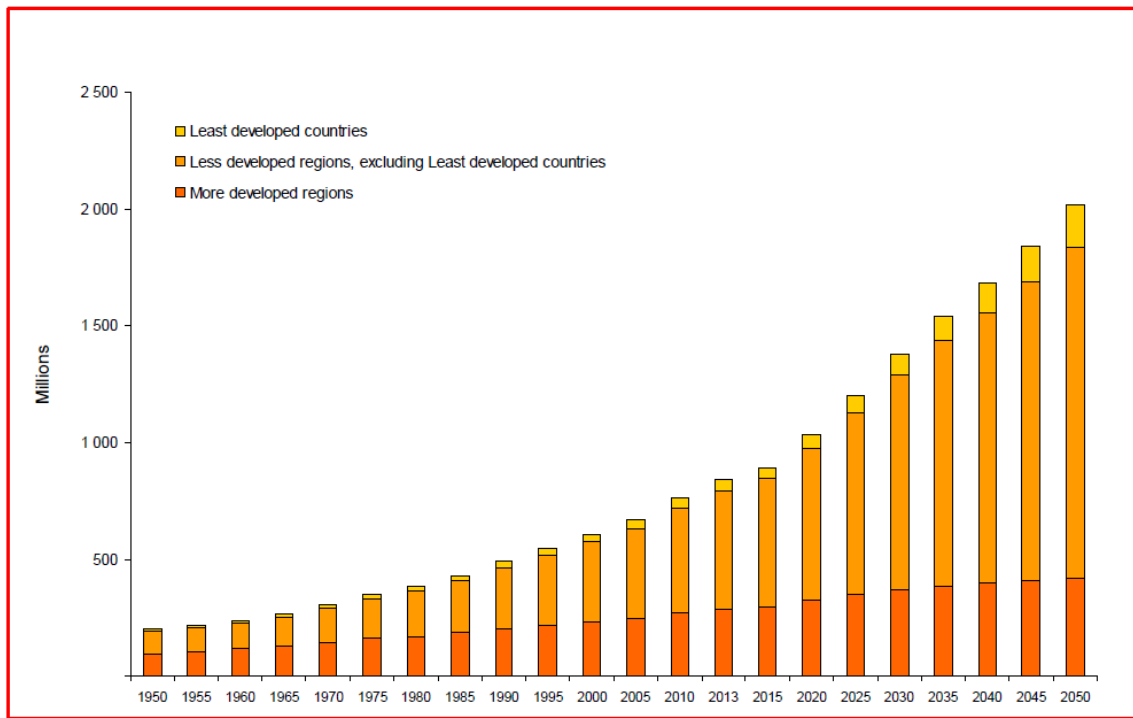


Figure 1. Prédiction de la croissance de la population âgée de plus de 60 ans (d'après UN-DESA world population aging 2013)

2- Les pathologies associées au vieillissement

Même si cette croissance de l'espérance de vie peut être vue comme une évolution positive des conditions de vie et de la médecine, il est toutefois important de considérer et d'anticiper les problématiques qui lui sont associées. L'enjeu est de préserver le bien-être des personnes âgées mais aussi de réduire les coûts de santé publique associés. L'ensemble des processus qui conditionnent le déclin de l'autonomie et des fonctions organiques est aujourd'hui regroupé sous le terme de « fragilité ».

a) La fragilité

Le phénotype de « fragilité » a été caractérisé suite à l'étude de Fried en 2001, qui a démontré que cet état conditionne la résistance des personnes âgées face aux conditions de stress (hospitalisation,

chutes...), mais qui rend également compte de leur prédisposition au développement des pathologies liées à l'âge (Ensrud et al., 2009; Fried et al., 2001). Cette condition se définit par une diminution des réserves homéostatiques de l'organisme et se caractérise par une accumulation d'altérations qui ne constituent pas à elles seules des signes de pathologies. Ces altérations comprennent notamment la diminution de l'activité physique, de la force mais aussi une augmentation de la fatigue. C'est l'accumulation de ces critères de fragilité qui favorise la morbidité par la diminution progressive de l'autonomie, la diminution de la résistance au stress et la survenue d'un vieillissement pathologique (Chen et al., 2014).

Le développement de la fragilité est, par ailleurs, conditionné par un véritable cercle vicieux. En effet, en plus des facteurs génétiques et intrinsèques, les maladies associées au vieillissement peuvent aussi favoriser la survenue de la fragilité (Ahmed et al., 2007). La maîtrise des risques pathologiques associés au vieillissement est donc particulièrement importante dans la lutte contre la fragilité, la mortalité associée et la diminution de la qualité de vie de ces personnes.

b) Le vieillissement pathologique et les pathologies associées

Le vieillissement pathologique se définit par le développement de pathologies en association avec l'avancée dans l'âge. Ce phénomène reste variable d'un individu à l'autre et ce sont des facteurs génétiques, les habitudes de vie et le stress environnemental (cigarettes, alcool, manque d'activités physiques) qui jouent un rôle particulier dans leur développement. Ainsi, avec l'âge, nous observons une augmentation du risque de développer de nombreuses pathologies chroniques (Ferrucci et al., 2008; Niccoli and Partridge, 2012). Parmi elles, nous retiendrons plus particulièrement les cancers, les maladies neurodégénératives, les bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO), la sarcopénie et les maladies cardiovasculaires qui sont les causes majeures de morbidité chez le sujet âgé (**Figure 2**).

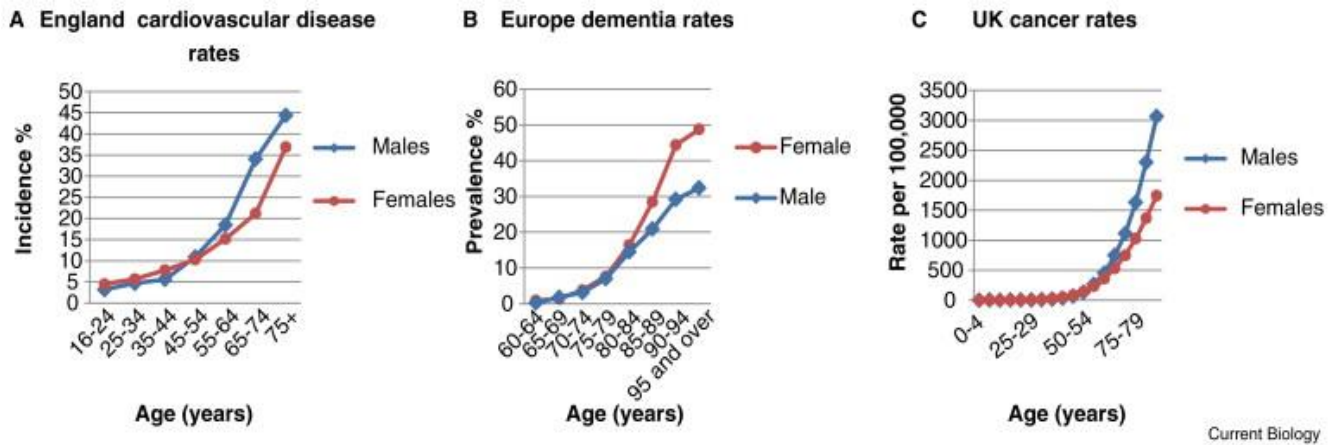


Figure 2. Evolution des pathologies chroniques avec l'âge (d'après Niccoli and Partridge, 2012)

Le risque de développer un cancer augmente avec l'âge (Berger et al., 2006). L'accumulation de comorbidités (diabète, infection, obésité) et l'instabilité génomique sont les causes principales de développement du cancer en association avec le vieillissement (White et al., 2014). En plus d'augmenter la prévalence du cancer, le vieillissement altère également la compliance et la résistance des sujets face aux traitements thérapeutiques classiques (chimiothérapie, irradiation). Ainsi, les personnes âgées sont moins enclines à supporter les traitements anticancéreux standards (Uyar et al., 2005).

Le vieillissement prédispose les sujets au développement de maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et les accidents vasculaires cérébraux (Hung et al., 2010). Concernant la maladie d'Alzheimer, le risque de développer cette pathologie passe de 0.28% chez des individus de 65 à 69 ans à 5.6% chez les sujets âgés de 90 ans et plus (Kukull et al., 2002). Ce sont vraisemblablement des mécanismes cellulaires impliquant une augmentation du stress oxydant et des dysfonctions mitochondriales qui favorisent ces pathologies (Bishop et al., 2010).

Le risque de présenter une bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) augmente avec l'âge (Buist et al., 2007). Cette pathologie, qui se caractérise par une obstruction et une limitation des débits aériens touche entre 20 et 40% des personnes âgées de plus 65 ans (Fragoso, 2016; Gershon et al., 2011). C'est la destruction partielle du parenchyme et les modifications de la matrice extracellulaire pulmonaire en association avec le vieillissement qui peuvent être à l'origine de cette pathologie (Adnot et al., 2015; Huang et al., 2007). La qualité de vie des personnes atteintes de BPCO

reste considérablement réduite puisque cette pathologie altère la condition physique des patients et prédispose à la survenue de la fragilité (Lahousse et al., 2016).

La sarcopénie, qui se caractérise par une diminution de la fonction neuromusculaire et par une altération du tissu squelettique, touche environ 30 % des sujets de plus de 60 ans (Cruz-Jentoft et al., 2014). Cette pathologie tient une place particulière dans le domaine de la gériatrie puisque, de par son action négative sur la mobilité, elle prédispose grandement les personnes atteintes à la fragilité et à la perte d'autonomie (Cruz-Jentoft et al., 2010; Doherty, 2003). Plusieurs mécanismes semblent être impliqués dans son développement comme l'altération mitochondriale, la diminution de l'activité physique et l'augmentation de l'inflammation chronique (Walston, 2012).

Enfin, le vieillissement possède un effet non négligeable sur le cœur et sur le système circulatoire, prédisposant ainsi l'organisme à des pathologies telles que l'hypertension, l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque (IC) (Lakatta and Levy, 2003; Stern et al., 2003). Ces maladies sont regroupées sous le nom de maladies cardiovasculaires (cardiovascular disease, CVD) et elles représentent 40 % des causes de décès chez les personnes âgées de plus de 65 ans (Heidenreich et al., 2011). En plus d'être une cause évidente d'atteinte physiologique, les CVD agissent de façon très néfaste sur la survenue de la fragilité par la diminution de l'activité physique (Uchmanowicz et al., 2017). L'incidence du syndrome de fragilité chez les sujets en IC est de 18 % à 54% suivant les études (Jha et al., 2015). Il apparaît donc particulièrement important de mieux comprendre les mécanismes qui conditionnent la survenue des maladies cardiaques avec l'âge (Sahyoun et al., 2001). Pour cela, une meilleure compréhension des modifications du cœur au cours du vieillissement est donc nécessaire.

3- Le cœur et le vieillissement

Le cœur est un organe particulièrement actif dont la fonction principale est la délivrance du sang et des nutriments à l'ensemble de l'organisme. Durant le vieillissement sa capacité à remplir ses fonctions s'altère, et cet événement coïncide avec la survenue de nombreuses modifications d'ordre structural et fonctionnel de l'organe (Dai et al., 2012; Steenman and Lande, 2017; Stern et al., 2003).

a) Perturbation de la fonction cardiaque avec le vieillissement

Le cœur est un organe fonctionnant comme un système de pompe délivrant le sang à l'ensemble de l'organisme après l'oxygénation de ce dernier par les poumons. Une des caractéristiques les plus fréquentes du cœur âgé est une diminution de l'efficacité de remplissage du ventricule gauche au cours de la diastole ventriculaire avec une fonction d'éjection systolique préservée (Strait and Lakatta, 2012; Upadhyya and Kitzman, 2017). La diastole ventriculaire peut être découpée en deux phases. Un remplissage passif par dilation du ventricule gauche (phase E), suivi d'un remplissage actif par contraction de l'oreillette gauche (phase A). Au cours du vieillissement, le ventricule gauche ne parvient pas à se dilater correctement et cela a pour conséquence une diminution du remplissage passif lors de la phase E. Ainsi, lors de la phase A, l'oreillette gauche, devra fournir un travail supplémentaire afin d'éjecter le sang résiduel non transféré dans le ventricule. La fonction diastolique peut-être évaluée par doppler qui mesure le flux sanguin entre l'oreillette et le ventricule gauche. Par ce biais, il est possible d'évaluer l'amplitude de la phase E et A (onde E et onde A). Avec l'âge, chez l'homme, il est courant de constater une diminution du rapport de l'onde E/A qui signe un défaut de fonction diastolique (Kitzman et al., 1991) (**Figure 3**). Cette caractéristique pathologique est le signe d'une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (ICFEP) dont les aspects physiopathologies seront abordés dans la section **L'insuffisance cardiaque**.

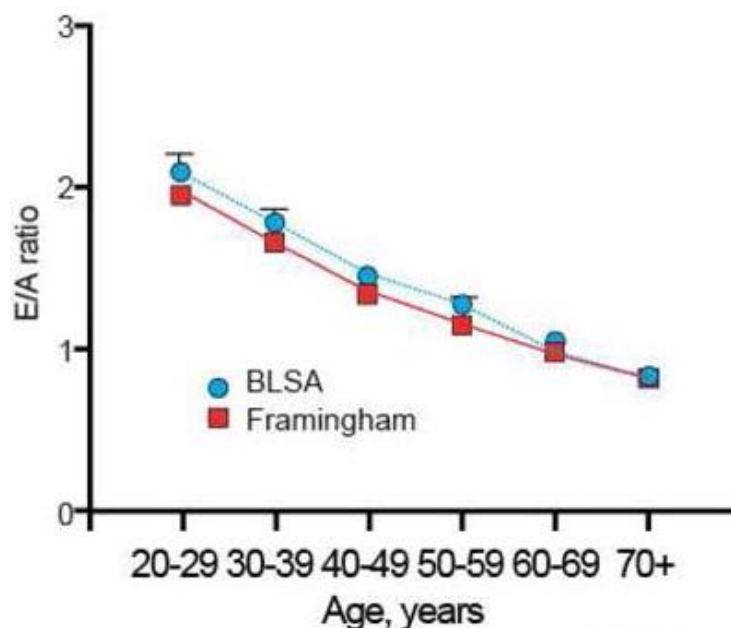


Figure 3. Evolution de l'onde E/A dans la cohorte BLSA et Framingham au cours de l'âge (d'après Strait et Lakata 2012)

b) Altération de la fonction rythmique cardiaque

L'activité électrique du cœur est indispensable au processus de contraction mécanique et séquentiel du cœur. Les cellules pacemakers du nœud sinusal initient la dépolarisation cardiaque et la transmission de ce signal électrique est facilitée et coordonnée spatialement et temporellement grâce un faisceau de cardiomyocytes spécialisés, les cellules cardionectrices (**Figure 4**). Une altération de la propagation du signal de dépolarisation peut être la source d'une dysfonction rythmique favorisant notamment la fibrillation auriculaire (FA).

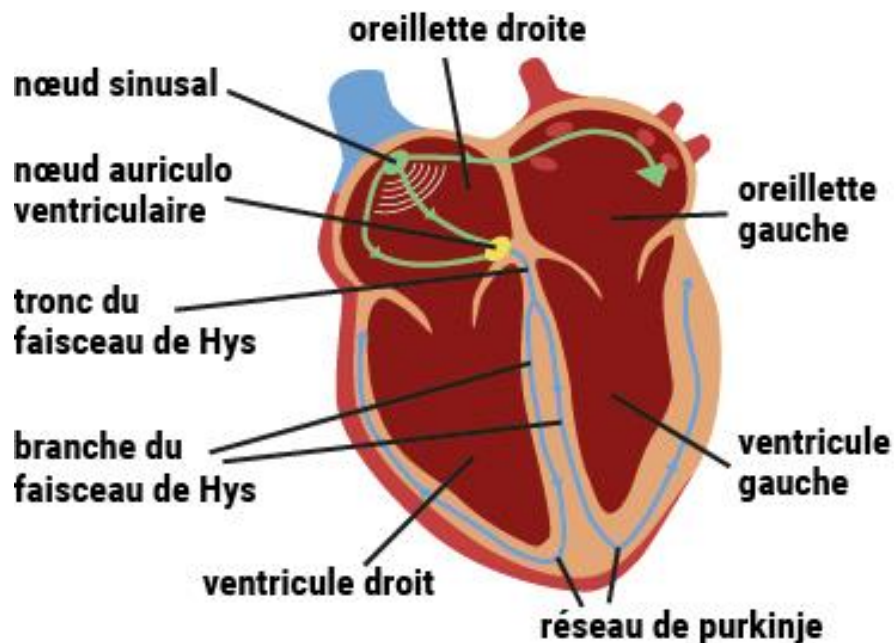


Figure 4 : Le réseau électrique cardiaque simplifié (d'après de la fédération française de cardiologie)

Le pacemaker prend source au niveau du nœud sinusal. Puis, le signal se propage alors rapidement jusqu'à la base des deux oreillettes afin d'induire leur contraction simultanée. Cette première étape permet la vidange auriculaire et le remplissage actif des ventricules. Le signal électrique se regroupe ensuite au niveau du nœud aurico-ventriculaire qui sépare les oreillettes du ventricule. De ce point, l'activité électrique atteindra rapidement la base des ventricules, via le faisceau de Hys et remontera sur leurs bordures respectives par le réseau de Purkinje, afin de permettre la contraction synchronisée et secondaire des deux ventricules.

Le rythme cardiaque au repos diminue drastiquement avec le vieillissement, passant de 80 battements/min à l'âge de 25 ans à 60 battements/min à l'âge de 80 ans (Christou and Seals, 2008). Cette diminution, qui limite la capacité aérobie de l'organisme, s'explique en partie par une

diminution du nombre de cellules pacemaker au sein du nœud sino-atrial et une augmentation de la fibrose et des tissus adipeux auriculaires qui induisent un défaut de conductance du signal électrique (Csepe et al., 2015). Par ailleurs, le cœur âgé est sujet à une désensibilisation de la voie β -adrénergique qui est impliquée dans le maintien et l'adaptation du tonus cardiaque lors de l'exercice (Christou and Seals, 2008) (**voir Hypertrophie des cardiomyocytes**). De façon chronique, une mauvaise maîtrise du signal pacemaker favorise l'apparition de la FA, dont l'incidence est augmentée chez les personnes âgées (Jones, 2006).

c) Fibrose du tissu cardiaque

La matrice extracellulaire est une composante protéique interstitielle qui joue un rôle majeur dans le maintien de la structure du tissu. La fibrose, qui se caractérise par une accumulation excessive de matrice extracellulaire, peut être transitoirement bénéfique dans le cas de la cicatrisation ou pathologique dans le cas d'un dépôt matriciel interstitiel anarchique et abondant au sein d'un tissu. Au sein du tissu cardiaque, la matrice extracellulaire se compose principalement de collagène (type 1 et 3) et de fibres élastiques (Weber, 1989) et des modifications de composition de la matrice extracellulaire peuvent avoir des répercussions majeures sur la capacité contractile cardiaque (Robinson et al., 1988). Les principales cellules qui synthétisent cette matrice sont les fibroblastes. Ces derniers sont largement impliqués dans les mécanismes de réparation tissulaire post-infarctus (Zeisberg and Kalluri, 2010). Toutefois, des études démontrent le rôle néfaste de la fibrose cardiaque. En effet, chez des patients hypertendus avec ICPEP, la fibrose est directement associée à la sévérité de la pathologie (Martos et al., 2007). De plus, le développement d'une fibrose atriale favorise le développement de FA (Ling et al., 2012). Il est retrouvé une augmentation des dépôts de collagène chez les sujets âgés (Gazoti Debessa et al., 2001) et dans des modèles de rongeurs (Eghbali et al., 1989; Lin et al., 2008). Les conséquences liées à la fibrose cardiaque chez le sujet âgé peuvent être multiples. Les dépôts de collagène peuvent interférer avec la conduction du signal de dépolarisation et altérer la force et la synchronisation de la contraction des cardiomyocytes. La fibrose cardiaque peut résulter de l'expression de facteurs pro-fibrosants, tels que le « transforming growth factor β » (TGF β), des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, de l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone et de l'activation du système sympathique adrénergique (Dobaczewski et al., 2011; Lijnen et al., 2000; Rosenkranz, 2004).

4- L'insuffisance cardiaque

Ainsi, avec le vieillissement, il est observé deux modifications fonctionnelles majeures, un défaut de remplissage et une altération du rythme cardiaque. Ces deux atteintes participent au développement de l'ICFEP et de la FA (Steenman and Lande, 2017) (**Figure 5**). Il est intéressant d'observer que ces deux pathologies restent reliées par un dénominateur commun qu'est le vieillissement. Toutefois, entre ces deux pathologies associées à l'âge, l'ICFEP reste plus problématique compte tenu de sa sévérité, de sa prévalence chez le sujet âgé et du manque d'efficacité des thérapies actuellement utilisées.

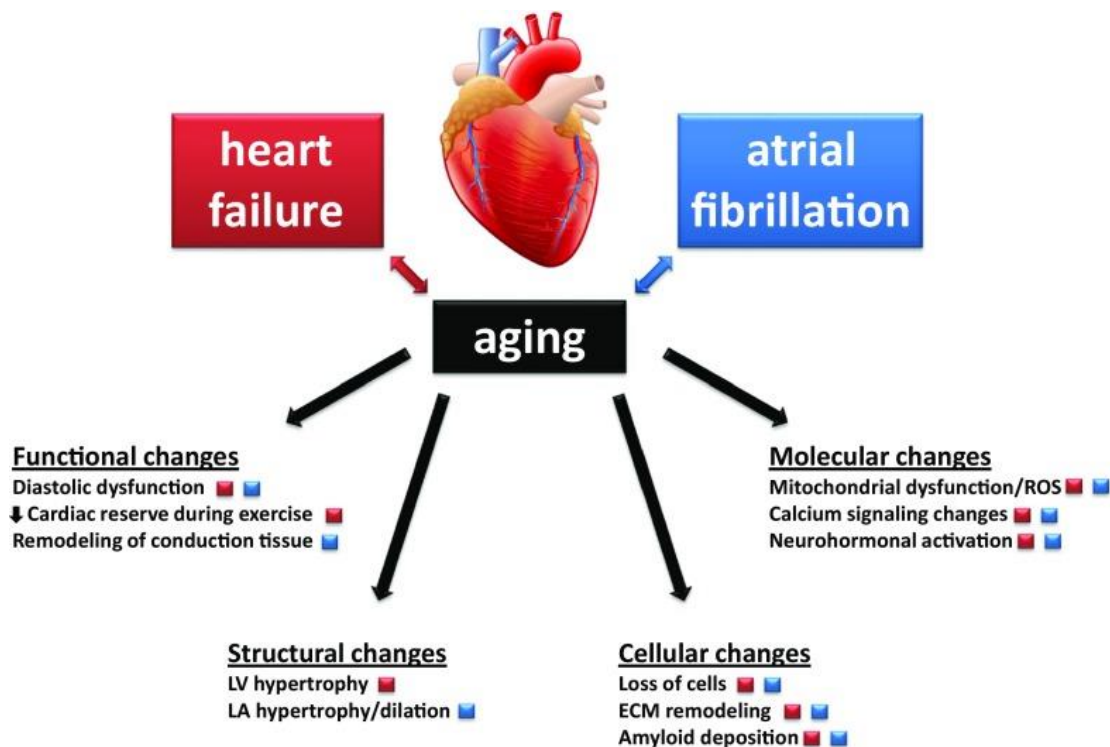


Figure 5. Les pathologies cardiaques associées à l'âge (d'après Steenman and Lande, 2017)

a) Généralités sur l'insuffisance cardiaque

Lorsque le cœur ne peut répondre correctement aux besoins de l'organisme, on parle d'IC. Cette insuffisance correspond à un déséquilibre entre la demande de l'organisme et la capacité de la pompe cardiaque à répondre à cette demande. Plusieurs facteurs sont aujourd'hui décrits comme pouvant favoriser l'insuffisance cardiaque : une diminution de la délivrance en oxygène (hypoxie chronique, athérosclérose, insuffisance coronarienne), une dysfonction métabolique (diabète), une augmentation de la charge de travail (hypertension artérielle), une altération structurale et une

insuffisance dans la production d'énergie (ATP). Il est intéressant de constater que l'ensemble de ces facteurs est notamment associé au phénomène de vieillissement. Il est possible de distinguer deux types d'IC, l'IC à fraction d'éjection altérée (ICFEA) qui se caractérise par une diminution de la fraction d'éjection (FE) du ventricule gauche lors de la phase de systole ($FE < 40\%$) et l'ICFEP qui est définie par une fonction diastolique défaillante associée à une FE conservée ($>50\%$) (Redfield, 2016). Chez le sujet âgé, comme nous avons pu le voir, c'est l'ICFEP qui est la plus souvent diagnostiquée (Lazzarini et al., 2013; Upadhy and Kitzman, 2017). De plus, l'ICFEP présente une gravité supérieure à l'ICFEA puisque le diagnostic est plus difficile (Ponikowski et al., 2016; Špinarová et al., 2017), les comorbidités associées sont plus nombreuses (Mentz et al., 2014) et il n'existe aujourd'hui aucun traitement qui a prouvé son efficacité dans l'augmentation de l'espérance de vie (Redfield, 2016).

b) Les symptômes et la classification

L'IC reste une pathologie initialement silencieuse, puisqu'elle comporte une phase initiale asymptomatique, qui se caractérise par un remodelage positif et une compensation du cœur (phase compensée). Par la suite, lorsque la maladie persiste, évolue et s'aggrave, certains symptômes apparaîtront et seront ressentis de façon variable suivant la sensibilité de chaque individu. Dans un premier temps, l'IC entraîne une dyspnée à l'effort, qui est caractérisée par un essoufflement lors d'activités physiques de faible intensité. Plus tard, et dans des stades plus avancés de la pathologie, cette dernière peut alors évoluer en dyspnée nocturne. En outre, des palpitations et des douleurs thoraciques peuvent aussi être présentes. Enfin, de façon directement dépendante à la diminution du débit cardiaque il peut survenir des signes périphériques tels que l'asthénie, des ralentissements psychomoteurs, des syndromes confusionnels, des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements, des oliguries et des œdèmes périphériques. Malgré une origine différente, les signes fonctionnels qui reflètent l'IC sont identiques dans les deux types d'IC (ICFEA et ICFEP). A ce jour, il existe une classification de l'IC qui permet le suivi des patients. C'est la classification définie par la NYHA (New York Heart association) qui est la plus utilisée (**Figure 6**).

Classification NYHA		
Stade I	• Cardiopathie compensée • Pas de signe clinique d'IC • Signes de cardiopathie décelables à l'examen (souffle, cardiomégalie...) • Effort normal possible • Travail normal possible	Stade asymptomatique
Stade II	• Signes d'IC en cas d'exercice soutenu • Effort mal supporté (essoufflement) • Toux lors d'effort violent	Stades symptomatiques : IC congestive
Stade III	• Signes d'IC en cas d'exercice modéré • Intolérance à l'effort • Toux et essoufflement au moindre effort ou la nuit • Fatigue, dyspnée	
Stade IV	• Signes d'IC au repos • Aucun effort possible • Toux et dyspnée au repos • Signes d'IC globale (ascite grave, œdème pulmonaire marqué) • Pouls faible (bas débit)	

Figure 6 : Classification NYHA, comportant les 4 stades cliniques

c) Les marqueurs biologiques

Au cours de l'IC de nombreux mécanismes inflammatoires, biochimiques et neurohormonaux se mettent en place. Ces processus peuvent alors modifier le profil biologique des cardiomyocytes et des cellules du parenchyme cardiaque, qui secréteront alors des enzymes, des hormones et des marqueurs de stress et de lésion. Le dosage de ces derniers dans le sang ou les urines permet une évaluation de l'état de souffrance des cardiomyocytes et de l'atteinte cardiaque.

Chez l'homme, le BNP qui est un peptide synthétisé par les cardiomyocytes lors d'un stress hémodynamique reste le marqueur le plus souvent dosé. L'augmentation de ce facteur ou de sa forme inactive (NT-proBNP) est un reflet de la sévérité de l'IC et son taux circulant est corrélé au stade clinique selon la classification NYHA. Par ailleurs, la concentration plasmatique de BNP permet un suivi de l'évolution de la pathologie chez le patient (Vuolteenaho et al., 2005). Toutefois, le dosage du BNP n'est pas suffisant pour le diagnostic de l'ICFEP puisque sa sécrétion peut être influencée par la FA, la tachycardie et l'insuffisance rénale (Rogers et al., 2009) et les dernières recommandations en

matière de diagnostic de l'ICFEP ne permettent pas d'exclure la pathologie avec un niveau bas de BNP (Paulus et al., 2007; Ponikowski et al., 2016). Il apparait donc important d'identifier de nouveaux marqueurs biologiques pouvant rendre compte du développement d'une ICFEP. Dans cette optique, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence de nouveaux marqueurs biologiques qui sont associés à la pathologie comme par exemple le GDF15, la Galectine et une protéinase la MMP-2 (Cypen et al., 2017; Savic-Radojevic et al., 2017). Cependant, ces derniers ne signent pas spécifiquement l'ICFEP et peuvent aussi être utilisé pour le diagnostic de l'ICFEA.

d) Les comorbidités et étiologie de l'IC

Les comorbidités associées à l'IC sont nombreuses et en font une maladie complexe à traiter. Chez les personnes hospitalisées, il est possible de dénombrer de deux à six comorbidités et parfois plus de sept chez certains sujets. Les comorbidités les plus fréquemment rencontrées sont l'anémie (Groenveld et al., 2008), l'insuffisance rénale et les BPCO (Hawkins et al., 2009). Il est important de signaler que certaines comorbidités sont aussi confondantes avec des facteurs de risque. Parmi eux, les plus fréquents sont les pathologies coronariennes, l'hypertension (Bhatia et al., 2006), le diabète de type 2 (Kannel et al., 1974) et l'obésité.

e) Traitement de l'insuffisance cardiaque

Le traitement de l'ICFEA reste aujourd'hui efficace et permet d'allonger l'espérance de vie des patients touchés (Reed and Sueta, 2015). A l'opposé, il n'existe à ce à jour aucun traitement permettant d'augmenter l'espérance de vie des patients en ICFEP (Cleland et al., 2006; Edelmann et al., 2013; Massie et al., 2008). Le traitement des comorbidités associées à l'ICFEP reste tout de même prescrit afin de limiter la détérioration de la qualité de vie des patients. Ainsi, le traitement de l'ICFEP est choisi en fonction des comorbidités et des symptômes qui lui sont associés.

Lorsqu'une atteinte pulmonaire (œdème) est diagnostiquée il est utilisé des diurétiques mais les dérivés nitrés restent les plus efficaces (Cotter et al., 1998). Ce traitement permet de réduire la pression artérielle notamment au niveau pulmonaire afin d'éviter un aggravement de l'œdème et le risque d'intubation et ventilation. Dans le cas d'une rétention hydrosodée ce sont seulement les

diurétiques qui sont efficaces. Il est cependant important de suivre la fonction rénale qui risque de s'altérer d'autant plus avec le traitement. Enfin, dans le cas particulier d'un diagnostic de l'ICFEP seulement associé à une dyspnée à l'effort, il n'existe aucun traitement suffisant pour augmenter l'espérance de vie. Plusieurs études cliniques internationales et menées en double aveugle se sont intéressées à tester les molécules suivantes : inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II, bêtabloquants, antagonistes des récepteurs AT1 et AT2 à l'angiotensine II et antagonistes des récepteurs de l'aldostérone. Aucune de ces dernières n'a permis de montrer un effet bénéfique sur la survie des patients en ICFEP avec dyspnée à l'effort.

Les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'ICFEP et de l'ICFEA sont totalement différents. Cette différence explique notamment les résultats décevants concernant l'utilisation des classes de médicaments préconisés pour le traitement de l'ICFEA dans le contexte de l'ICFEP. Il reste donc extrêmement important de mieux comprendre les processus impliqués dans l'ICFEP et notamment ceux associés au vieillissement afin d'identifier de nouvelles voies thérapeutiques.

5- Conclusion

Nous avons pu voir que le vieillissement prédispose à de nombreuses pathologies, dont les pathologies cardiaques. Le cœur âgé possède un phénotype particulier caractérisé notamment au niveau fonctionnel par une dysfonction cardiaque diastolique du ventricule gauche. Le cœur âgé est ainsi largement prédisposé à développer une ICFEP pour laquelle il n'existe actuellement aucun traitement. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes initiateurs reste une approche indispensable à la découverte de nouveaux traitements préventifs et thérapeutiques. Dans cette optique il est nécessaire d'étudier les modifications au niveau cellulaire qui peuvent rendre compte des altérations fonctionnelles. De très récentes études démontrent l'implication d'un processus particulier appelé « sénescence cellulaire » dans le développement de pathologie en association avec le vieillissement (Baker et al., 2016; He and Sharpless, 2017). Ainsi il est possible de formuler l'hypothèse selon laquelle la survenue de pathologies cardiaques avec le vieillissement est liée à l'accumulation de cellules sénescents.

II- La sénescence cellulaire

Décrite pour la 1^{ère} fois en 1961 par Hayflick et son collaborateur Moorhead, la sénescence cellulaire est aujourd'hui un domaine de recherche en constante évolution (Hayflick and Moorhead, 1961). En effet, la définition initiale de la sénescence, alors caractérisée comme un simple arrêt de division cellulaire, se retrouve aujourd'hui enrichie et complexifiée. Ainsi, de nombreuses autres caractéristiques sont à ce jour utilisées pour identifier et comprendre la biologie des cellules sénescents. La sénescence cellulaire est un processus positif lors du développement ou de la cicatrisation, mais de très récentes études suggèrent aussi son rôle délétère dans la survenue de pathologies avec l'âge (He and Sharpless, 2017). En dépit de nombreuses avancées scientifiques dans ce domaine, plusieurs aspects restent encore mal décrits. Les mécanismes inducteurs sont, en effet, nombreux et variables d'un tissu à l'autre et les marqueurs de sénescences utilisés ne sont pas spécifiques du processus de sénescence. L'étude des mécanismes inducteurs et l'identification de nouveaux marqueurs représentent donc un réel enjeu dans la lutte contre les pathologies liées à l'âge.

1- Découverte du concept de sénescence cellulaire par Hayflick et Moorhead

Le concept de sénescence a été initialement décrit et défini en 1961 par Hayflick et Moorhead. Ces derniers ont observé un arrêt du cycle cellulaire sur diverses lignées fibroblastiques en culture après un nombre défini de divisions cellulaires (environ 50) (Hayflick and Moorhead, 1961). Cet arrêt du cycle cellulaire est à distinguer de l'état de quiescence par sa stabilité et sa non-réversion en présence de facteurs de croissance (Terzi et al., 2016). C'est à partir de cette observation qu'a émergé le concept de sénescence répllicative, qui se définit alors comme un arrêt stable de la division cellulaire (Hayflick, 1965; Hayflick and Moorhead, 1961). Le nombre maximal de divisions cellulaires précédant l'entrée en sénescence est appelé la limite de Hayflick. Par la suite, de nombreuses études ont démontré que la sénescence répllicative ne se limitait pas aux fibroblastes, mais que ce processus était commun à de nombreux autres types cellulaires en culture et dans l'organisme (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Childs et al., 2015).

2- Caractéristiques générales de la sénescence

Bien que la définition initiale de la sénescence par Hayflick se limitait à un arrêt stable de la prolifération, des études plus récentes ont permis de mettre en évidence d'autres caractéristiques communes aux cellules sénescentes (He and Sharpless, 2017). Parmi elles, on retiendra plus particulièrement, l'hypertrophie cellulaire, la résistance à l'apoptose, l'acquisition d'un phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP), la présence de macromolécules oxydées, la dysfonction d'organites intracellulaires (lysosomes, mitochondries) et des modifications nucléaires (**Figure 7**). L'ensemble de ces caractéristiques permet par ailleurs de mettre au point des marqueurs d'identification, dont certains se révèlent être critiquables.

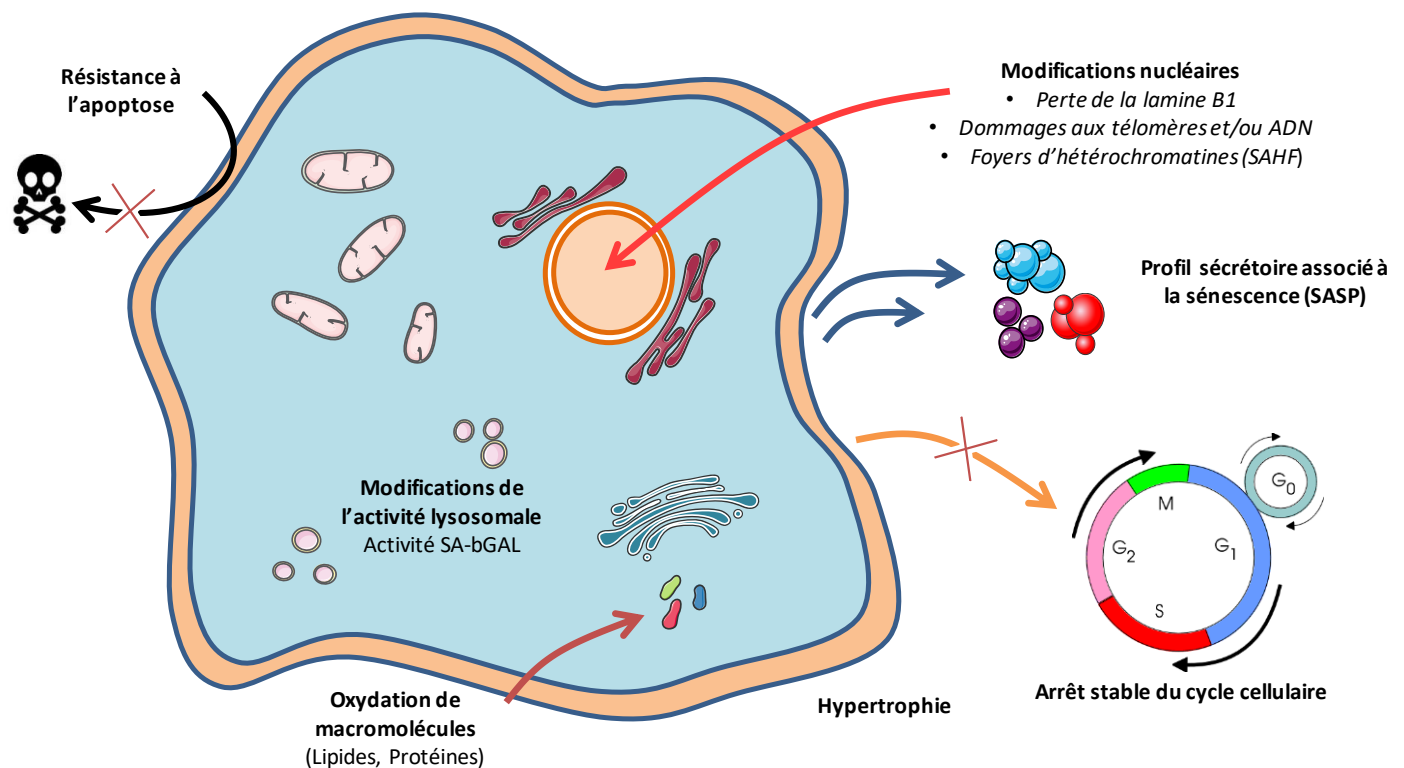


Figure 7. Les caractéristiques de la cellule sénescence (Image créée à partir de la banque d'images MedicalArt®)

a) *L'arrêt du cycle cellulaire*

La caractéristique majeure de la cellule sénescence est son incapacité à progresser dans le cycle cellulaire. Plusieurs études démontrent un arrêt stable de la cellule en phase G₁ (Di Leonardo et al.,

1994). Mais la cellule peut aussi être arrêtée en phase G2/M et il semblerait que ce soit l'origine du signal inducteur qui oriente la phase d'arrêt du cycle cellulaire (Herbig et al., 2004; Wada et al., 2004). Cette caractéristique majeure des cellules sénescentes a permis d'établir des marqueurs qui lui sont associés.

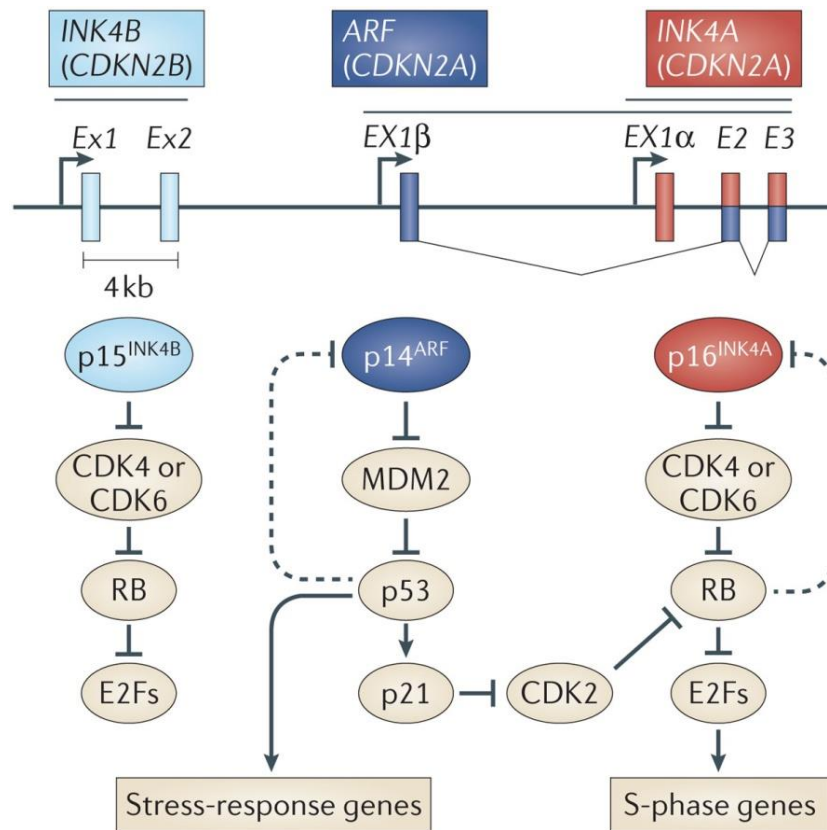
a.1) Activation de la voie p53/p21^{CIP1}

L'arrêt du cycle cellulaire des cellules sénescentes est en grande partie géré par la voie p53/p21^{CIP1}. En effet, le suppresseur de tumeur p53 (Levine, 1997) peut réguler la transcription de gènes impliqués dans le blocage de la division cellulaire, c'est le cas notamment du gène Cdkn1a qui code pour la protéine p21^{CIP1} (Deng et al., 1995). La protéine p21^{CIP1} est un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines (CDKi) de la famille des CIP/KIP (p21^{CIP1}, p27^{KIP1} et p57^{KIP2}) (Sherr and Roberts, 1995) conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (**Figure 9**). Cette protéine possède la capacité d'inhiber les kinases dépendantes des cyclines (CDK) CDK4/CDK6 et CDK2 qui sont impliquées dans la progression du cycle cellulaire par l'inhibition de la protéine du rétinoblastome (pRB) (Cerqueira et al., 2014). Cette dernière est essentielle au contrôle du cycle cellulaire puisqu'elle est un répresseur fort de l'expression de E2F, un facteur de transcription impliqué dans la synthèse de l'ADN et la progression dans le cycle cellulaire, par passage de la phase G1 à la phase S (Müller et al., 2001). Les CDK4/CDK6 et CDK2 peuvent phosphoryler pRB et ainsi lever l'inhibition transcriptionnelle de E2F. L'inhibition des CDK4/CDK6 et CDK2 via l'activation de p21^{CIP1} favorisera donc un état faiblement phosphorylé de pRB et l'arrêt du cycle cellulaire. La mesure de l'activation de cette voie cellulaire constitue une signature de la sénescence. Toutefois, cette caractéristique n'est que faiblement spécifique puisque l'activation de l'axe p53/p21^{CIP1} est un mécanisme commun à l'activation des mécanismes de l'apoptose (Amaral et al., 2010).

a.2) Expression des gènes de la famille INK4a

L'arrêt du cycle cellulaire, lors de la sénescence, peut aussi être la conséquence de l'activation de voies cellulaires indépendantes de p53/p21^{CIP1} comme l'expression des CDKi de la famille des INK4 (INhibitor of CDK4) (Jacobs and de Lange, 2004). Cette famille de CDKi comprend quatre membres p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} et p19^{INK4d} pouvant également jouer un rôle inducteur de la sénescence

cellulaire. Ces gènes codent pour des protéines inhibitrices des CDK4/CDK6 favorisant également un arrêt du cycle cellulaire par hypophosphorylation de Rb (Roussel, 1999) (**Figure 8, Figure 9**). Il est important de noter que ces 4 gènes sont présents sur le même locus INK4-Arf et que leur expression varie en fonction du type cellulaire et du signal inducteur (Kim and Sharpless, 2006). Par ailleurs, ce locus comprend aussi une portion codante pour le gène p19^{Arf} qui permet l'activation de p53 via son rôle inhibiteur de MDM2, un répresseur de p53 (**voir La mécanistique de la DDR**).



Nature Reviews | **Cancer**

Figure 8 : Expression et cibles des gènes du locus INK4-Arf (d'après Sharpless and Sherr, 2015)

Au cours du vieillissement, chez la souris, l'expression des gènes p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} et p19^{INK4d} est augmentée au sein de nombreux tissus (Krishnamurthy et al., 2004). Ainsi, l'expression des gènes associés au locus INK4 est très souvent utilisée comme signature de sénescence. Cependant, il est important de noter que parmi les gènes de la famille des INK4, p16^{INK4a} reste le plus étudié. En effet, l'expression des gènes p15^{INK4b}, p18^{INK4c} et p19^{INK4d} associée à la sénescence semble être plus variable d'un tissu à l'autre comparativement à p16^{INK4a} dont la surexpression est retrouvée dans de nombreux organes. Afin de suivre la dynamique d'expression de p16^{INK4a} dans l'organisme, des systèmes de gènes-rapporteurs ont été développés. Pour cela, une cassette luciférase ou gène

rapporteur est inséré en aval du promoteur p16^{INK4a}. Il a ainsi pu être démontré une accumulation des cellules p16^{INK4a} positives lors du vieillissement de l'organisme mais aussi une augmentation d'expression transitoire à proximité des zones de cicatrisation (Baker et al., 2011; Burd et al., 2013; Demaria et al., 2014; Jun and Lau, 2010; Yamakoshi et al., 2009). Cependant, l'utilisation du marqueur p16^{INK4a} reste critiquable dans le but d'identifier la sénescence. En effet, des études ont démontré que, dans certains cas de sénescence induite *in vitro*, l'expression de p16^{INK4a} n'est pas toujours retrouvée. En effet, dans une lignée de cellule embryonnaires pulmonaires (LF1) sénescents il est possible de retrouver des cellules exprimant p21^{CIP1} mais pas p16^{INK4a} et inversement (Herbig et al., 2004). De façon encore plus paradoxale, l'expression de p16^{INK4a} est parfois détectée dans certaines cellules cancéreuses à haut pouvoir prolifératif (Shapiro et al., 1995; Witkiewicz et al., 2011), avec par exemple, la forte expression de p16^{INK4a} dans certaines formes de cancers de la tête et du cou (Mendenhall and Logan, 2009).

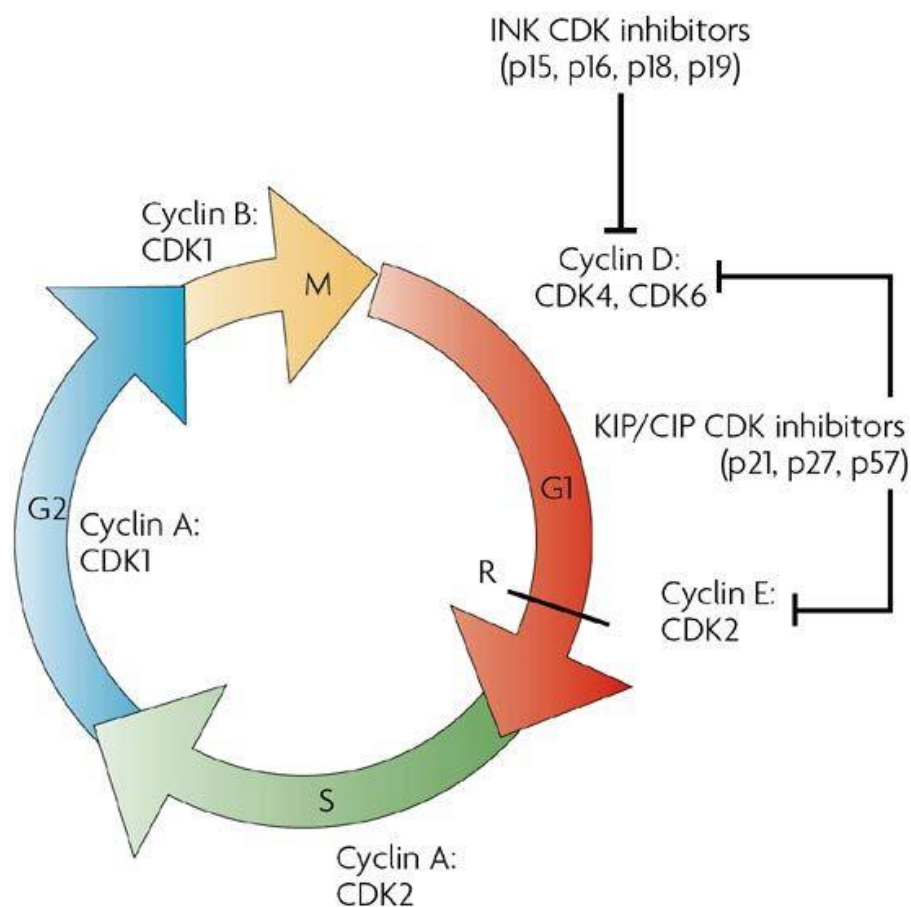


Figure 9 : Rôle des inhibiteurs du cycle cellulaire CIP/KIP et INK (d'après Dehay and Kennedy, 2007)

b) Modifications nucléaires

b.1) Perte de la lamine

Les lames de type A (subdivisé en lamin A ou C) ou de type B (B1 ou B2) sont des protéines tapissant la face interne de la membrane nucléaire qui sont impliquées dans le maintien de la taille et de la forme des noyaux (Dechat et al., 2008). Il apparaît aujourd'hui évident que les variations d'expressions (épissage alternatif, répression) des lames sont associées au phénotype de sénescence. En effet, des mutations du gène LMNA codant les lames A/C conduit à un épissage alternatif générant une perte partielle de sa maturation post-traductionnelle ayant pour conséquence un défaut d'adressage aux noyaux. Cette altération est inductrice de la progéria, une pathologie caractérisée par un vieillissement accéléré (Navarro, 2006). Des fibroblastes de patients souffrant de progéria (mutation LaminA/C) atteignent plus rapidement un état de sénescence que des cellules saines (Benson et al., 2010). De plus, dans de nombreuses modèles, *in vitro* et *in vivo*, dont la sénescence a été induite, il est possible de retrouver une diminution d'expression de la lamine B1 (Freund et al., 2012). D'un point de vue fonctionnel, il semblerait que la lamine B1 soit capable de modifier l'organisation de la chromatine et l'expression de gènes de sénescence (arrêt du cycle cellulaire, sécrétion) (Shah et al., 2013). Toutefois, dans certains modèles de sénescence induite *in vitro*, une augmentation paradoxale de la lamine B1 est observée remettant alors en question cette caractéristique comme marqueur de sénescence (Barascu et al., 2012). Récemment, il a été montré que la dégradation de la lamine B1 dans un modèle de SIPS (stress oxydant) *in vitro* provoquerait la formation de fragments de chromatine cytosoliques qui activent le système de détection de l'ADN cytosolique, cGAS-STING, responsable de l'induction de la réponse interféron de type I et de l'acquisition d'un profil sécrétoire associé à la sénescence (SASP) (Glück et al., 2017).

b.2) Erosion télomérique

A l'extrémité de chaque chromosome se trouve une portion d'ADN non-codante appelée télomère qui est à distinguer de l'ADN génomique. Les télomères sont composés de séquences d'ADN répétées [5'-TTAGGG-3'] (Blackburn, 1991) et permettent de prévenir le raccourcissement de l'ADN génomique après chaque division. Ce mécanisme de protection est indispensable puisque lors de la division cellulaire, l'ADN polymérase n'est pas en mesure de répliquer l'intégralité de l'extrémité de

la séquence d'ADN qui va donc perdre, après chaque cycle, une partie de sa structure. La présence de télomères non codants à l'extrémité de chaque chromosome permet par conséquent de protéger la partie codante d'une érosion génomique pouvant être la source de mutation génomique. La télomérase, est la seule enzyme capable d'ajouter les séquences répétées de nucléotides [TTAGGG] composant le télomère. Elle est constituée d'une sous-unité protéique ou TERT (Telomerase reverse transcriptase) et d'une sous-unité ARN matriciel ou TERC (Telomerase RNA component). Cependant, dans les cellules somatiques la télomérase est absente ou alors très faiblement exprimée. Ainsi, avec chaque cycle de division, la taille des télomères diminue progressivement ce qui aboutit à une diminution notable de la taille des télomères dans les cellules sénescences (Fagagna et al., 2003; Harley, 1991). La diminution de la longueur des télomères est donc une caractéristique qui est classiquement utilisée comme marqueur de sénescence (Bernadotte et al., 2016). Cependant, il existe de nombreux cas de sénescence non associés au raccourcissement des télomères dans les contextes de sénescence induite par le stress ou au sein des cellules non-réplicatives notamment (Vitorelli and Passos, 2017) (**voir 4-4-La sénescence induite par le stress**).

b.3) Foyers d'hétérochromatine et distension des satellites

Les foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF) sont aussi classiquement utilisés comme marqueur de sénescence (Aird and Zhang, 2013). Cette structure apparaît sous forme d'agglomérats d'ADN denses et lumineux après marquage au DAPI. Ces derniers sont présents dans de nombreuses cellules sénescences dont l'ADN est endommagé et ne sont pas retrouvés dans les cellules quiescentes (Narita et al., 2003). Les SAHF sont notamment impliqués dans la séquestration de gènes du cycle cellulaire comme E2F pouvant alors altérer son expression (Narita et al., 2003). De plus, il a été démontré que dans des fibroblastes de souris et humains, l'ADN s'effiloche au niveau du centromère, cette spécificité est appelée SADS (senescent-associated distension satellite) et constitue un marqueur de sénescence. Il est par ailleurs intéressant d'observer la présence de SADS au sein de cellules fibroblastiques de patient atteints de progéria (Swanson et al., 2013). Toutefois, des études démontrent que l'acquisition de ce marqueur est variable selon le type cellulaire et le signal inducteur de sénescence utilisé (Kosar et al., 2011).

c) Phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP)

Avec le vieillissement, le profil de sécrétion cellulaire des cellules sénescence se retrouve modifié, on parle alors de *senescence associated secretory phenotype* (SASP).

c.1) Définition du SASP

Depuis les années 90, plusieurs travaux ont mis évidence une modification du sécrétome avec la sénescence (Shelton et al., 1999), mais ce sont les travaux de Coppé en 2008 qui ont permis d'identifier le plus large éventail des protéines secrétées par les cellules sénescence via l'utilisation d'approches protéomiques sur des fibroblastes et des cellules endothéliales (Coppé et al., 2008). Une revue globale, faisant état des différentes protéines du SASP, a été publiée en 2010 par Coppé et Campisi (Coppé et al., 2010). Ainsi, même si les modifications de sécrétion associées au SASP sont nombreuses, il est possible de distinguer deux grands groupes de protéines : les facteurs qui ont un rôle paracrine sur les cellules environnantes et les facteurs qui ont une action sur le remodelage de la matrice extracellulaire. Par la suite Kuilman et Peeper, ont dressé une liste plus étoffée des protéines associées à la sénescence alors regroupées sous le terme le Senescence-messaging-secretome (SMS). Le SASP est aujourd'hui considéré comme un phénomène délétère au cours du vieillissement, puisqu'il est associé à la perte d'homéostasie des tissus âgés bien qu'il soit initialement impliqué dans la clairance des cellules sénescence (Chien et al., 2011; Kuilman and Peeper, 2009; Xue et al., 2007). En effet, le SASP favorise la tumorigenèse, la fibrose (Coppé et al., 2008) et la sénescence des cellules voisines (Nelson et al., 2012). Aujourd'hui, il apparaît difficile de faire un bilan non exhaustif des protéines associées au SASP mais il est toutefois possible, en conciliant les travaux de Coppé et Kuilman, de faire la liste des protéines les plus souvent surexprimées et secrétées dans un contexte de sénescence (**Tableau 1**).

Famille de protéines	Nom de la protéine	Rôles
Cytokines	IL 1 (IL 1 α et IL 1 β)	Inflammation
	IL-6	
Chimiokines	IL-8	Recrutement des cellules immunitaires
	CCL	
Facteurs de croissances	TGF β 2/GDF	Activation des SMAD/Différenciation cellulaire
	IGFBP3	Blocage de la voie IGF1
	IGFBP5	
	IGFBP7	
Protéases	MMP-3	Dégradation de la matrice extracellulaire
	MMP-10	
	MMP-10	
Inhibiteurs du plasminogène	PAI	Pro-fibrotique

Tableau 1. Bilan des principales protéines du SASP (adapté d'après Kuilman and Peeper, 2009 et Coppé et al., 2010)

c.2) Cytokines et chimiokines

L'interleukine-6 (IL-6) reste la cytokine la plus souvent retrouvée associée au SASP (Coppé et al., 2010). Cette dernière est largement impliquée dans la sécrétion de protéines de la phase aiguë de l'inflammation (Gabay and Kushner, 1999). Elle est surexprimée dans de nombreux types cellulaires sénescents tels que les mélanocytes, les monocytes, les fibroblastes et les cellules épithéliales. Cette dernière est très finement régulée par les voies de dommages à l'ADN (voir **Activation de la voie de dommage à l'ADN**) (Rodier et al., 2009). Par ailleurs, les cytokines de la famille de l'interleukine-1 (IL-1) sont elles aussi exprimées lors de la sénescence et joueraient un rôle important dans la promotion de sénescence paracrine, et en particulier l'IL-1 α via son rôle dans l'activation de la voie NF- κ B (**voir régulation du SASP**) (Laberge et al., 2015; Mantovani et al., 2001). De plus, de nombreuses chimiokines, nécessaires au recrutement des cellules immunitaires, sont aussi retrouvées sécrétées avec l'acquisition du SASP. Parmi elles, on retiendra plus particulièrement l'interleukine-8 (IL-8) et la famille des CCL (MCP-2, -3, et -1) qui jouent un rôle dans le recrutement des cellules myéloïdes (monocytes, neutrophiles) (Bode-Böger et al., 2005; Sarkar et al., 2004). Cet ensemble de sécrétion permet principalement la clairance des cellules sénescents par recrutement des cellules du système immunitaire inné (Xue et al., 2007).

c.3) Insulin growth factor binding protein (IGFBp)

Les cellules sénescents expriment fortement les protéines de la famille des IGF-binding proteins (IGFBPs). Ces dernières, peuvent séquestrer IGF1 et limiter son interaction avec son récepteur

spécifique (IGF1R) et donc altérer sa signalisation. Les fibroblastes sénescents présentent une augmentation de la production d'IGFBP3 (Goldstein et al., 1991) et pour les cellules endothéliales humaines (HUVEC) sénescents, une augmentation d'IGFBP3 et d'IGFBP5 a été observée (Kim et al., 2007a). Ces facteurs ont comme effet d'activer des processus de sénescence. En effet, l'utilisation de protéines recombinantes IGFBP3/5 sur les cellules HUVEC est suffisante pour réduire la prolifération cellulaire et provoquer la sénescence par activation de la voie p53 (Kim et al., 2007a, 2007b). Cette étude suggère que le SASP peut, en plus de moduler la réponse immunitaire, favoriser l'induction de la sénescence par effet autocrine et paracrine sur les cellules voisines.

c.4) Transforming growth factor (TGF β)

Associé au SASP il est possible de retrouver la surexpression de facteurs de croissance tels que ceux impliqués dans l'activation de la voie du TGF β (transforming growth factor β). La voie du TGF β est activée après fixation du ligand sur le récepteur TGF β r. Le TGF β r est composé de deux chaînes pouvant former des homodimères ou hétérodimères (TGFBRI, TGFBRII) afin de transduire le signal. Plusieurs ligands sont capables de se fixer sur le TGF β r, parmi eux, les TGF β mais aussi les GDF (growth and differentiation factor) qui sont les plus souvent associées à la sénescence. Dans sa forme canonique, l'activation de la voie TGF β permet le recrutement des protéines SMAD2 et SMAD3 qui sont activées par phosphorylation puis transportées au noyau via SMAD4 afin d'activer la transcription des gènes cibles (Kubiczkova et al., 2012) (**Figure 10**).

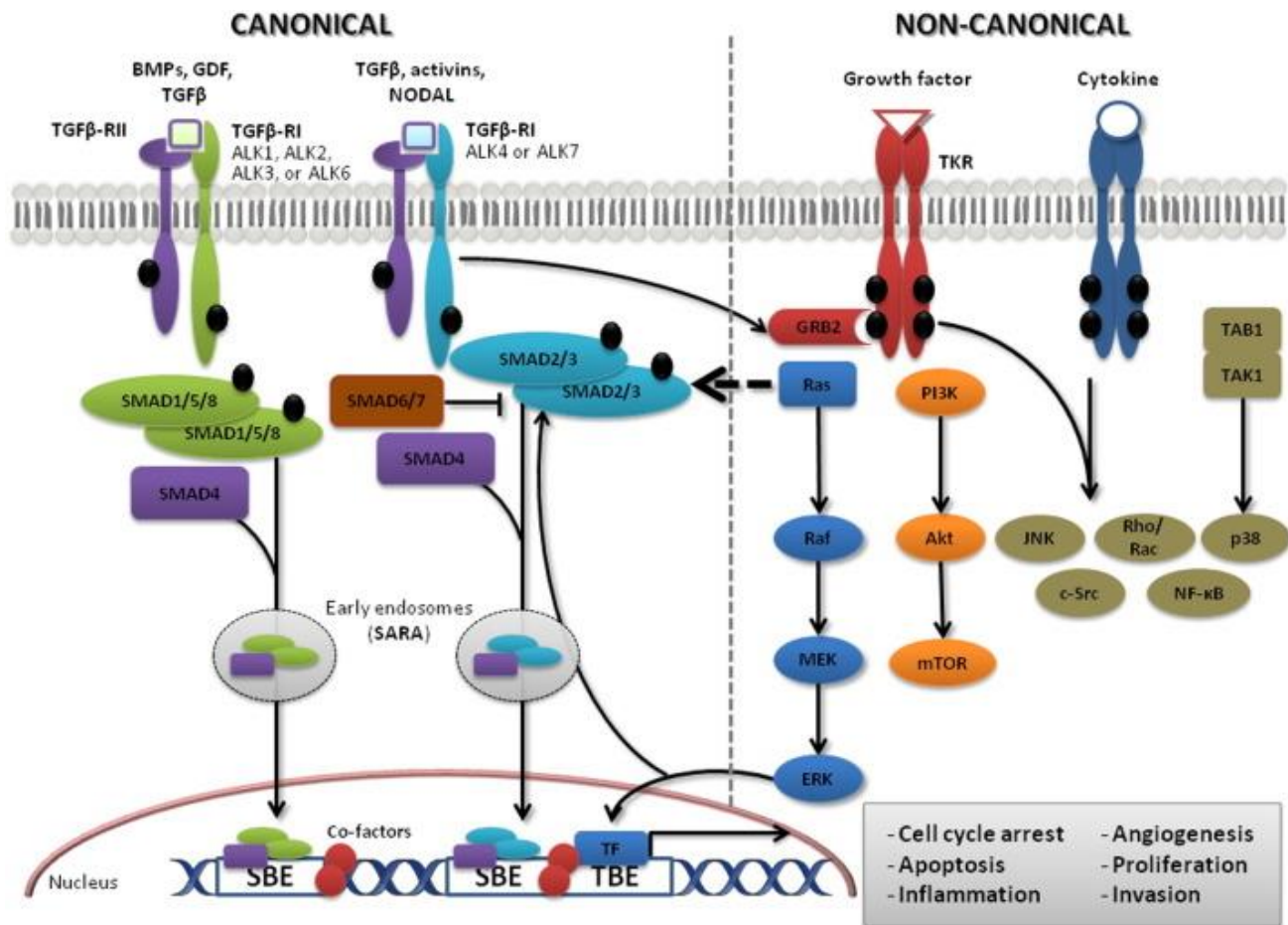


Figure 10. Voie du TGFβ (d'après Neuzillet et al 2015)

c.4.1) Rôle du TGFβ

Le TGFβ peut jouer un rôle autocrine et paracrine puisqu'il peut être sécrété par les cellules sénescents et favoriser l'entrée en sénescence des cellules voisines (Acosta et al., 2013). En effet, l'activation de la voie canonique par traitement avec du TGFβ recombinant sur des keratinocytes permet l'expression du gène p15^{INK4b} (du locus Ink4) via l'activation du facteur de transcription SP-1 (Feng et al., 2000) mais également augmente l'expression de p21^{CIP1} dans des cellules pulmonaires traitées (Reynisdóttir et al., 1995). La voie canonique du TGFβ peut donc favoriser l'arrêt de la prolifération et la sénescence des cellules cibles (Neuzillet et al., 2015). En outre, le TGFβ joue un autre rôle négatif puisqu'il peut favoriser la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes générateurs de fibrose interstitielle et délétère. La voie non canonique reste aussi intéressante puisqu'elle permet l'activation de la voie mTOR et p38-MAPK qui sont décrites comme impliquées dans les processus de sénescence (Xu et al., 2013).

c.4.2) Rôle du GDF

Par ailleurs, un ligand des récepteurs TGF β r, le GDF15 a aussi été décrit comme un activateur de sénescence. En effet, la surexpression de Gdf15 dans cellules endothéliales humaines induit la sénescence par surexpression de la voie p16^{INK4a} et p38-MAPK mais aussi la production de ROS (Park et al., 2016a). Le rôle des GDF reste cependant controversé, puisque d'autres travaux démontrent le rôle positif du GDF11 dans la protection des altérations de l'organisme avec l'âge. Dans le cœur, l'étude de Loffredo et al. en 2013 met en évidence une diminution des niveaux de GDF11 avec le vieillissement. Les auteurs démontrent le rôle de GDF11 dans la protection du vieillissement cardiaque (réversion l'hypertrophie de cardiomyocytes, diminution de l'expression de l'ANP et du BNP) via des expériences de parabiose (Loffredo et al., 2013). Toutefois, ces travaux ont été remis en question par une étude démontrant l'inefficacité des injections de GDF11 dans la protection du vieillissement cardiaque (Smith et al., 2015). Dans le cœur, la littérature semble donc être contradictoire. Toutefois, la récente étude de Schafer suggère un défaut majeur dans l'étude de Loffredo concernant la quantification du GDF11, en effet, il peut être confondu avec la myostatin dont les séquences ne diffèrent que de 11 acides-aminés. Dans cette étude, les auteurs démontrent, par ailleurs que les taux de GDF11 ne sont pas modifiés avec le vieillissement mais qu'ils peuvent rendre compte de la susceptibilité à la fragilité et aux CVD (Schafer et al., 2016a). Dans un autre contexte, au niveau pulmonaire, le GDF11 permet notamment de prévenir l'apparition de la sénescence induite par la fumée de cigarette sur des fibroblastes pulmonaires. Les niveaux de GDF11 plasmatiques sont inversement proportionnels à la sévérité des pathologies pulmonaires obstructives (Onodera et al., 2017). Toutefois, dans cette étude, la critique concernant la confusion possible entre la détection du GDF11 et de la myostatin doit être gardée à l'esprit.

c.5) Métalloprotéinases

Le SASP se caractérise classiquement par la sécrétion de protéines pouvant jouer sur l'environnement cellulaire. Ces protéases extracellulaires, ont pour rôle principal de dégrader la matrice extra cellulaire afin de favoriser la migration cellulaire mais aussi de libérer des facteurs de croissance matriciels et de limiter la fibrose. Parmi ces protéases, les « matrix métalloprotéinases » (MMP) sont le plus fréquemment associées au SASP. Dans des modèles de fibroblastes sénescents on retrouve principalement l'expression de MMP-3 et MMP-10 ainsi que MMP-1 (Parrinello et al., 2005; Zeng and

Millis, 1996) qui sont capables de dégrader les fibres de collagène, la fibronectine, la laminine, les protéoglycans et l'élastine. La sécrétion de MMP peut être perçue comme un événement délétère puisqu'elle favorise la tumorigenèse et l'attraction des cellules cancéreuses via la libération de facteurs mitogènes par dégradation de la matrice extra cellulaire (Liu and Hornsby, 2007). Par ailleurs, ces facteurs ont aussi un rôle positif lors des processus de cicatrisation tissulaire via leur action sur la migration cellulaire (Gill and Parks, 2008).

c.6) Inhibiteurs du plasminogène

Le « *plasminogen activator inhibitor* » (PAI) autrement appelé serpin est impliqué dans l'inhibition des tPA/uPA (tissu specific/urokinase Plasminogen activator). Ces enzymes jouent un rôle anti-fibrotique par la conversion du plasminogène en plasmine. Le PAI est très souvent associé à la fibrose pulmonaire et est très fréquemment exprimé par les cellules sénescents, leur conférant alors un phénotype pro-fibrotique (Elzi et al., 2012). Par ailleurs, de récentes études suggèrent aussi son rôle dans le maintien du phénotype sénescents. En effet, l'inhibition de ce dernier par du TM5441 protège les cardiomyocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes de la sénescence induite par traitement chimique et par répliquions successives (Ghosh et al., 2016).

c.7) Mécanismes d'induction du SASP

La voie de signalisation « nuclear factor- κ B » (NF- κ B) prend aujourd'hui une place centrale dans les mécanismes inducteurs du SASP (Salminen et al., 2012). Cette voie cellulaire peut être activée par le système immunitaire (signaux IL et TNF- α) mais aussi par le stress oxydant et les agents génotoxiques. Cette voie de signalisation permet la libération des facteurs de transcription κ B intracellulaire (RelA et p50) de leur complexe inhibiteur I κ B afin qu'ils puissent transloquer au noyau (Lawrence, 2009). Les premiers travaux de Chien et al, démontrent en 2011 l'importance de la voie NF- κ B dans l'acquisition d'un SASP via une approche shRNA sur des cellules pulmonaires humaines (IMR-90) dont la sénescence est induite *in vitro*. En effet, l'inhibition de la voie NF- κ B, réduit l'expression de gènes classiques du SASP comme IL-6, IL-8 et CXCL1. Cette étude démontre aussi l'importance de la coopération entre p53 et NF- κ B dans l'acquisition du phénotype sénescents dans ce type cellulaire particulier puisque l'inhibition de la voie NF- κ B ne suffit pas à protéger de la

sénescence dans les cellules IMR-90. Toutefois, il reste très intéressant de remarquer que cette coopération semble être cellule-spécifique dans la mesure où l'inactivation de NF- κ B seule est suffisante pour empêcher la sénescence dans un modèle de fibroblastes Bj (Chien et al., 2011). Ceci mettant alors encore en évidence la variabilité du profil de sénescence en fonction du type cellulaire. Enfin, des études plus récentes ont affiné cette observation en démontrant l'implication du facteur de transcription GATA4 (Kang et al., 2015) et de la voie mTOR (Laberge et al., 2015) en amont de l'activation de NF- κ B.

c.2) Variabilité du SASP

En dépit d'une certaine homologie de SASP dans de nombreux contextes de sénescences, le SASP ne peut être résumé à une liste de protéines transposables de façon universelle à tous les types de cellules sénescents. En effet, l'expression du SASP est variable d'une cellule à l'autre, et il est possible de considérer qu'il existe autant de SASP différents que de cellules dans l'organisme (Jurk et al., 2012; Torella et al., 2004). Par ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence que le SASP diffère en fonction des mécanismes inducteurs de la sénescence (Park et al., 2009; Wiley et al., 2016) et de façon très intéressante, il a été démontré que la surexpression de p16^{INK4a} au sein de fibroblastes humains conduit à l'acquisition d'un phénotype de sénescence sans présence de SASP (Coppé et al., 2011). Par conséquent, il semble plus approprié de parler de SASP comme d'une modification globale du profil sécrétoire de la cellule pouvant avoir une incidence sur l'environnement de la cellule sénescence. Cette modification peut apparaître sous forme variée au sein des cellules sénescents et inclue généralement des cytokines, des facteurs de croissances et des protéases.

d) Hypertrophie cellulaire

Il est très souvent observé une augmentation de la taille cellulaire associée à l'entrée en sénescence. Cette observation remonte aux travaux de Hayflick qui avait fait état d'une augmentation de la taille des cellules sénescents (Hayflick and Moorhead, 1961). Alors que le phénomène d'hypertrophie (ou l'augmentation de la taille) est observé dans de nombreux types cellulaires sénescents, très peu d'études se sont intéressées à caractériser les mécanismes associés. C'est en 2008 que les études menées conjointement par Damidenko et Blagosklonny ont permis de mieux comprendre les acteurs

moléculaires qui englobent l'hypertrophie cellulaire associée à la sénescence (Demidenko and Blagosklonny, 2008). Il est tout d'abord intéressant d'observer que l'hypertrophie cellulaire est un mécanisme spécifique de la sénescence puisqu'il n'est pas retrouvé lorsque la cellule est en arrêt du cycle cellulaire par quiescence. De plus, l'activation de la voie mTOR (target of rapamycin) et la phosphorylation de son substrat la S6K est un mécanisme essentiel à l'hypertrophie. La voie mTOR, est une voie de signalisation impliquée dans les mécanismes de croissance cellulaire. En effet, elle permet d'augmenter la synthèse protéique et d'activer des régulateurs de la croissance cellulaire impliqués dans le réarrangement du cytosquelette et dans l'expansion cytoplasmique. Ainsi, il a été décrit que l'inhibition de la voie mTOR avec la rapamycin permettait de reverser partiellement mais significativement la survenue de l'hypertrophie. Il est d'ailleurs important de noter que les facteurs de croissance présents dans le milieu de culture sont indispensables à l'activation de la voie mTOR. Ce phénomène d'hypertrophie observé au sein des cellules sénescents semble donc être hautement associé à l'activation de la voie mTOR. Ainsi, même si l'hypertrophie des cellules sénescents n'est que faiblement étudiée, elle n'en reste pas moins un critère important associé aux cellules sénescents. Cependant, cette particularité n'est que faiblement étudiée et l'hypertrophie reste un critère souvent négligé dans les études portant sur la sénescence. De plus, certains organes ne possèdent pas ou peu de capacité d'hypertrophie et s'orientent plus vers l'hyperplasie (Goss, 1966) et certaines cellules peuvent s'hypertrophier en dehors d'un contexte de sénescence comme les adipocytes lors du stockage des triglycérides (Rutkowski et al., 2015).

e) Altération du lysosome

Le lysosome est une organelle spécialisée dans le catabolisme cellulaire. Il peut en effet dégrader de nombreux composés cellulaires (intracellulaire, membranaires, organelles) et permet donc l'élimination des déchets cellulaires. Les modifications lysosomales retrouvées dans les cellules sénescents a permis la mise au point de marqueurs qui sont classiquement utilisés pour leur détection.

e.1) La SA- β Gal

Le lysosome contient un ensemble d'enzymes qui sont impliquées dans la dégradation des déchets cellulaires. Parmi ces enzymes lysosomales se trouve la β -Galactosidase qui fonctionne à pH 4.5 dans

les cellules saines. Il a été démontré que cette dernière fonctionne à un pH suboptimal de 6 dans les cellules sénescents (Dimri et al., 1995). Cette caractéristique est appelée la « senescence associated β -Galactosidase » (Sa β -Gal) et semble être directement dépendante d'une augmentation de la masse lysosomale (Kurz et al., 2000) associée à une augmentation de la quantité d'enzyme présente dans les cellules (Lee et al., 2006a). La quantification de l'activité SA- β GAL est un des premiers marqueurs de sénescence à avoir été développé (Dimri et al., 1995), cependant, la non-spécificité de ce marqueur reste aujourd'hui avérée. L'auteur de la publication initiale a lui-même observé que ce marqueur n'était pas retrouvé dans tous les types cellulaires sénescents, le qualifiant ainsi de "non universel". Il a aussi été démontré que le maintien d'un état de quiescence cellulaire sur le long terme favorise l'expression de la SA- β gal dans des cellules non sénescents (Cristofalo, 2005) et que ce marqueur n'est pas indispensable à l'acquisition du phénotype de sénescence (Lee et al., 2006a).

e.2) L'accumulation de lipofuscine

La lipofuscine est un agrégat non dégradable retrouvé au sein des lysosomes. Il est constitué de lipides oxydés liés à divers protéines et métaux. Cet agrégat est normalement éliminé par le biais de l'autophagie. Plusieurs études ont démontré une accumulation de lipofuscine avec l'âge lors de la sénescence, et plus spécialement au sein des tissus post-mitotiques (cerveau, cœur et muscle squelettique) (Terman and Brunk, 2004). La visualisation des agrégats de lipofuscine reste une technique difficile puisque cela requiert un marquage au Sudan Black dans des conditions bien particulières pour un résultat peu sensible et peu convainquant (Georgakopoulou et al., 2012). Toutefois, et très récemment, Evangelou et al. en 2017 a mis au point un nouveau composé (GL13) qui est un analogue du Sudan Black associé à la biotine pour améliorer la sensibilité. L'utilisation de ce réactif a été validé dans différents types cellulaires sénescents *in vitro* et *in vivo* (Evangelou et al., 2017).

f) Résistance à l'apoptose

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire suivi de la dégradation et de l'élimination de la cellule concernée (Ellis et al., 1991). Ce mécanisme est reconnu comme antitumoral puisqu'il permet de limiter la propagation des cellules dont l'ADN est endommagé (Green and Evan, 2002). Les cellules

sénescentes privilégient des voies de survie et sont résistantes à l'apoptose. Ainsi, plusieurs études, utilisant des types cellulaires et des stimuli apoptotiques différents, ont démontré que les cellules sénescentes acquièrent une résistance à l'apoptose. Les travaux précurseurs de Wang en 1995 ont permis de mettre en évidence l'acquisition d'une résistance à l'apoptose induite par privation sérique au sein d'une lignée de fibroblastes (Wang, 1995). Il est aujourd'hui décrit que c'est la voie p53/p21^{CIP1} qui joue un rôle prépondérant dans le choix entre survie/apoptose par la cellule. En effet, l'apoptose est un mécanisme dépendant de l'activation des gènes codants pour des protéines pro- (BAX, PUMA, NOXA) et anti-apoptotique (Bcl-2) qui peuvent être directement régulées par p53 (Chipuk et al., 2004; Rochette and Brash, 2008; Villunger et al., 2003). Par ailleurs, p53 régule aussi p21^{CIP1} qui est quant à lui impliqué dans la survie cellulaire (Gartel and Tyner, 2002). Il semblerait que ce soit la capacité de stabilisation de p53 (Seluanov et al., 2001) et les modifications post-traductionnelles (phosphorylation/acétylation) de p53, variables en fonction du signal inducteur de sénescence, qui orientent le schéma de régulation de p53 en faveur d'un profil apoptotique (BAX,PUMA,NOXA) ou de survie (p21^{CIP1}) (Childs et al., 2014; Fielder et al., 2017; Knights et al., 2006). Enfin, la localisation cellulaire de p53 participe aussi à la résistance à l'apoptose. En effet, récemment une étude a démontré l'importance de la séquestration au niveau nucléaire de la protéine p53 via son association avec FOXO4 dans les mécanismes de résistance à l'apoptose (Baar et al., 2017). Il reste cependant important de remarquer que la sensibilité des cellules sénescentes aux stimuli apoptotiques est variable d'une cellule à l'autre (Hampel et al., 2004). Enfin, cette capacité de résistance à l'apoptose est d'ailleurs le talon d'Achille des cellules sénescentes, puisque de très récents travaux visant à mettre au point des processus d'élimination spécifique de ces cellules utilisent cette caractéristique (Zhu et al., 2015). Ces études ont permis de mettre au point des composés « senolytiques » dont le mode d'action sera abordé dans la section **5.c) Vers l'émergence de nouvelles thérapies.**

g) Oxydation de macromolécules cellulaires

Une augmentation du stress oxydant global de la cellule sénescente conduit à l'oxydation de certaines macromolécules comme les protéines, les lipides et l'ADN (**voir c.2) Le stress oxydant**).

Il est fréquent d'observer une accumulation des protéines oxydées au sein des cellules sénescentes (Nowotny et al., 2014; Nyström, 2005). Cette accumulation de protéines oxydées est une

caractéristique observable dans de nombreux types cellulaires et qui est associée au développement de pathologies chroniques liées au vieillissement (maladies neurodégénératives, diabète, cancer) (Baraibar et al., 2012). L'oxydation altère la fonction des protéines ciblées et de récentes études démontrent que ce mécanisme est spécifique de certaines protéines lors de la sénescence. L'ensemble des protéines préférentiellement oxydées lors de la sénescence compose l'« Oxi-protéome » (Baraibar and Friguet, 2013; Baraibar et al., 2016). Ce dernier comporte des protéines impliquées dans la fonction métabolique, l'arrangement du cytosquelette, la balance oxydative et la régulation de voies de signalisations associées à la sénescence (Tgf β , Nf- κ B, p38-MAPK) (Le Boulch et al., 2017). D'un point de vue mécanistique, lors du vieillissement, c'est à la fois l'augmentation des mécanismes oxydants et la dérégulation du système d'élimination des protéines endommagées, le protéasome, qui participent à cette accumulation de protéines carbonylées (Chondrogianni et al., 2003).

Dans diverses cellules sénescents, il est possible d'observer une accumulation de 4-hydroxynonanal (4-HNE) qui est issu de la peroxydation des lipides et qui peut donc être utilisé comme marqueur de sénescence (Nelson et al., 2012; Wu et al., 2014).

Au niveau de l'ADN, il est observé une augmentation de l'oxydation de la Guanine (8-oxo-2-deoxyguanosine, 8-oxo-dG) qui constitue alors une signature de sénescence dans de nombreux organes (cerveau, cœur, muscle squelettique, foie) chez le rat (Hamilton et al., 2001) et dans le cerveau de patients âgés de plus de 70 ans (Mecocci et al., 1993). Il reste intéressant d'observer que ce marqueur ne semble pas approprié pour l'ensemble des organes puisque il s'accumule d'avantage dans les organes post-mitotiques comme le cœur et le cerveau tandis qu'il n'augmente pas, ou très peu, dans la rate, les poumons et les reins de rat âgés (Hirano et al., 1996).

3- Les limites des marqueurs d'identification actuels et l'émergence de nouveaux outils

Les caractéristiques que nous venons de décrire ont permis de mettre en évidence plusieurs marqueurs qui sont aujourd'hui classiquement et couramment utilisés dans l'identification des cellules sénescents. Toutefois, aucun d'entre eux n'est totalement spécifique de la sénescence. Par

ailleurs, il est important de garder à l'esprit qu'un marqueur est associé à une fonction cellulaire, et de ce fait, la découverte de nouveaux marqueurs permettra de mieux comprendre la biologie complexe de la cellule sénescence.

a) Les limites des marqueurs actuels

Comme nous venons de l'aborder, la plupart des marqueurs actuels manquent de spécificité. En effet, certains sont aussi communs à d'autres mécanismes, comme la quiescence (Saβ-Gal) ou l'apoptose (p53/p21^{CIP1}) et il convient par conséquent de les utiliser en association. De plus, la signature de sénescence moléculaire est variable d'une cellule à l'autre (SASP, p16^{INK4a} parfois absent), rendant ainsi difficile l'établissement d'un consensus de marqueurs de sénescence universel. Ainsi, dans une volonté d'identifier la sénescence spécifique d'un tissu, les marqueurs actuels s'avèrent inefficaces (Bernardes de Jesus and Blasco, 2012). Par ailleurs, les outils actuellement disponibles ne sont pas nombreux et manquent parfois de sensibilité et de spécificité (lipofuscine) et Sharpless et Sherr en 2015, ont dressé la liste des faiblesses de chacun des marqueurs, révélant ainsi de grandes lacunes inhérentes à leur utilisation (Sharpless and Sherr, 2015). Un tableau bilan des marqueurs actuels et de leur limite est présenté ci-dessous (**Tableau 2**). Il existe donc à ce jour un réel enjeu dans la validation d'outils d'identification fiables des cellules sénescences et dans la caractérisation d'une signature spécifique de sénescence à l'échelle cellulaire.

Caractéristique cellulaire	Marqueurs	Limites
Arrêt du cycle cellulaire	p53	Voie commune à l'apoptose
	p21	
	INK4	Exprimé par certaines cellules cancéreuses et pas systématiquement associé à la sénescence
Modification nucléaires	Erosion des télomères	Non retrouvé dans les cellules post-mitotiques et dans le cadre de la sénescence induite par le stress (SIPS)
	SAHF	Variable et dispensable à l'acquisition du phénotype sénescence
	Repression de la laminB1	Surexprimée dans certains contextes de sénescence induite in vitro
Activité lysosomale	SA-βGal	Retrouvé lors de la quiescence
	Accumulation de lipofuscine	Protocole difficile et peu sensible
Morphologie	Hypertrophie	Peu étudié et processus non spécifique du processus de sénescence
Profil sécrétoire	SASP	Très variable suivant le type cellulaire et le mécanisme inducteur

Tableau 2. Limite des marqueurs de sénescence actuels (inspiré de Bernardes de Jesus and Blasco, 2012; Sharpless and Sherr, 2015)

b) Vers l'utilisation de nouveaux outils d'identification spécifiques

Actuellement, il n'existe aucun consensus quant au nombre de caractéristiques que les cellules doivent acquérir pour être considérées comme sénescence et il semble admis d'utiliser une association de plusieurs marqueurs (Lawless et al., 2010; Sharpless and Sherr, 2015). Même si cette approche combinée est louable puisqu'elle permet de s'affranchir des lacunes inhérentes à chacun des marqueurs en termes de spécificité, elle rend les méthodes d'analyses imprécises et hétérogènes d'une étude à l'autre. Avec l'évolution des techniques de séquençage à haut-débit, l'objectif d'étudier la sénescence à l'échelle d'un type cellulaire unique afin de constituer une carte d'identité de sénescence propre à chaque cellule semble réalisable. Par ce biais, il serait alors possible d'identifier des marqueurs plus précis et plus fiables, et qui, en association avec les critères de

sénescences actuels, permettrait une meilleure compréhension de la biologie de la sénescence. Dans cette problématique, Altubiti en 2014, a utilisé une approche protéomique sur une lignée de cellules cancéreuses de la vessie sénescents par activation de p16^{INK4a} et p21^{CIP1} (Althubiti et al., 2014) afin d'identifier plusieurs marqueurs de surface spécifiques de ces cellules sénescents. Cette étude permet l'identification de six protéines membranaires spécifiquement surexprimées lors de l'acquisition du phénotype sénescents (DEP1, NTAL, EBP50, STX4, VAMP3 et ARM CX3). Ces marqueurs ont ensuite été validés comme marqueurs pronostics de la sévérité du cancer du sein et comme parfaitement utilisables dans l'identification des cellules sénescents. Encore plus récemment Nagano et al, a publié dans la revue Nature une étude comparative entre le génome de cellules dont la sénescence et l'apoptose est induite par un traitement de différentes concentrations en agents génotoxiques (etoposide). Cette étude révèle l'expression exclusive, au sein des cellules sénescents, de nouveaux gènes (PVRL4, PRODH, LY6D, DAO, EPN3, and GPR172B) qui sont dépendants de p53. Ces derniers ont, par ailleurs, été validés dans différents types cellulaires et dans un modèle de sénescence répliquative (Nagano et al., 2016). Le rôle de ces nouvelles cibles dans la biologie des cellules sénescents reste encore à déterminer mais ces études présentent le mérite de redynamiser l'approche consensuelle d'identification de la sénescence avec une approche à plus large spectre et sans-à-priori.

III-Mécanismes inducteurs de la sénescence

En parallèle de la caractérisation des cellules sénescents, il est également important de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'induction des voies de sénescence. Les grandes caractéristiques de la sénescence ont permis de mettre en évidence les nombreux processus capables d'induire un phénotype sénescents cellulaire.

1- Activation de la voie de dommage à l'ADN

L'arrêt du cycle cellulaire par l'expression des CDKi dans les cellules sénescents est un mécanisme largement associé à l'activation de la voie de dommage à l'ADN. Cette dernière permet la coordination entre le processus d'arrêt du cycle cellulaire et le recrutement de la machinerie de réparation de l'ADN. Cette voie est fréquemment activée, de façon persistante, au sein des cellules sénescents (Wang et al., 2009).

a) La mécanistique de la DDR

L'ADN cellulaire se compose d'une structure nucléotidique fragile et sensible aux stress environnementaux (Jackson and Bartek, 2009) et dont l'intégrité doit être maintenue afin d'éviter la survenue de mutations ou de délétions. Les dommages à l'ADN sont des phénomènes fréquents et les données obtenues dans des fibroblastes humains et murins démontrent qu'il apparait environ 100 dommages simples brins (SSB) et 10 cassures doubles brins (DSB) par jour et par cellule (Lieber, 2010). Ainsi, les cellules disposent d'un système d'alerte et de réparation de l'ADN qui est activé lorsque celui-ci est endommagé. Ce système appelé "DNA Damage response" (DDR) permet également de limiter la propagation des cellules dont l'intégrité génomique est compromise en induisant l'arrêt du cycle cellulaire. D'un point de vue mécanistique, la DDR permet le recrutement des acteurs moléculaires impliqués dans la réparation et l'arrêt du cycle cellulaire. Dans un premier temps, ce sont les protéines ataxia-telangiectasia (ATR) ou ataxia-telangiectasia mutated (ATM) qui sont recrutées sur le site du dommage (Bakkenist and Kastan, 2003; Falck et al., 2005). Dans le cas d'un SSB c'est ATR qui est activé alors que ATM est associé à un DSB (Falck et al., 2005). Les protéines

ATM/ATR phosphorylent ensuite l'histone H2AX (γ H2AX), afin de décompacter la chromatine ce qui permettra d'accroître le recrutement de ATM/ATR (via l'activation de MDC1) (Stucki et al., 2005). Cette boucle de signalisation se propage alors sur plusieurs centaines de kilobases voisines du dommage (Iacovoni et al., 2010) via l'implication d'effecteurs tels que « p53-binding protein 1 » (53BP1) et « mediator of DNA damage checkpoint » (MDC1) qui facilitent l'interaction entre ATM/ATR et γ H2AX (Bekker-Jensen et al., 2005; Lou et al., 2006). Dans un second temps, l'accumulation de ATM/ATR jusqu'à un seuil suffisant conduit à l'activation de leurs cibles moléculaires. Parmi elles, le facteur de transcription et répresseur de tumeur p53 (Turenne et al., 2001) et « cell division cycle 25 » (CDC25) (Mailand et al., 2000) (**Figure 11**). En parallèle, la phosphorylation de la protéine checkpoint2 (CHK2) par ATM/ATR est elle aussi impliquée dans l'activation de p53 (Hirao et al., 2000). L'activité et la présence de p53 dans la cellule sont principalement régulées par la protéine MDM2 qui favorise sa dégradation par transport au protéasome. Ce sont les modifications post-traductionnelles par phosphorylation (par ATM/CHK2) qui conduiront à la perte d'interaction avec MDM2 et l'accumulation de p53 dans la cellule (Moll and Petrenko, 2003). Il est aussi reporté le rôle de l'acétylation de p53 dans son activation (Reed and Quelle, 2014). Avec le vieillissement, une activation persistante de la DDR est fréquemment observée dans différents types cellulaires (Chen et al., 2007) avec notamment une augmentation des foyers γ H2AX dans le cerveau, le foie, les reins, les poumons et les testicules de souris âgées (Sedelnikova et al., 2004). Par ailleurs, des études *in vitro* sur des modèles de cellules sénescents mettent aussi en évidence l'activation persistante de la DDR et de la voie p53/p21^{CIP1} (Atadja et al., 1995; Di Leonardo et al., 1994; Fagagna et al., 2003; Fumagalli et al., 2014; Herbig et al., 2004). Ainsi l'activation de la DDR permettra l'activation de la voie p53/p21^{CIP1} qui est responsable de l'entrée en sénescence.

En parallèle, la DDR, qui active l'arrêt le cycle des cellules dont l'ADN est endommagé, permet aussi l'activation de la machinerie de réparation. Ce processus est dépendant du recrutement de ATM/ATR et de la phosphorylation du H2AX qui permet de décompacter la chromatine en la rendant ainsi plus accessible à la machinerie de réparation (van Attikum and Gasser, 2009).

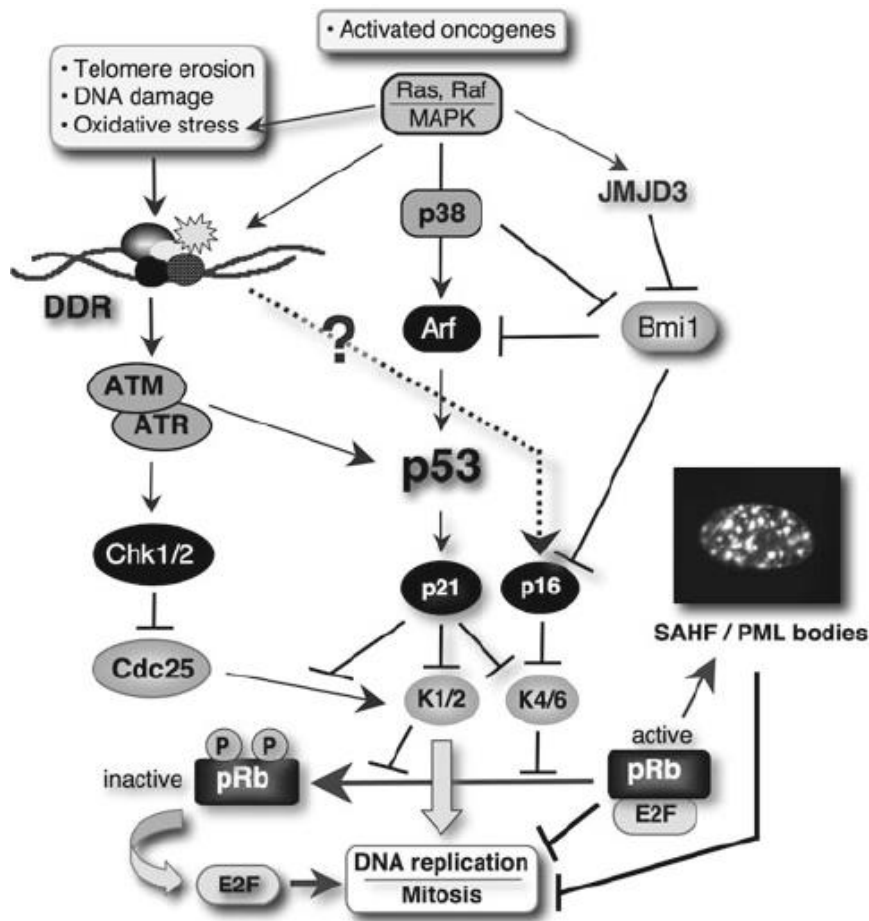


Figure 11. Les mécanismes de la DDR (d'après Dulic, 2013)

b) Les mécanismes initiateurs de la DDR

Comme nous venons de le voir, la DDR est un processus largement impliqué dans l'induction de la sénescence par activation de p53/p21^{CIP1} et la compréhension des mécanismes inducteurs de la DDR reste indispensable à la caractérisation du phénotype sénescence.

c.1) Raccourcissement des télomères

Après de nombreuses divisions cellulaires, la longueur des télomères diminue jusqu'à atteindre un seuil critique qui sera alors reconnu comme un dommage à l'ADN activateur de DDR. Une altération de l'expression de la télomérase au sein des cellules germinales et des cellules souches est retrouvée en association avec des pathologies de vieillissement accéléré comme la dyskératose congénitale

(Mitchell et al., 1999). Dans des situations d'atteintes tissulaires après exposition chronique à des signaux de stress, il est possible de retrouver une sénescence répllicative par érosion des télomères (Adnot et al., 2015; Koliada et al., 2015). Il a par ailleurs été démontré qu'une surexpression de la télomérase au sein des cellules somatiques chez la souris conduit à une augmentation de leur espérance de vie (Bodnar et al., 1998). De plus, au sein des cellules cancéreuses, la réexpression de la télomérase agit comme un proto-oncogène et leur permet ainsi d'acquérir un fort pouvoir prolifératif (Greider, 1998). Aujourd'hui, cependant, on ne sait pas quel est le seuil critique de raccourcissement télomérique à atteindre pour engager la DDR et la sénescence.

c.2) Le stress oxydant

Il y 60 ans, Dehnam Harman avait proposé une théorie du vieillissement basée sur l'implication des radicaux libre et du stress oxydant (Harman, 1956). Depuis, cette théorie est au cœur des principaux mécanismes initiateurs de la sénescence en dehors de l'attrition télomérique. En effet, de nombreuses études ont démontré qu'un traitement sub-léthal inducteur de stress oxydant pouvait induire un phénotype comportant de nombreuses similitudes avec la sénescence. Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) et les capacités anti-oxydantes de la cellule. Les EROs sont capables de se fixer sur les constituants cellulaires comme l'ADN, les protéines et les lipides et de les endommager (Avery, 2011). Ainsi, une surproduction d'EROs cellulaires et/ou l'inactivation des mécanismes antioxydants peuvent contribuer à la formation des dommages à l'ADN, à l'activation de la DDR et, à terme, la sénescence. Avec le vieillissement, il est possible d'observer une dérégulation des systèmes antioxydants contribuant à l'accumulation des EROs (Davalli et al., 2016).

c.2.1) Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les EROs sont définies comme des entités chimiquement réactives classifiées en deux catégories : les radicaux libres, possédant un électron non apparié sur leur couche externe, et les dérivés non radicalaires. Elles sont hautement diffusibles et peuvent très aisément se fixer sur l'ADN et y induire des lésions. Les principaux radicaux libres sont l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($^{\cdot}OH$) et le monoxyde d'azote (NO). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), quant à lui, n'est pas une espèce

radicalaire mais il peut former, via la réaction de Fenton, un radical hydroxyle ($^{\circ}\text{OH}$). Il est important de noter que ces derniers possèdent des caractéristiques propres en termes de diffusion, réactivité et demi-vie (Migdal and Serres, 2011).

c.2.2) Source d'ERO mitochondriales via la chaîne respiratoire

La mitochondrie est aujourd'hui reconnue comme le siège majoritaire de la formation des EROs (Correia-Melo and Passos, 2015; Ziegler et al., 2015). En effet, sa fonction principale est la formation d'énergie cellulaire sous forme d'ATP via la chaîne respiratoire (CR) qui est une source majoritaire d'EROs (Murphy, 2009). Cette dernière se compose de quatre complexes enzymatiques (complexe I à IV) qui assurent la formation d'une partie de l'ATP par phosphorylation oxydative. Les complexes composant la CR permettent la réduction de divers substrats et la formation d'un gradient de protons indispensable à la phosphorylation oxydative. Cependant, il arrive parfois que des électrons s'échappent, notamment au niveau du complexe I et III, et réagissent avec l' O_2 . Cette réaction forme alors des anions superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$, capable d'endommager l'ADN (Finkel, 2011) (**Figure 12**).

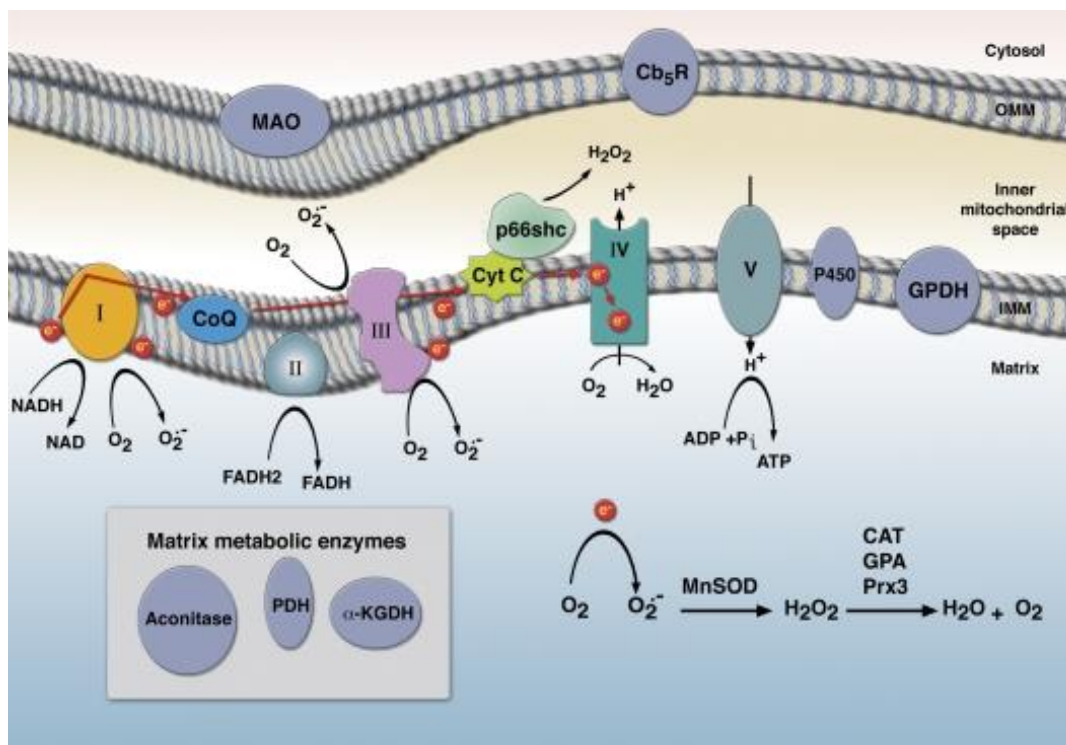


Figure 12 : Production d'ERO par la mitochondrie (d'après Finkel, 2011)

c.2.3) Autre source d'ERO, la monoamine oxydase (MAO)

La mitochondrie, ne joue pas qu'exclusivement un rôle dans la production d'énergie, elle comporte aussi un équipement enzymatique impliqué dans diverses réactions biologiques. La monoamine oxydase (MAO), par exemple, est une enzyme pro-oxydante présente sur la membrane externe de la mitochondrie. Il existe deux isoformes de cette enzyme, la MAO-A et la MAO-B qui sont exprimées de façon variable dans l'organisme et dont l'affinité pour leurs substrats est différente. Le rôle de la MAO est la détoxification par oxydation d'amines biogènes telles que la noradrénaline, l'adrénaline et la sérotonine. Cependant, cette réaction peut être à l'origine d'une augmentation du stress oxydant intra cellulaire par production d' H_2O_2 (Kaludercic et al., 2014). Avec le vieillissement, il est observé une augmentation de l'expression et de l'activité de la MAO-A dans le cœur, chez le rat et la souris (Maurel et al., 2003; Villeneuve et al., 2013) et de la MAO-B dans le cerveau chez le rat (Mallajosyula et al., 2008).

c.2.4) Le système antioxydant

La mitochondrie, de par sa proximité avec les EROs, comporte un système antioxydant efficace. Ce système se compose de la manganèse Superoxyde Dismutase (MnSod) qui est située dans la matrice externe de la mitochondrie. Cette dernière est une métalloprotéine capable de dismuter l' $O_2^{\cdot -}$ généré par la CR et de le transformer en H_2O_2 qui diffuse alors dans le cytoplasme ou il est pris en charge par la Catalase. La catalase est une enzyme cytosolique qui régule la concentration intracellulaire d' H_2O_2 . Elle permet en effet la dismutation de H_2O_2 afin de produire de l' O_2 et de l' H_2O alors inoffensifs pour la cellule. Par ailleurs, la cellule dispose d'un autre système d'élimination des EROs via le tripeptide Glutathion (GSH) cytosolique et mitochondrial. Le GSH est impliqué dans une réaction d'oxydoreduction permettant la détoxification de composés pro-oxydants comme l' H_2O_2 et implique la glutathion peroxydase.

c.2.5) L'ADN et les télomères, des cibles privilégiées

Parmi les nombreuses cibles des espèces réactives de l'oxygène, figure l'ADN, et plus particulièrement les télomères. En effet, le rôle des protéines et des lipides oxydés dans l'induction

de la sénescence n'est que très peu décrit (Chondrogianni et al., 2003; Flor and Kron, 2016; Riahi et al., 2015), tandis que la DDR demeure particulièrement bien décrite comme inductrice de sénescence (d'Adda di Fagagna, 2008). De plus, il apparaît aujourd'hui assez clairement que ce sont les dommages spécifiques aux télomères qui sont principalement impliqués dans l'induction de la sénescence et ceci de façon indépendante de leur taille (Vitorelli and Passos, 2017). En effet, les études menées au sein de l'équipe de J. Passos ont permis de montrer que la sénescence pouvait être induite en dehors d'un raccourcissement télomérique par induction de dommages directs sur le télomère (Hewitt et al., 2012). Ce phénomène est appelé « Telomere-Associated-Foci » (TAF). La publication de Hewitt en 2012 démontre que des fibroblastes, dont la sénescence a été induite par irradiation, accumulent de nombreux dommages à l'ADN, dont seuls ceux présents sur les télomères sont persistants. Cette persistance s'explique par la présence d'une structure particulière au niveau des télomères. Cette structure s'appelle le complexe shelterin et permet de donner au télomère une conformation en "boucle" (T-LOOP) repliée sur elle-même. Le complexe shelterin, empêche la fusion simple brin entre les télomères des différents chromosomes mais il réprime aussi le recrutement de la machinerie de réparation de l'ADN. Plusieurs protéines composent et structurent le complexe shelterin, c'est le cas de TRF1, TRF2 (TTAGGG repeat binding factors 1 and 2), POT1 (protection of telomeres 1) et TIN2 (TRF1-interacting nuclear factor 2) (de Lange, 2005) qui sont notamment responsables de l'inhibition du complexe de réparation (Bae and Baumann, 2007) (**Figure 13**). Les dommages générés sur une partie télomérique, les TAFs, apparaissent donc persistants (Fumagalli et al., 2014; Hewitt et al., 2012) et la réponse DDR qui en résultera se maintiendra et pourra, à terme, activer le processus de sénescence. Depuis, de nouveaux travaux portant sur le rôle des dommages spécifiques aux télomères dans l'induction de la sénescence ont été réalisés, notamment au niveau pulmonaire (Birch et al., 2015) et hépatique (Ogrodnik et al., 2017). Il est donc aujourd'hui parfaitement admis le rôle prépondérant que jouent les télomères dans les mécanismes initiateurs de la sénescence.

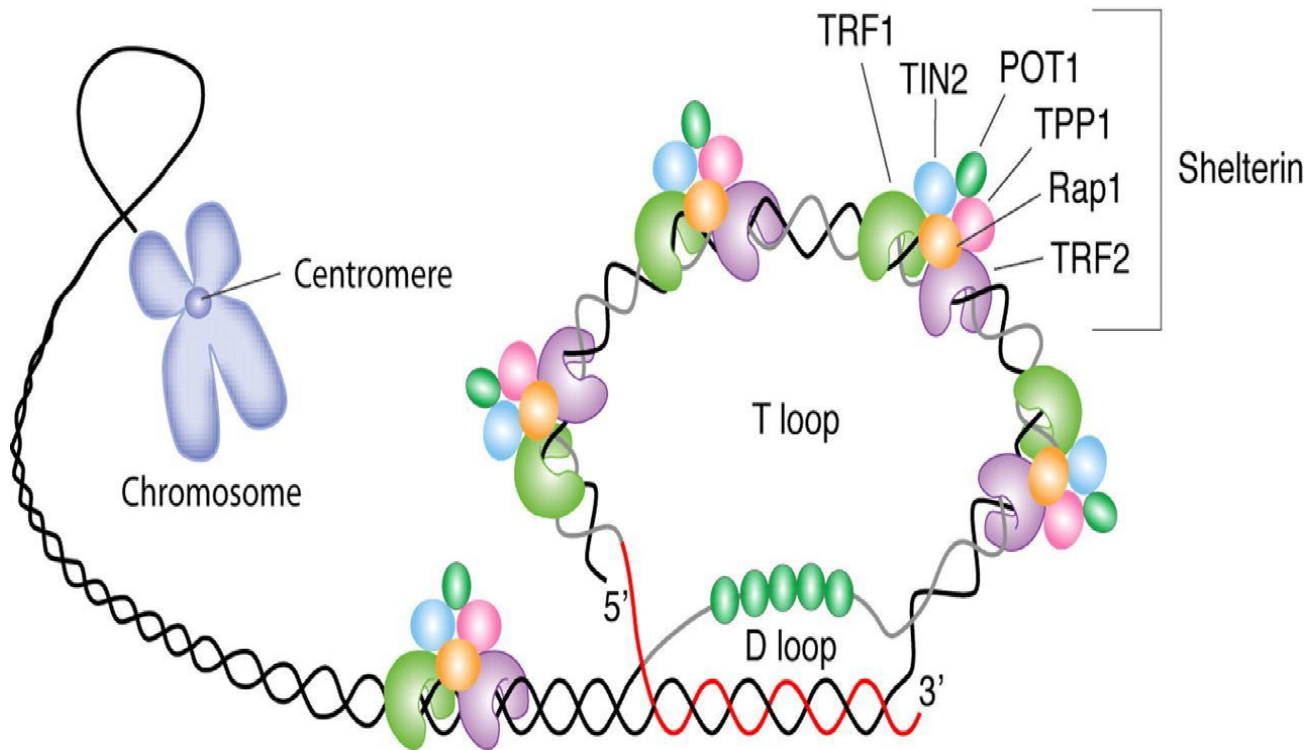


Figure 13. Structure du télomère et du complexe shelterin (d'après Calado and Young, 2008)

2- Altération de la fonction et de la dynamique mitochondriale

La mitochondrie est un organe essentiel à la production énergétique d'ATP cellulaire et qui intervient également dans le métabolisme calcique et dans l'induction du signal apoptotique (Osellame et al., 2012). Comme nous l'avons vu, la mitochondrie constitue un élément d'intérêt majeur dans la gestion du stress oxydant puisqu'elle est à la fois la principale source d'EROs tout en étant une cible privilégiée des EROs. Avec l'âge, on observe de nombreuses modifications d'ordre morphologiques et fonctionnelles de la mitochondrie. Ces nombreuses altérations conduisent à une perturbation du fonctionnement mitochondrial pouvant alors contribuer à la sénescence (Bratic and Larsson, 2013; Korolchuk et al., 2017). De façon très intéressante, une altération de l'ADN mitochondrial par mutation de la polymérase γ (PolG) conduit à une diminution de l'espérance de vie des souris et à un vieillissement accéléré (Trifunovic et al., 2004). De plus, de récents travaux menés par l'équipe de J. Passos, ont démontré le rôle indispensable de la mitochondrie dans l'induction et le maintien du phénotype sénescence, via son rôle dans la production d'EROs, plaçant ainsi cette structure au cœur des processus de sénescence (Correia-Melo et al., 2016; Passos et al., 2010).

a) Modification de la fonction mitochondriale

La chaîne respiratoire (CR) mitochondriale permet la formation d'énergie mais elle reste une source majeure d'EROs. Lors du vieillissement, il est possible d'observer de nombreuses modifications d'activité de la CR dans le muscle squelettique (Porter et al., 2015), le foie (Miwa et al., 2014) et le cerveau (Cocco et al., 2009). Des perturbations de l'activité de la CR peuvent conduire à un phénotype sénescence. En effet, l'inhibition du complexe I de la CR, par traitement pharmacologique à la roténone (Li et al., 2003a) et par répression génétique (Miwa et al., 2014) conduit à un profil de sénescence. Des résultats similaires sont observés par inhibition du complexe II via un traitement avec de la desferroxamine mesylate (Yoon et al., 2003). Ainsi, une diminution de l'activité de la CR observée au cours du vieillissement et concomitante à une dysfonction mitochondriale peut être promotrice de l'entrée en sénescence. Par ailleurs, une augmentation d'expression de la MAO-A pro-oxydante dans le cœur conduit à une dysfonction cardiaque comportant certaines homologues avec la sénescence (hypertrophie, expression de p53) suggérant l'implication de cette enzyme mitochondriale dans les processus de sénescence (Maggiorani et al., 2017; Umbarkar et al., 2015; Villeneuve et al., 2013). D'autre part, la chaîne respiratoire mitochondriale conduit à la formation de métabolites nécessaires à la fonction cellulaire qui peuvent jouer un rôle dans l'induction de la sénescence. C'est le cas notamment du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) qui est formé par oxydation du NADH dans le complexe I de la CR. La cytosolique malate déshydrogénase (MDH1) permet de réduire l'oxaloacétate en malate, mais requiert la réduction du NADH en NAD. Il est intéressant d'observer qu'une diminution de l'activité de la MDH1 et une diminution du ratio NAD/NADH est responsable de l'initiation de la sénescence au sein de fibroblastes (Lee et al., 2012). Le NAD⁺ est aussi décrit comme impliqué dans les mécanismes de réparation de l'ADN et dans l'expression des sirtuines qui jouent un rôle dans l'induction de la sénescence (Kyrylenko and Baniahmad, 2010; Merksamer et al., 2013). L'étude très récente de Wiley, démontre aussi qu'une altération d'expression de la sirtuin 3 dans des fibroblastes permet à elle seule d'induire un phénotype sénescence particulier appelé « mitochondrial associated dysfunction associated-senescence » (MiDAS). Ce phénotype MiDAS est notamment caractérisé par l'acquisition d'un SASP original signé par la sécrétion d'IL-10 mais pas d'IL-6 (Wiley et al., 2016), illustrant encore une fois la difficulté d'établir un phénotype sénescence et un SASP universel. Ces résultats suggèrent le rôle du ratio NAD/NADH dans l'induction de la sénescence par leur capacité à moduler l'activité de MDH1 et l'expression des sirtuines.

Concernant le système anti-oxydant, il est intéressant d'observer l'augmentation de l'espérance de vie des souris surexprimant la catalase dans les mitochondries (Schriner et al., 2005). Des résultats similaires sont observés chez des souris dont la fonction mitochondriale est altérée par mutation de polymérase- γ (Dai et al., 2010). Associé à ces données, il est possible de constater une diminution d'expression de la Catalase et de la mnSOD dans le cerveau des rats âgés (ALPER et al., 1998) ainsi que du système glutathion (Maher, 2005). L'ensemble de ces résultats suggère ainsi qu'une altération du système antioxydant mitochondrial avec le vieillissement peut être promotrice de sénescence.

b) Modifications de la dynamique mitochondriale

b.1) La biogénèse mitochondriale

Des études ont mis en évidence des modifications de la morphologie mitochondriale en association avec le développement d'un phénotype sénescence. En effet, les cellules sénescence *in vitro* présentent une augmentation du nombre de mitochondries qui apparaissent alors plus petites et fragmentées. Cette restructuration morphologique conduit à une augmentation de la masse mitochondriale (Hara et al., 2013; Passos et al., 2007; Tai et al., 2017). La régulation de la masse des mitochondries est dépendante à la fois des mécanismes de biogénèse mitochondriale et également des mécanismes d'élimination des mitochondries par le système autophagie-lysosome. Les mécanismes de biogénèse mitochondriale sont majoritairement régis par les protéines de la famille des peroxysomes proliferator-activated receptor co-activator 1 (PGC-1) qui inclut PGC-1 α et PGC-1 β . Ces derniers sont des co-activateurs transcriptionnels pouvant notamment stimuler la formation de nouvelles mitochondries et réguler leur métabolisme via la régulation de NRF1 et NRF2 (nuclear respiratory factor) (Handschin and Spiegelman, 2006). Par ailleurs, le facteur de transcription TFAM (transcription factor A) est aussi impliqué dans la biogénèse de la mitochondrie de par son rôle dans l'initiation de la transcription de l'ADN mitochondrial (Kukat and Larsson, 2013). De façon très intéressante, sur des lignées de fibroblastes en culture, il est observé une augmentation d'expression de PGC-1 α , PGC-1 β et TFAM après induction de sénescence (Moiseeva et al., 2009) et la surexpression de PGC-1 α conduit à la sénescence (Xu and Finkel, 2002). A l'opposé, plusieurs études suggèrent aussi qu'un dysfonctionnement mitochondrial induit par un défaut d'activation de l'axe

PGC-1 α pourrait être impliqué dans la sénescence (Sahin et al., 2011; Villeneuve et al., 2013). Ces résultats, même s'ils proposent des schémas de régulation opposés, suggèrent un rôle important de la biogénèse mitochondriale dans l'induction de la sénescence.

b.2) Modifications du recyclage mitochondrial (mitophagie)

La mitophagie est un processus cellulaire permettant le recyclage des mitochondries endommagées via leur adressage vers le système autophagie-lysosome. Ce processus, qui implique que des portions de cytoplasme contenant les mitochondries endommagées soient internalisées dans une double-membrane appelée autophagosome, fait intervenir la protéine PTEN-induced putative kinase (PINK1) ainsi qu'une protéine avec une activité ubiquitin ligase appelée Parkin. Cette dernière est capable d'ubiquitinyler des protéines situées sur la membrane des mitochondries endommagées afin de recruter la machinerie responsable de la formation d'autophagosomes. La mitophagie est importante pour le maintien de la fonction et de la survie cellulaire (Deas et al., 2011). Dans de nombreux modèles de sénescence *in vitro* et *in vivo*, le mécanisme d'autophagie est altéré et cela contribue à l'établissement du phénotype sénescence. La voie mTOR reste particulièrement bien décrite dans l'inhibition de la mitophagie (Dalle Pezze et al., 2014; García-Prat et al., 2016). De plus l'activation de p53, qui s'accumule au sein des cellules sénescence, peut interagir avec Parkin, empêcher sa translocation à la mitochondrie et donc inhiber le flux mitophagique (Ahmad et al., 2015). Avec le vieillissement, le recyclage de la mitochondrie est donc altéré et réduit, provoquant par conséquent une accumulation de mitochondries défectueuses pouvant être promotrices de sénescence cellulaire.

3- Activation des gènes du locus INK4

Nous avons abordé l'expression des gènes de la famille des INK4 dans l'arrêt du cycle cellulaire et aussi comme marqueur de sénescence. Cependant les mécanismes associés à leur expression demeurent plus complexes que la voie p53/p21^{CIP1} puisqu'ils sont dépendants de nombreux stimuli.

a) Régulation des INK4 par la DDR

Les stimuli provoquant des dommages à l'ADN ont été démontrés comme inducteurs de l'expression de p16^{INK4a}. En effet, des stress cellulaires génotoxiques induits par les UV (Piepkorn, 2000) et le stress oxydant (Roussel, 1999) sont associés au développement d'un phénotype sénescence et l'expression de p16^{INK4a}. De façon intéressante, les travaux de Wang en 2006, en plus de démontrer l'expression de p16^{INK4a} suite à un stress par irradiation sur des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse, ont permis de mettre en évidence une différence de cinétique d'expression entre p21^{CIP1} et p16^{INK4a} (Wang et al., 2006). En effet, 1 jour post-irradiation l'expression de p21^{CIP1} reste particulièrement élevée (x16) avant de diminuer après 2 semaines (x3.6), alors que la surexpression de p16^{INK4a} est plus modérée dans les premiers jours (x5) et présente une augmentation significative de surexpression après 2 semaines (x11). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression de p16^{INK4a} est plus tardive que celle des acteurs directement dépendant de la DDR comme p21^{CIP1}. Une autre étude plus ancienne démontre aussi que l'activation d'expression de p16^{INK4a} est retrouvée dans les phases avancées de la sénescence des fibroblastes et qu'elle est concomitante à une répression partielle de p21^{CIP1} (Stein et al., 1999).

b) Régulation indépendante de la DDR

L'activation des gènes du locus INK4 fait l'objet de nombreuses études puisque ce dernier reste le marqueur le plus souvent utilisé dans l'identification des cellules sénescence. Ainsi, plusieurs voies de signalisation ont été identifiées comme régulatrices de l'expression du locus INK4. La voie de signalisation p38 « Mitogen-activated protein kinases » (p38-MAPK), est activée en aval de la dimérisation de deux récepteurs à activité tyrosine Kinase permet, notamment l'activation, par phosphorylation, de la protéine p38 qui est connue comme répresseur du cycle cellulaire. Plusieurs études ont démontré l'implication de la voie p38-MAPK dans l'activation du locus INK4 et plus particulièrement p16^{INK4a}, p15^{INK4b} (Ito et al., 2006; Wen-Sheng, 2003; Xu et al., 2014) (**Figure 11**). Plus récemment, une étude a aussi démontré le rôle de la voie mTOR dans l'activation d'expression de p16^{INK4a}. En effet, dans un modèle cellulaire de sénescence induite par surexpression de mTOR, les auteurs observent une activation de la S6K, en amont de ZRF1, qui est un activateur de l'expression de p16^{INK4a} (Barilari et al., 2017). ZRF1 est notamment décrit comme un antagoniste de l'action du

« polycomb repressive complex 1 » (PRC1), un complexe protéique multimérique réprimant l'expression du locus INK4-Arf. Par ailleurs, lors du processus de sénescence l'expression des protéines du groupe polycomb est diminuée (Bracken et al., 2007). Parmi eux, la protéine BMI-1 qui est impliquée dans la répression des gènes du locus INK4 dans de nombreux types cellulaires (Itahana et al., 2003; Jacobs et al., 1999; Lee et al., 2016) (**Figure 11**).

4- La sénescence induite par le stress

Il a été initialement démontré que les cellules entrent en sénescence après un certain nombre de divisions. On parle alors de sénescence répllicative. Cependant, nous venons aussi de voir que la sénescence peut être induite en conséquence de signaux de stress (stress oxydant, dysfonction mitochondrial, TAF...) de façon indépendante aux réplifications cellulaires successives. Dans ce contexte, on parle de sénescence prématurée induite par stress (SIPS). De façon générale il reste aujourd'hui parfaitement bien décrit que les télomères sont l'un des principaux vecteurs d'induction de la sénescence, que ce soit dans le cas de la sénescence répllicative ou de SIPS (Hewitt et al., 2012) (**Figure 14**). Enfin, d'autres acteurs jouent un rôle prépondérant, comme la mitochondrie qui est un pilier central dans l'induction et le maintien du phénotype sénescents (Correia-Melo and Passos, 2015; Correia-Melo et al., 2016; Wiley et al., 2016).

La revue écrite par Toussaint en 2000 dresse le bilan historique des différentes méthodes utilisées pour démontrer l'existence de la SIPS dans de nombreux types cellulaires *in vitro* (Toussaint et al., 2000). Il est cependant intéressant d'observer que, en dépit d'une certaine homologie phénotypique, le protéome et le transcriptome des cellules en sénescence induite par le stress ou répllicative, est différent (Bielak-Zmijewska et al., 2014; Dierick et al., 2000, 2002; Pascal et al., 2005). Cette observation étaye ainsi la nécessité de mieux comprendre les mécanismes inducteurs de sénescence afin de pouvoir identifier des marqueurs plus spécifiques suivant le type de sénescence étudiée. Plusieurs modèles de stress sont utilisés *in vitro* et *in vivo* afin d'induire la SIPS. Compte tenu de la complexité du phénotype sénescents, de nombreux modèles et protocoles sont à ce jour utilisés pour induire la sénescence. La revue écrite par Petrova en 2016 dans *Aging cell* se propose de référencer l'ensemble des protocoles d'induction de sénescence (Petrova et al., 2016).

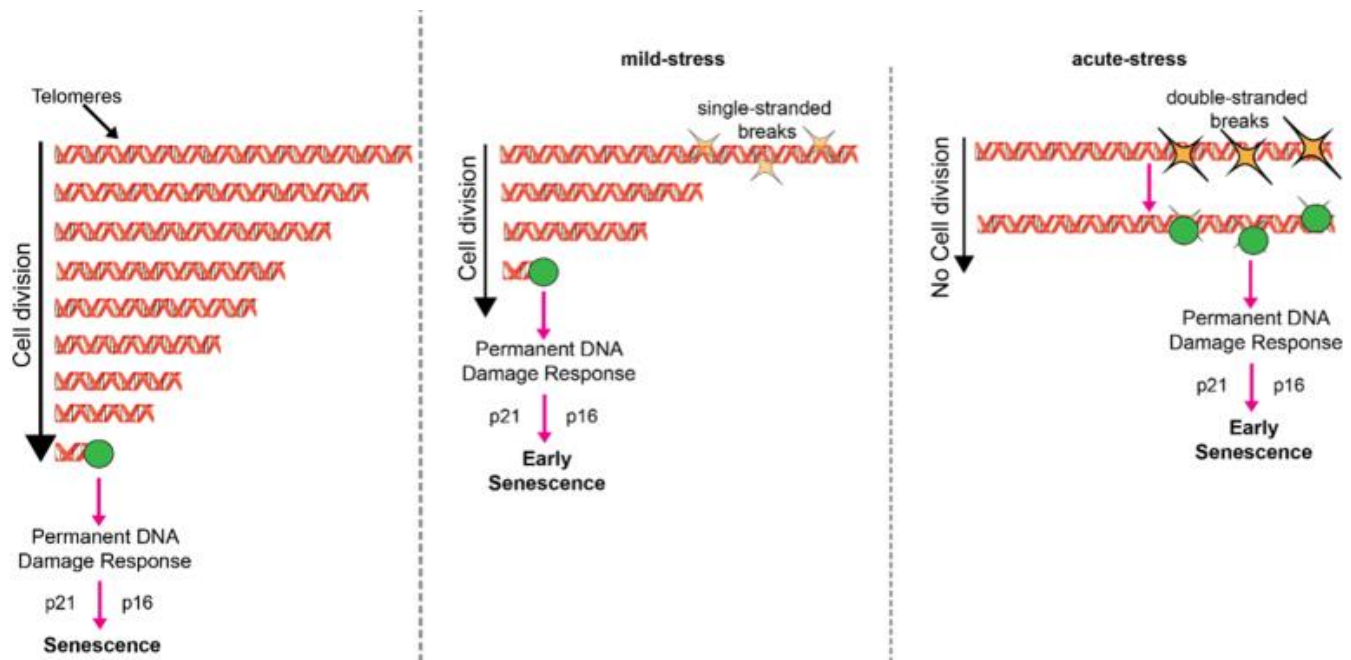


Figure 14. Importance des télomères dans l'induction de la sénescence (d'après Victorelli and Passos, 2017)

d.1) Modèles *in vitro*

Afin d'induire la sénescence *in vitro* plusieurs traitements chimiques sont décrits. Pour cela, des molécules génotoxiques sont utilisées à doses sublétales et sur le long terme afin d'induire un signal d'intensité moyenne de façon chronique. Les drogues les plus courantes sont celles qui génèrent un stress oxydant, comme l' H_2O_2 (Duan et al., 2005) et la doxorubicine (Ghosh et al., 2016; Maejima et al., 2008; Spallarossa et al., 2009), ou qui activent directement la voie p53/p21^{CIP1} comme la Nutlin3a qui réprime MDM2, le principal répresseur de p53 (Efeyan et al., 2007; Manfé et al., 2012; Villalonga-Planells et al., 2011). Des études ont aussi démontré l'efficacité de molécules agissant sur le fonctionnement mitochondrial comme la roténone (Wiley et al., 2016) et la doxorubicine. Par ailleurs, il existe aussi des traitements physiques inducteurs de dommages à l'ADN et activateurs de DDR, comme l'irradiation par rayonnement gamma, les UV et le stress hypoxique qui sont efficaces dans l'induction de la sénescence. Toutefois, il est intéressant d'observer que l'utilisation de ces traitements inducteurs de DDR doit être effectuée à faible dose. En effet, la DDR étant une voie commune à la sénescence et à l'apoptose c'est la force du signal inducteur qui orientera le devenir cellulaire. Ainsi une dose faible et chronique permettra l'induction de la sénescence, tandis qu'un signal fort induira plutôt l'apoptose et dans les deux cas la voie p53 sera activée (Nagano et al., 2016; Rebbaa et al., 2003; Song et al., 2005). Cette caractéristique a parfaitement été mise en évidence par

l'étude de Maejima, qui démontre qu'une dose forte de doxorubicine (1 μ M) sur des cardiomyocytes de rat nouveau-nés induit de l'apoptose alors qu'une dose plus faible (100nM) conduit à la sénescence (Maejima et al., 2008).

La sénescence peut aussi être induite *in vitro* par l'activation d'oncogènes. Les oncogènes sont des gènes qui, une fois surexprimés ou mutés, favorisent le devenir tumoral d'une cellule. C'est en 1997 que le concept de sénescence induite par les oncogènes (OIS) fût décrit pour la première fois (Serrano et al., 1997). Dans cette étude, les auteurs démontrent que l'expression de gène de la famille RAS dans des fibroblastes conduit à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 associé à l'expression de p53 et p16^{INK4a}. Depuis, l'OIS a aussi été décrite via l'activation des gènes MEK, MOS, RAF et BRAF sur plusieurs types cellulaires (Michaloglou et al., 2005; Zhu et al., 1998). Même si les mécanismes demeurent complexes certaines études suggèrent que ce processus de sénescence est la conséquence d'une hyperprolifération qui conduit à des défaut de réplication et à l'activation de la DDR (Di Micco et al., 2006). Enfin *in vitro* la mutation de gènes suppresseurs de tumeurs tels que PTEN, NF-1, VHL et RB1 conduit aussi à l'acquisition d'un phénotype sénescence, on parle alors de « Tumor supressor loss induced senescence » (Di Mitri and Alimonti, 2016).

d.2) Modèles *in vivo*

Dans un contexte *in vivo*, ce sont principalement les traitements physiques comme l'irradiation gamma qui sont utilisés afin d'induire la DDR et la sénescence. Il existe aussi des modèles de sénescence induite par l'utilisation de molécules chimiques. De façon similaire au modèle *in vitro*, les traitements *in vivo* par la doxorubicine et la nutlin3a (activateur de p53) sont décrits comme inducteurs de sénescence. En effet le traitement par la doxorubicine provoque l'apparition de cellules sénescents dans le cœur de souris et de rat (Hoshino et al., 2013; Maejima et al., 2008) et l'injection de nutlin3a chez la souris augmente significativement le nombre de cellules exprimant p21^{CIP1} au sein du tissu pulmonaire (Mouraret et al., 2013).

De façon très intéressante, des données suggèrent que certaines situations de stress pathologiques favorisent la sénescence. En effet, des cellules sénescents ont été identifiées au sein du tissu adipeux de patients en diabète de type 2 (Minamino et al., 2009), dans les plaques d'athéromes (Minamino et al., 2002; Uryga and Bennett, 2016) et dans les poumons de patients fumeurs souffrant

de BPCO (Andujar et al., 2017). Ainsi, un traitement « fast food diet » de seize semaines induit la présence de cellules sénescents (p53, p21^{INK4a} et p21^{CIP1}) dans le tissu adipeux (Schafer et al., 2016b) et l'exposition à la fumée de cigarette augmente la présence de cellules pulmonaires épithéliales sénescents (SA-βGal, lipofuscine p21^{CIP1}) (Tsuji et al., 2004). Ces études sont très pertinentes dans la mesure où elles offrent une vision du potentiel délétère de la sénescence dans la survenue de ces pathologies. Cet aspect délétère sera d'avantage approfondit dans la section **5-b) Aspects délétères**.

5- Rôle de la sénescence cellulaire

C'est grâce à une meilleure compréhension des grandes caractéristiques des cellules sénescents que leurs rôles dans la physiologie ont pu être décrits (He and Sharpless, 2017). Il apparait aujourd'hui clairement que la sénescence est un processus bénéfique dans le maintien de l'homéostasie tissulaire au cours de la vie (rôle antitumoral, aide à la cicatrisation...). Cependant, des récentes études menées par Baker en 2011 et 2016 attestent aussi d'un rôle délétère de la sénescence lors du vieillissement. Ces dernières années et avec la démonstration du rôle délétère de la sénescence, plusieurs études se sont logiquement intéressées à mettre au point des traitements ciblant spécifiquement les cellules sénescents appelés « sénolytiques ».

a) Aspects bénéfiques

a.1) Rôle anti tumoral

La plupart des grandes caractéristiques des cellules sénescents confèrent à la cellule une capacité d'échapper à la tumorigenèse (résistance à l'apoptose, arrêt de la division), ainsi la sénescence est un processus qui fût initialement décrit comme anti-tumoral (Collado et al., 2007). La cellule sénescence exprime par exemple très fortement p53 et p16^{INK4a} qui sont des gènes suppresseurs de tumeurs (Rodier and Campisi, 2011). En effet, comme décrit dans les sections précédentes, ces deux protéines en provoquant l'arrêt du cycle cellulaire, s'opposent à la tumorigenèse qui est notamment caractérisée par une prolifération cellulaire exagérée et incontrôlée. Les variations d'expression de ces gènes de sénescence sont très souvent reliées à la survenue de cancer. Des mutations altérant

l'expression de p53 ou p16^{INK4a} favorisent la survenue de cancers (sarcomes, lymphomes de la rate, mélanome) chez la souris (Donehower et al., 1992; Sharpless et al., 2001). A l'inverse, des souris exprimant une copie supplémentaire de p53 sont naturellement résistantes au développement de cancers induits chimiquement par traitement au o-3-methyl-cholanthrene (García-Cao et al., 2002). De façon très intéressante, une analyse à haut débit du génome chez l'homme révèle que les tumeurs malignes (carcinome des voies urinaires et des poumons, cancer du sein et de l'endomètre...) présentent une altération de l'expression de p16^{INK4a} et/ou de p53 (Kandoth et al., 2013). La voie p53 est une voie commune à la sénescence et à l'apoptose, toutefois il semblerait que ce soit la sénescence qui soit le répresseur majeur de la tumorigenèse (Brady et al., 2011; Liu et al., 2004). En effet, des souris ayant une mutation du gène p53, rendant impossible l'entrée des cellules en apoptose, restent protégées de la tumorigenèse par induction de la sénescence. Ainsi, la sénescence est un mécanisme par lequel l'organisme échappe à la croissance tumorale par l'arrêt de la prolifération des cellules dont l'ADN est endommagé.

a.2) Rôle dans le développement

L'apoptose est un mécanisme largement relié aux mécanismes de développement et d'embryogenèse de l'organisme (Lindsten et al., 2000). Dans la mesure où les processus de sénescence et d'apoptose restent relativement proches, l'hypothèse selon laquelle la sénescence joue un rôle durant l'embryogenèse a été envisagée. Ainsi, en 2013, Storer et al. démontrent la présence transitoire de cellules sénescents au niveau de la crête ectodermique apicale (SA-gal, p21^{CIP1}, p15^{INK4b}) et de la plaque neurale et leur implication lors du développement (Storer et al., 2013). Ces travaux suggèrent que l'acquisition du SASP et la production de chimiokines par les cellules sénescents favorisent le recrutement des macrophages et contrôlent la clairance des cellules sénescents. La même année, des travaux ont démontré des résultats similaires avec l'implication des processus de sénescence dans la formation de l'oreille interne, le sac endolymphatique et le mésonéphros (Muñoz-Espín et al., 2013a). Il est intéressant de noter qu'aucune de ces deux études n'a rapporté l'induction de l'expression de p16^{INK4a} au cours du développement embryonnaire, suggérant une certaine spécificité des voies de sénescence en fonction du contexte biologique.

a.3) Rôle dans la cicatrisation

La cicatrisation est un processus favorisant la résolution d'un état d'altération tissulaire qui implique des mécanismes immunitaires, de prolifération et de remodelage (Midwood et al., 2004). L'implication de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes dans le mécanisme de cicatrisation est aujourd'hui largement décrite (Tomasek et al., 2002). Des études démontrent une augmentation du nombre de myofibroblastes sénescents à proximité des zones cicatricielles. Cette augmentation est directement dépendante de l'expression d'une protéine matricielle CCN1 dans la zone cicatricielle. CCN1 favoriserait l'entrée en sénescence des fibroblastes conduisant à une repression de l'expression du collagène de type I et, par l'acquisition du SASP, la sécrétion de protéines antifibrotiques (MMP1, MMP3) (Jun and Lau, 2010). Dans un contexte cardiaque, le devenir sénescents des myofibroblastes permet aussi de limiter le phénomène de fibrose pathologique par inhibition de leur prolifération au sein du tissu (Meyer et al., 2016). Plus récemment, l'utilisation d'un modèle *in vivo* de suivi et d'élimination des cellules sénescents (p16^{INK4a}-3MR) a permis de mettre en évidence la présence transitoire de cellules sénescents dans la zone cicatricielle après lésion de la peau et de démontrer que leur élimination rallonge le temps nécessaire à la cicatrisation (Demaria et al., 2014). L'acquisition du SASP semble être un critère important via notamment la sécrétion de PDGF-AA (platelet-derived growth factor AA), facteur de croissance impliqué dans le remodelage cicatriciel, qui favorise la différenciation des myofibroblastes et la granulation des tissus (Demaria et al., 2014; Pierce et al., 1991).

b) Aspects délétères

Initialement, et plus de 30 ans après la découverte de Hayflick, des premières études démontrent une augmentation du nombre de cellule sénescents dans l'organisme au cours du vieillissement (Dimri 1995, melk 2003). De plus, une accumulation de cellules présentant plusieurs marqueurs de sénescences (p16^{INK4a}, p21^{CIP1}, SA-βG, raccourcissement des télomères) est aussi retrouvée en association avec certaines pathologies chroniques associées à l'âge comme les maladies pulmonaires (Adnot et al., 2015), cardiovasculaires (Fyhrquist et al., 2013) et métaboliques (Minamino et al., 2009). Toutefois, le lien direct entre le développement de la pathologie et l'implication des cellules sénescents n'a été établi que récemment.

b.1) Aspect pro-tumoral

En devenant sénescents, les cellules acquièrent un SASP qui peut constituer un élément favorisant le développement de cancers (Coppé et al., 2010). En effet, les cellules fibroblastiques sénescents peuvent, par exemple, sécréter des facteurs comme l'IL-6 et IL-8 qui favorisent la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) des cellules épithéliales cancéreuses et augmentent alors leur capacité d'invasion à travers la membrane basale (Coppé et al., 2008). De plus, les MMP sécrétées par les cellules sénescents favorisent aussi l'invasion des cellules cancéreuses par dégradation de la matrice extra cellulaire (Liu and Hornsby, 2007). Enfin, chez l'homme une étude récente démontre que la présence de cellules de Reed-Sternberg sénescents p21^{CIP1} et/ou p16^{INK4a} dans les ganglions de patients atteints du lymphome de Hodgkin est de mauvais pronostic puisque ces cellules semblent plus résistantes aux traitements (Caliò et al., 2015). Des résultats similaires sont obtenus dans l'étude de Althubiti, qui démontre que la présence de cellules sénescents dans le cancer du sein est également de mauvais pronostic (Althubiti et al., 2014).

b.2) Rôles dans la survenue de pathologies chroniques

Les premières données proposant le potentiel délétère des cellules sénescents font suite aux travaux s'intéressant à l'étude de la longévité. Initialement, la restriction calorique est restée longtemps décrite comme bénéfique contre la survenue des pathologies liées à l'âge et dans l'augmentation de l'espérance de vie (Spindler, 2005; Weindruch et al., 1982). Toutefois, les mécanismes associés à ce processus de protection sont restés assez peu décrits. Des études démontrent aujourd'hui que cette restriction calorique permet de diminuer la quantité de cellules sénescents au sein de l'organisme, via notamment une diminution des processus inflammatoires et pro-oxydants (Anton et al., 2013; Wang, 1995). Ainsi, ces résultats permettent de mettre en évidence un lien entre le processus de sénescence et le développement des pathologies liées au vieillissement. Cependant, ce sont les travaux récents de Baker et al. qui ont clairement démontré le rôle direct de la sénescence dans l'apparition des détériorations physiologiques liées à l'âge. En 2011 tout d'abord, par l'utilisation d'un modèle de souris présentant un vieillissement accéléré par mutation d'une protéine de contrôle du cycle cellulaire (BUBR1), le groupe de van Deursen a démontré une diminution de la survenue des pathologies associées au vieillissement accéléré (lordose, obésité, cataracte) et une augmentation de l'espérance de vie des souris lorsque les cellules sénescents sont

supprimées par l'utilisation de souris transgéniques exprimant un « gène suicide » (Baker et al., 2011) ciblant les cellules p16^{INK4a} positives (INK-ATTAC). Cette stratégie permet, l'expression de la protéine de fusion FK-Binding protein-Caspase 8 (FKBP-Casp8) en aval du promoteur murin p16^{INK4a}. Après son expression, FKBP-Casp8 est adressé à la membrane de la cellule et sa dimérisation via l'utilisation du composé AP20187 permet d'activer la voie caspase 8 et d'induire la mort cellulaire par apoptose (**Figure 15**). Cette étude a clairement démontré le lien étroit qui existe entre la présence de cellules sénescences et la survenue de certaines pathologies associées à l'âge. Ce modèle INK-ATTAC a été également utilisé dans le cadre d'un vieillissement physiologique (souris âgées de 20 mois), et a permis de montrer que l'élimination des cellules sénescences (par administration d'AP20187 dès 12 mois) permet une augmentation de la durée de vie médiane des souris. De plus, la clairance des cellules sénescences préserve la fonction rénale, diminue la perte du tissu adipeux, réduit l'hypertrophie des cardiomyocytes et augmente la résistance cardiaque face à un stress β -adrénergique aigu (Baker et al., 2016). Cette étude démontre ainsi le rôle des cellules sénescences dans les pathologies rénales, métaboliques mais aussi cardiaques qui apparaissent avec le vieillissement.

Il apparaît donc aujourd'hui assez clairement que la sénescence joue un rôle particulièrement délétère dans la survenue de pathologies associées au vieillissement. D'autre part, de nombreux travaux démontrent que le stress cellulaire chronique comme l'obésité, la consommation d'alcool et la cigarette favorisent la survenue d'une sénescence pathologique et précoce qui participe activement au développement de maladies (Andujar et al., 2017; Birch et al., 2015; Chen et al., 2017; Shirakawa et al., 2016). De plus, des travaux très récents, démontrant la présence de cellules sénescences en association de la stéatose hépatique lors du vieillissement chez l'homme, mettent aussi en valeur une corrélation entre la quantité de cellules p21^{CIP1} et la sévérité de la pathologie (Ogrodnik et al., 2017). Ces travaux étayent l'hypothèse selon laquelle il serait possible d'évaluer la susceptibilité de chaque individu à développer des pathologies liées au vieillissement par l'identification et la quantification des cellules sénescences. Dans cette optique, il reste cependant important d'identifier, au préalable, des marqueurs tissu-spécifiques de la sénescence afin de pouvoir localiser les organes les plus susceptibles de présenter des signes de pathologies.

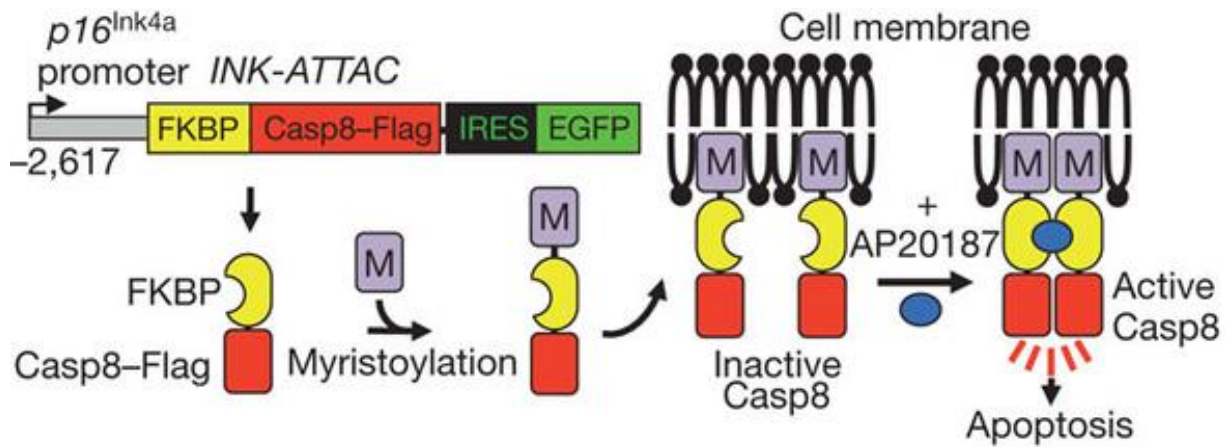


Figure 15. Modèle INK-ATTAC (d'après Baker et al., 2011)

c) Vers l'émergence de nouvelles thérapies

La mise en évidence d'un rôle délétère de la sénescence dans le développement de pathologies a fait naître la volonté de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-sénescence (restriction calorique, mTOR inhibition by rapamycin) (Longo et al., 2015). Cependant, même si ces approches se révèlent efficaces dans une certaine mesure, aucune de ces thérapies n'est spécifiquement destinée à l'élimination des cellules sénescents. Dans cette optique, et très récemment, le concept de drogues sénolytiques émergea avec les travaux du groupe de Kirkland. Ils émettent l'hypothèse selon laquelle l'inhibition du système de résistance à l'apoptose des cellules sénescents favoriserait leur élimination spécifique. Afin d'identifier les voies moléculaires impliquées dans la survie, les auteurs utilisent une approche d'analyse transcriptomique haut débit sur une population de pré-adipocytes sénescents. Les auteurs ont identifié des mécanismes de résistance à l'apoptose et de survie associés aux voies de signalisation impliquant Ephrin et la PI3K. Par la suite, l'utilisation d'une association de composés, que sont le Dasatinib (D, inhibiteur d'Ephrin) et la Quercétin (Q, inhibiteur des PI3K) a permis d'éliminer spécifiquement les cellules sénescents (Zhu et al., 2015). Par ailleurs, l'utilisation des composés D+Q *in vivo* sur des souris âgées permet notamment d'améliorer la fonction cardiaque, d'augmenter la durée de vie et de réduire les signes de fragilités associés au vieillissement. Très récemment, une étude a aussi démontré l'efficacité des molécules D+Q dans le traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique (Schafer et al., 2017). Ces travaux précurseurs ont permis de stimuler la recherche dans l'identification et l'utilisation de nouvelles drogues permettant d'induire spécifiquement la mort des cellules sénescents. Ces dernières années ont ainsi été ponctuées par l'émergence de nouveaux composés sénolytiques. Le Navitoclax, qui est un inhibiteur

de la voie BCL-2 (anti-apoptotique), permet par exemple d'induire préférentiellement la mort des cellules endothéliales sénescents (Zhu et al., 2016). Encore plus récemment, le Panobinostat, qui est un inhibiteur des histones désacétylases (HDAC), permet une élimination préférentielle des cellules pulmonaires sénescents (Samaraweera et al., 2017). Ainsi, même si, à l'heure actuelle, les effets secondaires de ces stratégies thérapeutiques innovantes ne sont pas clairement identifiés, elles restent très encourageantes et fortement associées à une volonté de dynamiser ce secteur de recherche qui est aujourd'hui en pleine expansion (Childs et al., 2017; Kirkland et al., 2017). Cependant, en dépit de résultats très prometteurs, il est important de noter que l'efficacité des drogues sénolytiques est variable en fonction du type cellulaire sénescents. L'association Dasatinib + Quercétine semble inefficace sur les cellules endothéliales, alors que le Navitoclax quant à lui est sans effet sur les pré-adipocytes. Cette variabilité suggère qu'il n'est pas possible d'universaliser la complexité du phénotype sénescents à toutes les cellules de l'organisme. Dans l'optique de mieux comprendre la fonction biologique des cellules sénescents, il apparaît donc important de considérer que chaque type cellulaire étudié possède une signature moléculaire qui lui est propre.

De plus, de façon très intéressante, dans les deux contextes d'élimination globale des cellules sénescents, que ce soit par stratégie gène suicide ou par traitement sénolytique, l'altération de la fonction cardiaque, normalement observée au cours du vieillissement, est atténuée. Cependant, même si ces travaux suggèrent la présence d'un processus de sénescence dans le compartiment cardiaque, ils ne permettent pas de statuer quant à l'implication du processus de sénescence spécifiquement au sein des cardiomyocytes. Ainsi, il apparaît important de caractériser les mécanismes de sénescence associés à la sénescence des cardiomyocytes afin d'identifier son rôle dans la survenue de pathologies cardiaques liées à l'âge.

IV-La sénescence des cardiomyocytes ?

1- Les cardiomyocytes du cœur âgé

Le cœur est constitué de deux composantes cellulaires, le parenchyme, composé des cardiomyocytes et des cellules cardionectrices, et le stroma cardiaque constitué par les cellules non-cardiomyocytaires telles que les fibroblastes, les cellules immunitaires résidentes, les cellules endothéliales et progénitrices. Les cardiomyocytes, qui sont des cellules de taille conséquente (environ 100 μm de long) représentent environ 75% de la masse cardiaque. Cependant, compte tenu de leur taille, on ne retrouve qu'environ 45 % de ces cellules dans le cœur. Les 65 % restant constituent la composante stromale du cœur (Nag, 1980). Les différents types cellulaires qui composent le cœur possèdent un rôle bien distinct dans la physiologie cardiaque. Les cardiomyocytes sont les cellules contractiles qui assurent la contraction et la relaxation du cœur afin de permettre l'éjection du sang. Les cellules stromales, quant à elles, participent à l'homéostasie tissulaire par le maintien de la structure tissulaire via la production de matrice extracellulaire, par l'apport des nutriments et l'oxygénation tissulaire et jouerait un rôle important vis-à-vis des agressions tissulaires grâce aux cellules immunitaires résidentes et aux cellules progénitrices qui permettent l'auto-renouvellement des cellules du stroma cardiaque (fibroblastes, cellules endothéliales) (Choi et al., 2010). Par ailleurs, le cœur est un organe qui ne possède pas de capacités de régénération et de réparation suffisantes en cas d'atteintes tissulaires. Historiquement, les cardiomyocytes ont longtemps été décrits comme des cellules post-mitotiques de par leur incapacité, à l'âge adulte, à se diviser. Cependant une étude menée en 2009 a démontré une faible capacité d'auto-renouvellement des cardiomyocytes via une analyse de l'intégration du carbone 14 au sein de ces cellules (Bergmann et al., 2009). Ce renouvellement reste toutefois très faible puisqu'il est de l'ordre de 1% par an à l'âge de 25 ans et de 0.45% après 75 ans. Ainsi, au cours de la vie il est estimé que seulement 50% des cellules cardiaques seront renouvelées. Encore plus récemment, le suivi du devenir des cardiomyocytes dans le temps par une technique d'imagerie par spectrométrie de masse a permis de démontrer des résultats similaires chez la souris (Senyo et al., 2013). Ces études ont révélé la capacité intrinsèque des cardiomyocytes à se diviser, cependant ce mécanisme n'est que très faiblement actif et ne permet pas une régénération cardiaque suffisante dans le cœur adulte. Par ailleurs, la théorie selon laquelle les cellules progénitrices sont une source de cardiomyocytes après

différenciation (Beltrami et al., 2003) reste aujourd'hui remise en question (Senyo et al., 2013; Sultana et al., 2015). Le cœur est donc un organe post-mitotique fragile qui sera donc directement impacté par le vieillissement de l'organisme.

a) Hypertrophie des cardiomyocytes

En dépit d'une incapacité à se régénérer, le cœur reste un organe adaptatif. En effet, avec l'âge il est observé un épaissement des parois du ventricule gauche (Lakatta and Levy, 2003) (**Figure 16**). Cette modification structurale est la résultante de l'hypertrophie des cardiomyocytes qui composent le ventricule gauche. L'hypertrophie des cardiomyocytes du ventricule est un phénomène compensatoire en réponse à la diminution du nombre de cardiomyocytes (Nadal-Ginard et al., 2003) et à l'augmentation de la postcharge résultant de la rigidification de la paroi des gros vaisseaux (Mistriotis and Andreadis, 2017). Ce phénomène compensatoire permet aux cardiomyocytes restants de renforcer leur capacité contractile mais aussi de combler l'espace cellulaire résultant de l'élimination des cardiomyocytes apoptotiques. (Uygur and Lee, 2016). Cette augmentation des parois ventriculaires se traduit aussi par une diminution du volume de remplissage pouvant être à l'origine d'IC (Kattel et al., 2016). Ce processus est observable chez l'homme (Olivetti et al., 1991) et dans des modèles animaux comme chez le rongeur (Anversa et al., 1990; Kajstura et al., 1996).

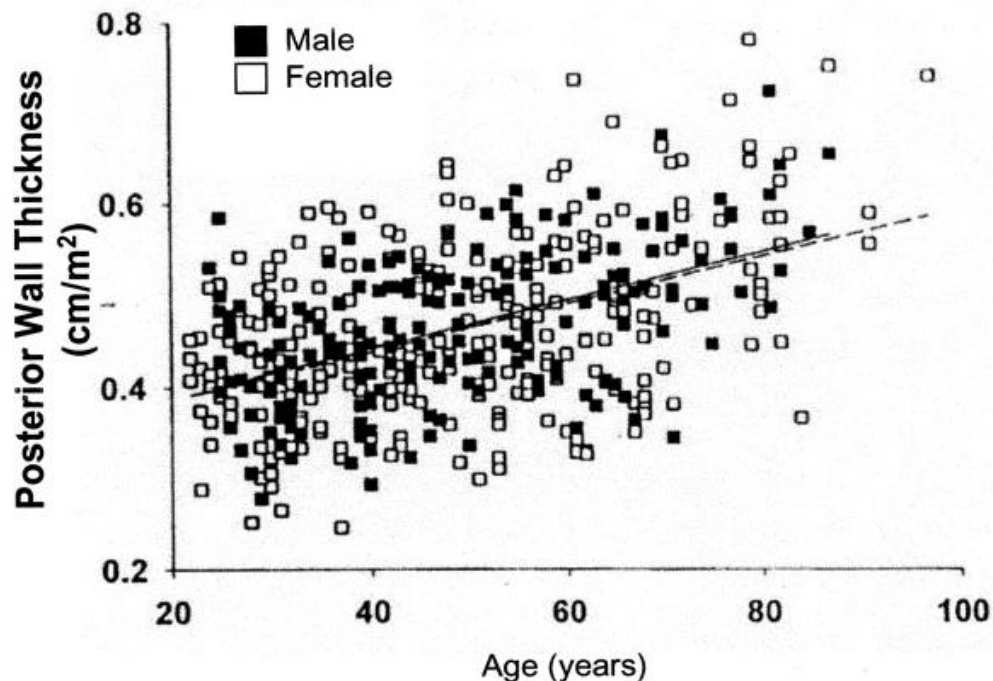


Figure 16. Mesure de l'épaisseur de la paroi postérieure cardiaque (d'après Lakata et Levy 2003)

a.1) Caractéristiques moléculaires de l'hypertrophie

L'hypertrophie se caractérise par une réexpression de gènes fœtaux. Parmi eux, on retrouve la chaîne lourde de myosine (MHC) dont les deux isoformes α et β s'expriment en alternance suivant les stades fœtaux et adultes. Cette structure est impliquée dans la contraction du cardiomyocyte. L'isoforme α est plus coûteuse en énergie mais confère une contraction plus rapide aux cardiomyocytes tandis que l'isoforme β , moins coûteuse en énergie permet une contraction plus lente (Palmer, 2005). Durant le vieillissement chez le rongeur, il est possible d'observer une augmentation d'expression de la β -MHC (Carnes et al., 2004; Waspe et al., 1990). Chez l'homme, l'hypertrophie est aussi associée à une diminution de l'expression de l'isoforme α -MHC avec la surexpression de l'isoforme β -MHC (Lowes et al., 1997). Par ailleurs, lors du processus d'hypertrophie, deux peptides, l'ANP (atrial natriuretic peptide) et le BNP (Brain natriuretic peptide) sont synthétisés au niveau des oreillettes et des ventricules en réponse à la dilatation et à l'augmentation de la pression intra-cavitaire (Yasue et al., 1994) dans le but de réduire la volémie et la charge de travail. Le BNP est ainsi utilisé comme un marqueur de diagnostic et de suivi de souffrance cardiaque.

a.2) Mécanismes inducteurs de l'hypertrophie

Divers facteurs jouent également un rôle important dans le mécanisme d'hypertrophie des cardiomyocytes comme l'angiotensine II, l'activation β -adrénergique, et l'endothéline 1 et 3 (Bupha-Intr et al., 2012; Huang et al., 2004; Rosenkranz, 2004; Schultz et al., 2002a; Tamamori et al., 1996). Enfin, la voie de signalisation mTOR, via l'activation de la S6 kinase (S6K) et l'inhibition de « eukaryotic initiation factor 4E binding protein (4E-BP) » est aussi largement associée à l'hypertrophie des cardiomyocytes par augmentation de la synthèse protéique (Xu and Brink, 2016).

a.2.1) Le système rénine-angiotensine

La fonction cardiaque est modulée par le système rénine-angiotensine-aldostérone (RAA). Ce système, qui est notamment activé en réponse à une diminution de la pression artérielle, permet de réguler la pression artérielle et le volume sanguin via l'action de l'aldostérone sur la réabsorption rénale de sodium et le rôle vasoconstricteur de l'angiotensine II (Atlas, 2007). Le système RAA,

implique la sécrétion initiale de rénine par les cellules juxtaglomérulaires du rein permettant la conversion de l'angiotensinogène en Angiotensine I, elle-même clivée par l'enzyme de conversion de l'Angiotensine (ACE) pour générer l'Angiotensine II (Damy et al., 2007). L'angiotensine II exerce ses effets biologiques par activation de récepteurs membranaires AT-1 et AT-2. L'angiotensine II stimule la sécrétion d'aldostérone par la corticosurrénale. Au niveau du myocarde, l'activation du récepteur AT-1 induit des mécanismes d'apoptose, d'hypertrophie et de fibrose. Les niveaux d'angiotensine II augmentent de façon significative avec le vieillissement (Dai et al., 2009). De façon très intéressante, en 2007, Basso et ses collaborateurs ont montré que l'inhibition du système RAA, via un inhibiteur de l'enzyme de conversion ou via le blocage du récepteur AT-1, augmentait l'espérance de vie des animaux et diminuait le remodelage cardiaque associé au vieillissement (Basso et al., 2007). De plus, il est clairement démontré que le traitement par l'angiotensine-2 provoque un phénotype cardiaque comparable à celui rencontré lors du vieillissement (hypertrophie, fibrose) via son effet sur les fibroblastes cardiaques et sur le rein (Crowley et al., 2006; Gray et al., 1998; Rosenkranz, 2004). En effet, l'angiotensine II favorise notamment la sécrétion de TGF- β pro-fibrosant et d'endothéline-1 pro-hypertrophique par les fibroblastes qui auront alors une action paracrine sur les cardiomyocytes. Enfin, il est décrit que les cardiomyocytes eux-mêmes peuvent être la cible de l'angiotensine II car ils expriment les récepteurs AT-1 et AT-2, dont les niveaux augmentent avec le vieillissement (Heymes et al., 1998; Paradis et al., 2000). L'angiotensine II est aussi reconnue comme pouvant favoriser la genèse de stress oxydant total et mitochondrial qui participe à l'instauration des pathologies cardiaques comme l'IC (Dai et al., 2011; Herbert et al., 2008).

a.2.2) Le système β -adrénergique

La contraction cardiaque ainsi que l'hypertrophie des cardiomyocytes sont également régulées par le système nerveux sympathique (Lohse et al., 2003; Madamanchi, 2007). Les récepteurs β -adrénergiques (β_1 et β_2) sont activés par les catécholamines, une famille de neuromédiateurs synthétisés à partir de la tyrosine, comme l'adrénaline et la noradrénaline. Elles sont principalement sécrétées par les neurones post-ganglionnaires du système nerveux sympathique pour la noradrénaline et par la médullosurrénale pour l'adrénaline. La signalisation en aval des récepteurs β -adrénergiques conduit à une augmentation de l'AMPc à partir d'ATP via des enzymes de type adénylate-cyclase. L'AMPc exerce ensuite ses effets via l'activation de la PKA, une protéine kinase qui régule l'activation des canaux calciques et donc le couplage excitation-contraction (Najafi et al.,

2016). Une suractivation de la voie β -adrénergique a également été impliquée dans le mécanisme d'hypertrophie des cardiomyocytes (Li et al., 2003b; Zimmer et al., 1995). Cela peut notamment s'expliquer par l'action de l'AMPc sur l'activation d'un facteur d'échange appelé EPAC (exchange protein directly activated by cAMP) et qui est décrit dans l'hypertrophie des cardiomyocytes (Métrich et al., 2008). Lors du vieillissement, il est constaté une augmentation des taux plasmatiques de catécholamines en conséquence, notamment, d'une surcharge cardiaque (Esler et al., 1995). Cette augmentation des taux circulants a pour conséquence la désensibilisation de la voie β -adrénergique, qui se caractérise par une diminution du nombre de récepteurs présents et donc une perte de sensibilité chez les personnes âgées (Christou and Seals, 2008; Ferrara et al., 2014). Ce mécanisme conduit à une diminution des performances cardiaques favorisant alors la survenue de l'IC. Toutefois, de façon paradoxale, l'inhibition de la voie β -adrénergique pourrait aussi être un mécanisme de protection contre les pathologies cardiaques. En effet, une inhibition de la voie β -adrénergique par les β -bloquants constitue l'un des traitements de référence de l'IC.

a.2.3) L'endothéline

L'endothéline (Edn) est un peptide vasoactif pouvant être sécrété sous trois isoformes, Edn1, Edn2 et Edn3. Les récepteurs à l'Edn sont présents sous deux formes, ET_A et ET_B, et l'affinité des différentes isoformes de l'Edn pour ces récepteurs est variable. L'Edn1 et l'Edn2 sont très affins pour ET_A, alors que l'affinité de l'Edn1, Edn2 et Edn3 reste similaire pour le récepteur ET_B. En plus d'une affinité variable, ces récepteurs sont reliés à une fonction cellulaire différente. ET_A favorise la contraction cellulaire par mobilisation de Ca²⁺ via une signalisation dépendante de la phospholipase C, de la formation d'inositol triphosphate et l'activation de la voie p38-MAPK (Kerkelä et al., 2011; Ueyama et al., 1999). A l'inverse, l'activation de ET_B favorise la formation de NO responsable de la relaxation cellulaire (Schneider et al., 2007). Chez l'homme les niveaux d'Edn circulants rendent compte de la propension à développer une hypertrophie ventriculaire suggérant son rôle dans l'hypertrophie cardiaque (Hua et al., 2000) mais il reste important de distinguer le rôle des deux récepteurs ET_A et ET_B.

Activation ET_A

Dans le cœur, c'est le récepteur ET_A qui est le plus exprimé à la surface des cardiomyocytes et permet un effet inotrope positif (Russell and Molenaar, 2000). D'autre part, une étude démontre que son

activation *in vitro* par traitement à l'Edn1 sur des cardiomyocytes nouveau-nés de rat conduit à la sécrétion d'ANP (Leite et al., 1994) mais aussi à l'hypertrophie (Bupha-Intr et al., 2012; Cheng et al., 2005). Lors du vieillissement l'activation du récepteur ET_A joue un rôle non négligeable sur l'hypertrophie cardiaque puisqu'il est retrouvé une augmentation de l'Edn1 circulante avec l'âge et l'inhibition de l'expression des récepteurs ET_A chez la souris (ET_AKO) conduit à une protection vis à vis de cette hypertrophie. L'activation des récepteurs cardiaque ET_A par l'endothéline (1 ou 2) est un mécanisme impliqué dans l'hypertrophie des cardiomyocytes avec l'âge (Ceylan-Isik et al., 2013) mais de façon indépendante de la voie p38-MAPK (Ueyama et al., 1999).

Activation ET_B

Les récepteurs ET_B sont exprimés aussi bien sur les cardiomyocytes que sur les cellules endothéliales cardiaques (Takayanagi et al., 1991). Le rôle de ce récepteur dans les processus hypertrophiques reste bien moins décrit, mais une étude démontre l'implication de l'Edn3, qui a une affinité spécifique avec ET_B, dans ce mécanisme. En effet, le traitement *in vitro* de cardiomyocytes nouveau-nés de rat avec de l'Edn3 conduit à leur hypertrophie. De plus, l'activation d'ET_B par l'Edn3 favorise l'expression de l'Edn1 qui agira alors en synergie autocrine/paracrine dans les mécanismes d'hypertrophie (Tamamori et al., 1996). A l'heure actuelle, nous ne disposons pas de données concernant l'expression de ce récepteur et de l'Edn3 lors du vieillissement mais cette voie de signalisation possède un effet avéré hypertrophiant.

b) La mitochondrie des cardiomyocytes lors du vieillissement

Les cellules cardiaques, et plus particulièrement les cardiomyocytes, ont un besoin important en ATP afin d'assurer leur activité contractile et possèdent, par conséquent, une quantité élevée de mitochondries. Une altération de la fonction mitochondriale aura donc un impact direct important sur la fonction contractile des cardiomyocytes. Lors du vieillissement cardiaque, de nombreuses modifications de la fonction mitochondriale au sein des cardiomyocytes ont été observées, telles qu'une diminution de son activité métabolique, une augmentation du stress oxydant mitochondrial et enfin des modulations structurales (Tocchi et al., 2015). Dans les cardiomyocytes âgés, les mitochondries ne présentent pas la même taille, elles sont plus nombreuses et arborent des crêtes plus espacées (El'darov et al., 2015; Guilbeau-Frugier, 2012; Tate and Herbener, 1976). Cette modification de structure s'explique en partie par une modification des lipides constituant la

membrane externe mitochondriale comme la cardiolipine (Lee et al., 2006b) qui est impliquée dans le maintien de la structure des crêtes mitochondriales et l'organisation de la CR (Schlame and Ren, 2009). D'un point de vue fonctionnel, chez le rat âgé, l'activité métabolique assurée par la chaîne respiratoire est diminuée (Tatarkova et al., 2011). Cela se traduit par une diminution de l'activité des complexes, I, III et IV principalement et qui conduit à une augmentation du stress oxydant et de l'oxydation des lipides (4-HNE). De plus, la MAO-A qui est retrouvée surexprimée dans les cardiomyocytes, chez le rat et la souris âgés, peut jouer un rôle important dans la formation de stress oxydant (Guilbeau-Frugier, 2012; Maggiorani et al., 2017). Comme nous avons pu le voir précédemment, l'ensemble de ces altérations mitochondriales favorisent un environnement pro-oxydant ayant un rôle moteur dans l'induction d'un phénotype de sénescence (Bratic and Larsson, 2013; Chaudhary et al., 2011; Tocchi et al., 2015).

c) Altération de la fonction contractile des cardiomyocytes

Avec le vieillissement, la fonction des cardiomyocytes s'altère. La principale fonction des cardiomyocytes est de se contracter, et pour cela, le cardiomyocyte utilise le calcium. Ce dernier, est indispensable à la régulation du couplage excitation/contraction des cardiomyocytes permettant de convertir le signal électrique (excitation) en force mécanique (contraction) (Bers, 2008; Fearnley et al., 2011). En effet, c'est la quantité de calcium intracellulaire qui module la relaxation ou la contraction des cardiomyocytes. Initialement, lorsque le cardiomyocyte se dépolarise, suite à la propagation du signal électrique cardiaque, le potentiel d'action qui en résulte permet l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants de type L (L-Type Ca^{2+}) qui permettent une entrée de calcium dans les cardiomyocytes. L'entrée intracellulaire de calcium conduit à l'activation des récepteurs du réticulum sarcoplasmique (RS) appelés « ryanodine recetor » (RyR) qui provoque un relargage important de calcium stocké au sein de ce RS, ce mécanisme est connu sous le nom de « Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release ». Le calcium pourra alors interagir avec la troponin C, et en modifiant sa conformation, déplacer la tropomyosine des sites de liaison de l'actine et initier la contraction par raccourcissement des myofilaments (actin et myosine). L'activité du RYR peut être régulée par différents systèmes de kinases et phosphatases dont la « protein kinase II dépendante de la calmoduline » (CaMKII) (**Figure 17**). Après repolarisation des cardiomyocytes, les canaux calciques se referment et la relaxation du cardiomyocyte a lieu grâce à la diminution du calcium intracellulaire. Ce processus est notamment induit par transport actif du calcium cytoplasmique vers le RS via des

canaux calciques ATP-dépendants (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA). Les canaux SERCA sont inhibés par le phospholamban (PNL) et activés par la CaMKII. Le calcium est également expulsé de la cellule via les canaux NCX (échangeur Na^{+} - Ca^{2+}) et la « Ca^{2+} -ATPase sarcolemmale ». Avec le vieillissement il est observé une altération d'expression de certains acteurs du couplage excitation/contraction des cardiomyocytes (Feridooni et al., 2015; Torella et al., 2004). En effet, chez des rats âgés, une étude démontre une diminution de l'activité SERCA, qui signe une altération de la recapture du calcium par le RS. Il est par ailleurs observé une diminution d'expression et d'activité de la CaMKII avec le vieillissement (Xu and Narayanan, 1998). L'âge modifie donc l'homéostasie calcique des cardiomyocytes qui peut alors conduire à une altération de la contraction/relaxation de ces derniers et à une fibrillation auriculaire (Feridooni et al., 2015). Par ailleurs au sein du nœud sinusal, qui est le point de départ du signal de dépolarisation, les cardiomyocytes possèdent un défaut d'homéostasie calcique (perte des canaux L-Type Ca^{2+} , et hypertrophie cellulaire) qui altère grandement l'activité pacemaker cardiaque (Larson et al., 2013).

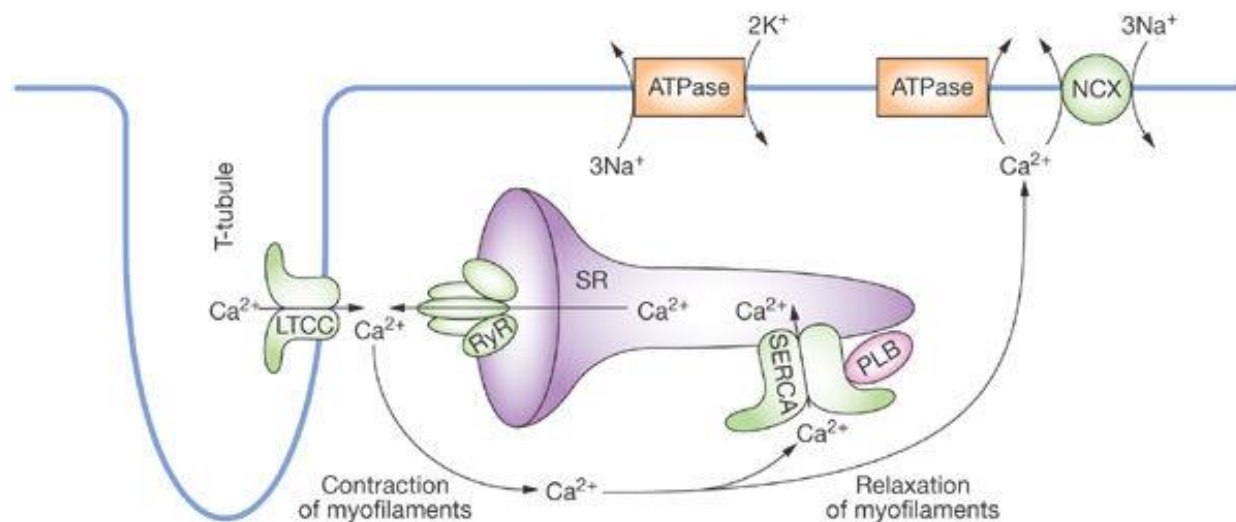


Figure 17 : Homéostasie du cycle calcique (d'après Kawase & Hajjar 2008)

d) La présence de cardiomyocytes sénescents ?

Ainsi, avec le vieillissement, le cœur arbore une morphologie tout à fait particulière qui est largement associée à des modifications d'ordres cellulaires (

Figure 18). On retiendra plus particulièrement, l'hypertrophie et l'altération de la fonction mitochondriale et contractile des cardiomyocytes. Toutes ces caractéristiques étant communes à la

sénescence, il est possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle ces cardiomyocytes sont en sénescence. Cette hypothèse est étayée par les travaux portant sur l'élimination des cellules sénescents de l'organisme, par stratégie gène suicide (Baker et al., 2016) ou par utilisation de drogues sénolytiques (Zhu et al., 2015) qui conduisent à une amélioration de la fonction cardiaque et de l'hypertrophie. Toutefois, à l'heure actuelle, la sénescence au niveau du cœur et plus particulièrement au sein des cardiomyocytes reste très faiblement étudiée et décrite. En effet, les cardiomyocytes sont des cellules post-mitotiques et de manière générale, les processus associés à la mise en place d'un phénotype de sénescence au sein de cellules post-mitotiques ne sont que faiblement décrits.

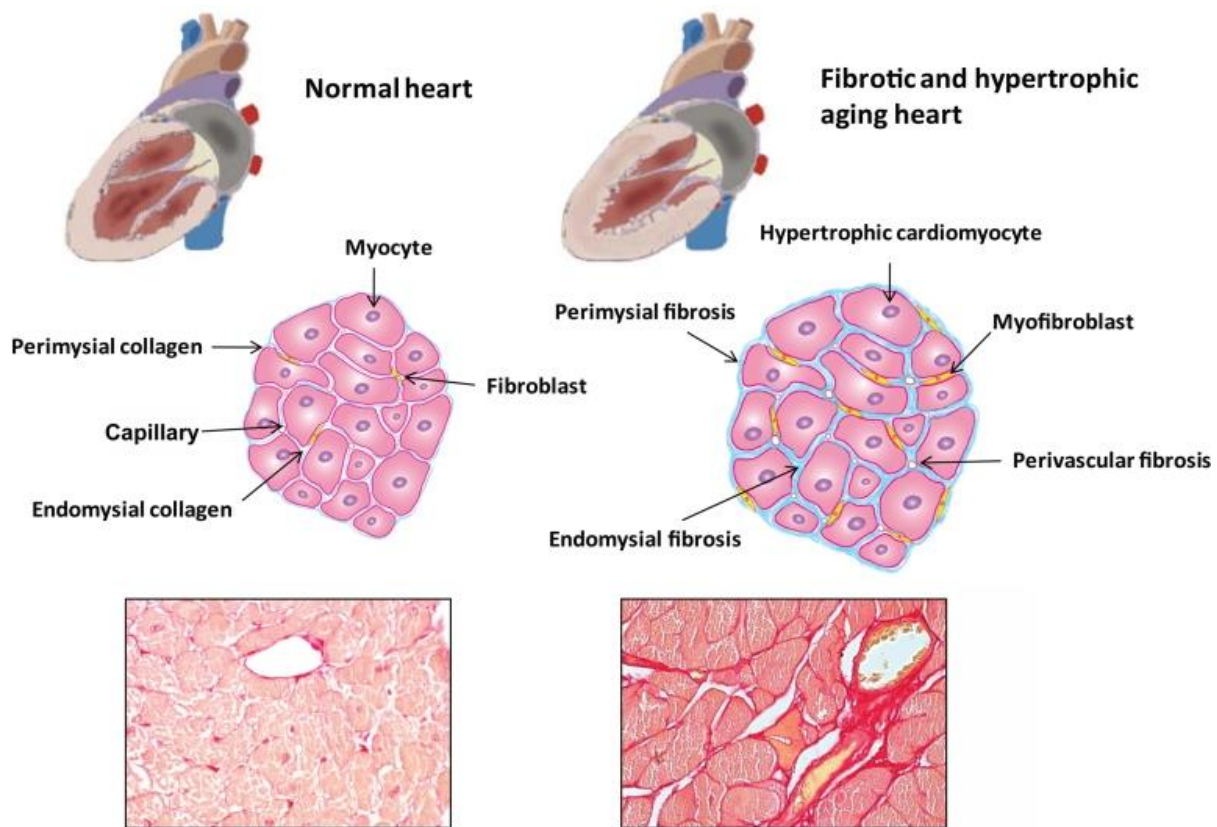


Figure 18. Evolution de l'architecture cardiaque avec l'âge (d'après Biernacka and Frangogiannis, 2011)

2- Les premiers travaux sur les cardiomyocytes

La théorie selon laquelle les cardiomyocytes peuvent entrer en sénescence n'est pas nouvelle puisqu'en 2003 les travaux du groupe de Piero Anversa avaient déjà suggéré cette hypothèse (Chimenti et al., 2003; Torella et al., 2004).

En 2003, Chimenti démontre que dans des cœurs de sujets âgés souffrant d'IC une augmentation de la taille des cardiomyocytes, l'expression du marqueur p16^{INK4A} et un raccourcissement des télomères sont observés. Ces travaux furent étayés en 2004 par l'étude de Torella, qui démontra une augmentation de l'expression d'IGF-1 par les cardiomyocytes ainsi qu'une altération de leur contractilité. Ces travaux, qui suggèrent la survenue de mécanismes de sénescence au sein de la population des cardiomyocytes, soulèvent cependant de nombreuses problématiques :

- Comment expliquer le raccourcissement des télomères au sein des cardiomyocytes, dont les capacités de divisions sont faibles (Bergmann et al., 2009). L'hypothèse des auteurs, consiste à incriminer les cellules progénitrices c-kit+ qui peuvent se différencier en cardiomyocytes. Cependant, l'existence d'un tel type de différenciation est aujourd'hui remis en cause (Sultana et al., 2015).
- Dans les travaux de Torella, une diminution de p21^{CIP1} est observée dans les cardiomyocytes âgés, ce qui est paradoxal dans l'induction des processus de sénescence.
- L'analyse de l'expression génique sur les cardiomyocytes est réalisée sur un isolement de cardiomyocytes pouvant comporter des cellules stromales et pouvant fausser l'analyse.

3- Des études plus récentes

Plus récemment, en 2008 et 2009, des études menées sur des cardiomyocytes néonataux traités (capables de se diviser) avec une dose subtoxique de doxorubicine démontrent qu'ils sont aussi capables d'acquérir un phénotype sénescence par expression de p21^{CIP1}, p16^{INK4a} et une activité SA- β gal (Maejima et al., 2008; Spallarossa et al., 2009). Les mécanismes identifiés dans les cardiomyocytes néonataux, qui sont des cellules répliquatives, doivent cependant être validés lors de la sénescence post-mitotique des cardiomyocytes. Les travaux de Sahin, en 2011, ont aussi démontré qu'une dysfonction télomérique (souris TERT ^{-/-}) conduit à une altération de la fonction mitochondriale et cardiaque (Sahin et al., 2011). Cependant, il n'est pas possible de savoir si les cardiomyocytes sont spécifiquement impliqués. Encore plus récemment, les travaux de Baker ont

permis d'apporter de nouvelles informations sur le vieillissement cardiaque (Baker et al., 2016). En effet, l'élimination des cellules sénescents p16^{INK4a} lors du vieillissement permet de diminuer l'hypertrophie cardiaque et d'augmenter la résistance du cœur face à un stress aigu. Toutefois, ces travaux ne permettent en aucun cas de savoir si ce sont les cellules stromales ou les cardiomyocytes qui entrent en sénescence et se retrouvent éliminés avec la construction p16^{INK4a}-ATTAK.

4- La sénescence post-mitotique au sein d'autres cellules

Par la suite d'autres travaux ont étayé l'hypothèse de la sénescence au sein des cellules post-mitotiques, notamment grâce aux travaux de Minamino en 2008 sur le tissu adipeux et de Jurk en 2011 sur les neurones (Jurk et al., 2012; Minamino et al., 2009).

c.1) La sénescence des adipocytes

Minamino en 2008 émet l'hypothèse selon laquelle la présence de cellules sénescents au sein du tissu adipeux pourrait favoriser l'insulinorésistance (Minamino et al., 2009). Pour cela, il utilise des souris Ay qui, suite à une perturbation du système anorexigène via le peptide agouti, présentent une prise de masse corporelle importante associée au développement de diabète. Il est retrouvé une augmentation de certains marqueurs de sénescence (Dommages à l'ADN, p53/p21^{CIP1}, SASP et SA-βGal) au sein du tissu adipeux insulino résistant. Par ailleurs, les auteurs ont aussi démontré le rôle inducteur du stress oxydant, mais aussi l'importance de la voie p53 dans la régulation de la résistance à l'insuline via l'utilisation de souris p53^{+/-}.

Ces résultats sont particulièrement intéressants puisqu'ils mettent en valeur de nombreux points importants concernant les problématiques actuelles de la sénescence :

- Tout d'abord les auteurs démontrent qu'il est possible de retrouver des cellules sénescents dans un contexte de stress chez des animaux jeunes. Cela confirme l'importance de la SIPS dans la physiopathologie et la nécessité de la considérer comme un mécanisme jouant un rôle important dans la survenue de pathologies.

- Les auteurs décrivent une voie de sénescence indépendante de l'expression p16^{INK4a}, illustrant la difficulté de choisir les bons marqueurs pour identifier les cellules sénescents en fonction du tissu concerné.
- Par cette étude, les auteurs démontrent le rôle néfaste des cellules sénescents via une action directe sur le métabolisme et la survenue du diabète. C'est un résultat particulièrement intéressant puisqu'il permet de clairement démontrer l'aspect délétère que peuvent avoir les cellules sénescents dans un contexte bien particulier.
- Enfin, la présence de cellules sénescents a été démontrée au sein de la fraction stromale mais aussi dans la fraction riche en adipocytes du tissu adipeux. Ce résultat suggère, pour la première fois, la possibilité d'une sénescence au sein de cellules post-mitotiques comme les adipocytes.

Cette étude a apporté de nombreuses informations dans le domaine de la sénescence (rôle de la SIPS, faiblesse des marqueurs) avec comme point important la possibilité de retrouver ce mécanisme dans les cellules post-mitotiques.

c.2) La sénescence des neurones

Suite aux travaux de Minamino en 2008, aucune autre étude ne s'est intéressée à la sénescence des cellules post-mitotiques. C'est seulement en 2011 que la publication de Jurk a permis d'apporter de nouvelles données sur la sénescence post-mitotique. Cette étude, démontre pour la première fois l'acquisition d'un phénotype sénescents par les neurones. En effet, lors du vieillissement, il est retrouvé l'activation de la DDR, un SASP (IL-6), l'expression de p21^{CIP1} une activité SA-βgal dans plusieurs populations de neurones du cerveau (neurones de Purkinje, du plexus mésentérique, corticaux et de l'hippocampe). L'utilisation de souris p21^{CIP1}-KO permet d'atténuer l'expression de cette signature de sénescence. Les auteurs de cette étude ont alors défini le phénotype retrouvé dans les neurones de souris âgées comme « senescence like phenotype ». Ainsi, cette étude a véritablement permis de définir et de démontrer la sénescence comme non spécifique des cellules capables de division.

5- Problématiques actuelles concernant la sénescence des cardiomyocytes

Plusieurs travaux ont ainsi suggéré l'existence probable d'une sénescence au sein des cellules post-mitotiques comme les cardiomyocytes. Cependant, aucun élément n'a encore permis d'établir quel est le mécanisme inducteur de cette sénescence. De plus, à l'heure actuelle, nous ne disposons d'aucun outil suffisant pour l'identification précise de la sénescence au sein de la population des cardiomyocytes. Il existe donc à ce jour un réel enjeu dans la compréhension des mécanismes inducteurs et les marqueurs moléculaires de la sénescence des cardiomyocytes. Ceci afin de mieux comprendre leur biologie globale et leurs rôles dans la survenue de pathologies cardiaques.

V-Conclusion de l'introduction et objectifs

L'évolution croissante de la population est devenue un véritable problème de santé publique. Il est en effet crucial de pouvoir maintenir des conditions de vie acceptables pour les personnes susceptibles de présenter une perte d'autonomie et le développement de pathologies chroniques. Le cœur du sujet âgé présente de nombreuses altérations structurelles et fonctionnelles qui prédisposent à la survenue de pathologies. Parmi ces dernières, l'ICFEP reste une problématique majeure compte tenu de sa prévalence dans la population âgée, du manque d'efficacité des traitements actuels et des comorbidités. La sénescence cellulaire est un processus qui se définit par l'acquisition d'un phénotype particulier, notamment caractérisé par un arrêt du cycle cellulaire, l'acquisition d'un nouveau sécrétome et des dommages nucléaires. Il est admis aujourd'hui que ce processus jouerait un rôle délétère dans la survenue de pathologies chroniques associées au vieillissement. De plus, la sénescence cellulaire reste complexe puisque les mécanismes inducteurs sont nombreux et les signatures de sénescence sont extrêmement variables d'un organe et d'une cellule à l'autre. Il existe un véritable enjeu dans la compréhension des mécanismes inducteurs de sénescence et dans l'identification de marqueurs tissu-spécifiques. Cependant, la mise en évidence d'une sénescence au niveau cardiaque et plus particulièrement au sein des cardiomyocytes reste faiblement décrite. En effet, les cardiomyocytes sont des cellules post-mitotiques et l'étude de la sénescence dans ce type cellulaire reste très récente et incomplète. Durant ma thèse, je me suis donc

intéressé à **1)** caractériser les mécanismes inducteurs de la sénescence des cardiomyocytes, et plus particulièrement le rôle des télomères, et **2)** déterminer de nouveaux marqueurs de la sénescence spécifique des cardiomyocytes sénescents permettant de les identifier mais aussi de mieux comprendre leur biologie.

Résultats

Etude 1 : Rôle des dommages aux télomères dans l'induction de la sénescence des cardiomyocytes

Avant-propos

La sénescence, est un processus cellulaire retrouvé associé au vieillissement et son rôle néfaste dans la survenue de nombreuses pathologies chroniques est aujourd'hui démontrée (Baker et al., 2016). Ce processus est directement induit par des dommages à l'ADN ou aux télomères (Hewitt et al., 2012) qui conduisent alors à l'acquisition des grandes caractéristiques de la sénescence parmi lesquelles l'arrêt du cycle cellulaire, l'hypertrophie, l'acquisition d'un phénotype sécrétoire (SASP) et de profondes modifications géniques et fonctionnelles (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Aujourd'hui, il est aussi démontré le rôle des mitochondries et du stress oxydant dans la survenue des dommages aux télomères et la caractérisation de ce mécanisme reste nécessaire à la compréhension des processus inducteurs de sénescence. Le cœur est un organe comportant une importante population de cellules post-mitotiques, les cardiomyocytes. L'existence de la sénescence post-mitotique, de façon générale, et au sein des cardiomyocytes demeure encore débattue et mal décrite. De plus, son implication dans la survenue de pathologies cardiaques n'a jamais été clairement démontrée. Ainsi, une meilleure caractérisation des mécanismes inducteurs et l'identification des grandes caractéristiques de la sénescence des cardiomyocytes pourraient apporter de nouveaux éléments importants dans la lutte contre les pathologies cardiaques liées à l'âge. Dans cette optique, et en collaboration avec le laboratoire du Dr Joao Passos à New-Castle en Angleterre (Institut for Ageing), nous avons voulu confirmer que le processus de sénescence peut être retrouvé au sein de la population des cardiomyocytes. Par ailleurs, nous avons aussi étudié le rôle joué par les télomères et les mitochondries dans l'acquisition du profil sénescence.

Article 1 (en cours de soumission, nature communications)

Length-independent telomere damage drives cardiomyocyte senescence

Rhys Anderson^{1,2}, Damien Maggiorani³, James Chapman^{1,2}, Anthony Lagnado^{1,2}, Jodie Birch^{1,2}, Hanna Salmonowicz^{1,2}, Mikolaj Ogrodnik^{1,2}, Diana Jurk^{1,2}, Carole Proctor^{1,2}, Clara Correia-Melo^{1,2}, Emily Dookun⁴, Anna Walaszczyk⁴, Edward Fielder^{1,2}, Andrew Owens⁴, Laura Greaves⁵, Kathy L. Kolsky⁶, Angelo Parini³, Victorine Douin-Echinard³, Nathan K. LeBrasseur⁶, Marissa J. Schafer⁶, Carolyn M Roos⁶, Jordan Miller⁶, Neil Robertson⁷, Jelena Mann⁸, Peter D. Adams⁷, Tamara Tchkonja⁶, James L Kirkland⁶, Jeanne Miallet-Perez³, Gavin D Richardson⁴ & João F. Passos^{1,2}

¹Ageing Research Laboratories, Newcastle University Institute for Ageing, Newcastle University, Newcastle upon Tyne NE4 5PL, UK; ²Institute for Cell and Molecular Biosciences Newcastle University, Newcastle upon Tyne, UK; ³INSERM I2MC, University of Toulouse, France. ⁴Cardiovascular Research Centre, Institute for Genetic Medicine, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, UK. ⁵Wellcome Trust Centre for Mitochondrial Research, Newcastle University Centre for Ageing and Vitality, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, UK. ⁶Robert and Arlene Kogod Center on Aging, Mayo Clinic, 200 First Street, S.W., Rochester, MN 55905, USA ⁷Institute of Cancer Sciences, CR-UK Beatson Institute, University of Glasgow, G61 1BD, UK. ⁸Institute of Cellular Medicine, Faculty of Medical Sciences, William Leech Building, Newcastle University, Framlington Place, Newcastle upon Tyne, NE2 4HH, UK

Running title: Telomeres drive cardiac ageing

Corresponding authors:

Dr. João F. Passos, Newcastle University Institute for Ageing, Institute for Cell and Molecular Biosciences, Campus for Ageing and Vitality, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, NE4 5PL, UK. Phone +44 191 248 1222, Fax +44 191 248 1101, Email Joao.Passos@ncl.ac.uk

Dr Gavin D. Richardson, Cardiovascular Research Centre, Institute for Genetic Medicine, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, NE1 3BZ UK, Telephone: +44 (0)191 241 8615 Fax: +44 (0)191 241 8666 Email Gavin.richardson2@ncl.ac.uk

Dr. Jeanne Miallet-Perez INSERM I2MC, University of Toulouse, France Email: jeanne.perez@inserm.fr

Abstract

Ageing is the biggest risk factor for cardiovascular health and is associated with increased incidence of cardiovascular disease. Cellular senescence, a process driven in part by telomere shortening, has been implicated in age-related cardiac dysfunction. However, the role of cellular senescence and its underlying mechanisms in slowly dividing/post-mitotic cardiomyocytes is not understood.

Here, we show that during ageing, human and murine cardiomyocytes acquire a senescent-like phenotype characterised by persistent DNA damage at telomere regions that can be driven by mitochondrial dysfunction, and that occurs independently of cell-division, telomere length, and telomerase activity. Telomere damage in cardiomyocytes activates the classical senescence-inducing pathways, p21^{CIP} and p16^{INK4a}, but not a typical senescence-associated secretory phenotype (SASP). Crucially, clearance of p16^{INK4a}-positive senescent cells in mice alleviates myocardial hypertrophy, a detrimental feature of cardiac ageing. Our data demonstrate a key role for telomeres in senescence, ageing, and disease of a largely post-mitotic tissue, the heart.

Introduction

The role of cellular senescence in tissue maintenance, repair, and ageing is currently a rapidly evolving area of research under intense focus. Cellular senescence is classically defined as an irreversible loss of division potential of mitotic cells, often accompanied by a senescence-associated secretory phenotype (SASP). Whilst senescence can be detrimental during the ageing process, it has also been implicated in fundamental biological processes such as tumour suppression, embryonic development, and tissue repair¹.

Telomere shortening has been proposed as a major inducer of senescence². Telomeres are repetitive sequences of DNA, associated with a number of proteins, which form a complex known as shelterin³ that facilitates formation of a lariat-like structure to shield the exposed end of DNA⁴, thus serving to protect the ends of chromosomes from being recognised as DNA damage⁵. The current dogma of telomere biology suggests that telomere shortening with each successive cell division eventually disrupts the protective cap, leading to a sustained DNA-damage response (DDR) and activation of the senescence programme⁴. This hypothesis may explain age-related degeneration of tissues maintained by constant contribution of stem cell pools, such as the skin and hematopoietic systems; however, it is insufficient to explain how senescence contributes to ageing in primarily post-mitotic tissues such as the heart.

Heart failure is a common disease of the elderly. Distinct physiological and molecular changes occur in the normal heart with ageing, including cardiomyocyte hypertrophy, which is associated with myocardial dysfunction and progression to clinical heart failure⁶. Critically short telomeres, induced by breeding of multiple generations of mice lacking the catalytic subunit of telomerase, *Terc*, leads to cardiac dysfunction and myocardial remodelling⁷. However, this may not reflect normal physiological myocardial ageing, especially considering that the majority of cardiomyocytes withdraw from the cell cycle shortly after birth and cardiomyocyte turnover rates in both humans and mice are extremely low⁸⁻¹⁰, suggesting low rates of telomere shortening throughout life. However, we and others have reported telomere damage irrespectively of length during stress-induced senescence. Therefore, we investigated if this phenomenon occurs in cardiomyocytes and whether it contributes to the ageing of the heart.

Here, we demonstrate for the first time that a cardiomyocyte senescence-like phenotype is a feature of normal physiological human and rodent ageing and provide a novel mechanistic model by which senescence occurs in slowly dividing/post-mitotic tissues. Persistent DNA damage foci, which co-localize with telomere regions, increase specifically in cardiomyocytes with age independently of

telomere length, telomerase activity, or DNA replication and can be induced by mitochondrial dysfunction *in vitro* and *in vivo*. Global gene expression analysis of a highly purified population of cardiomyocytes isolated from young and old mice indicates activation of classical senescence growth arrest pathways, but no induction of a typical Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) signature. Furthermore, specific induction of length-independent telomere dysfunction in cardiomyoblasts induces several senescence markers, including hypertrophy, which importantly is also associated with cardiomyocyte senescence *in vivo*. Finally, we demonstrate that suicide gene-mediated ablation of p16^{Ink4a} expressing senescent cells and treatment with the senolytic drug, navitoclax¹¹, reduces both cardiomyocytes containing dysfunctional telomeres and cardiac hypertrophy in aged mice.

Results

Length-independent telomere damage in aged cardiomyocytes *in vivo*

Previously, we defined a novel mechanism of cellular senescence *via* the induction of irreparable telomere damage that occurs in the absence of telomere shortening¹². These data led us to hypothesise that this form of telomere damage could be the process by which senescence occurs in post-mitotic, or slowly dividing cells, which are not subject to proliferation-associated telomere shortening. We therefore investigated telomere dysfunction in adult mice throughout ageing by using dual Immuno-FISH to quantify co-localisation between DDR protein γ H2A.X and telomeres, hereafter referred to as Telomere-Associated Foci (TAF). Given the well-reported technical difficulties identifying cardiomyocytes by immunofluorescence, we detected TAF in combination with cardiomyocyte specific markers, such as the sarcomeric protein α -actinin, troponin C (**Figure 1 a**), and the perinuclear protein PCM1¹³ (**Extended Figure 1 a, b**).

We found that the mean number TAF per cardiomyocyte and the total percentage of cardiomyocytes containing TAF increased significantly with age in both mouse and human hearts (**Figure 1 a & b and Extended data Figure 1a**). In contrast, the number of γ H2A.X foci not co-localising with telomeres (non-TAF) did not change with age and were detected in almost all adult cardiomyocytes irrespective of age (**Figure 1c**). Interestingly, cardiomyocytes from old animals contained a significantly higher number of TAF than other cardiac cell-types (**Extended data Figure 1b**), suggesting that telomere dysfunction is a predominant feature of myocardial ageing. To further confirm the localisation of a DDR at telomeres, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) on cross-linked chromatin from heart tissue, using an antibody against γ H2A.X followed by quantitative real-time PCR for

telomeric repeats. We found enrichment of γ H2A.X at telomeres in 30 month compared to 3 month old mice (**Figure 1d**).

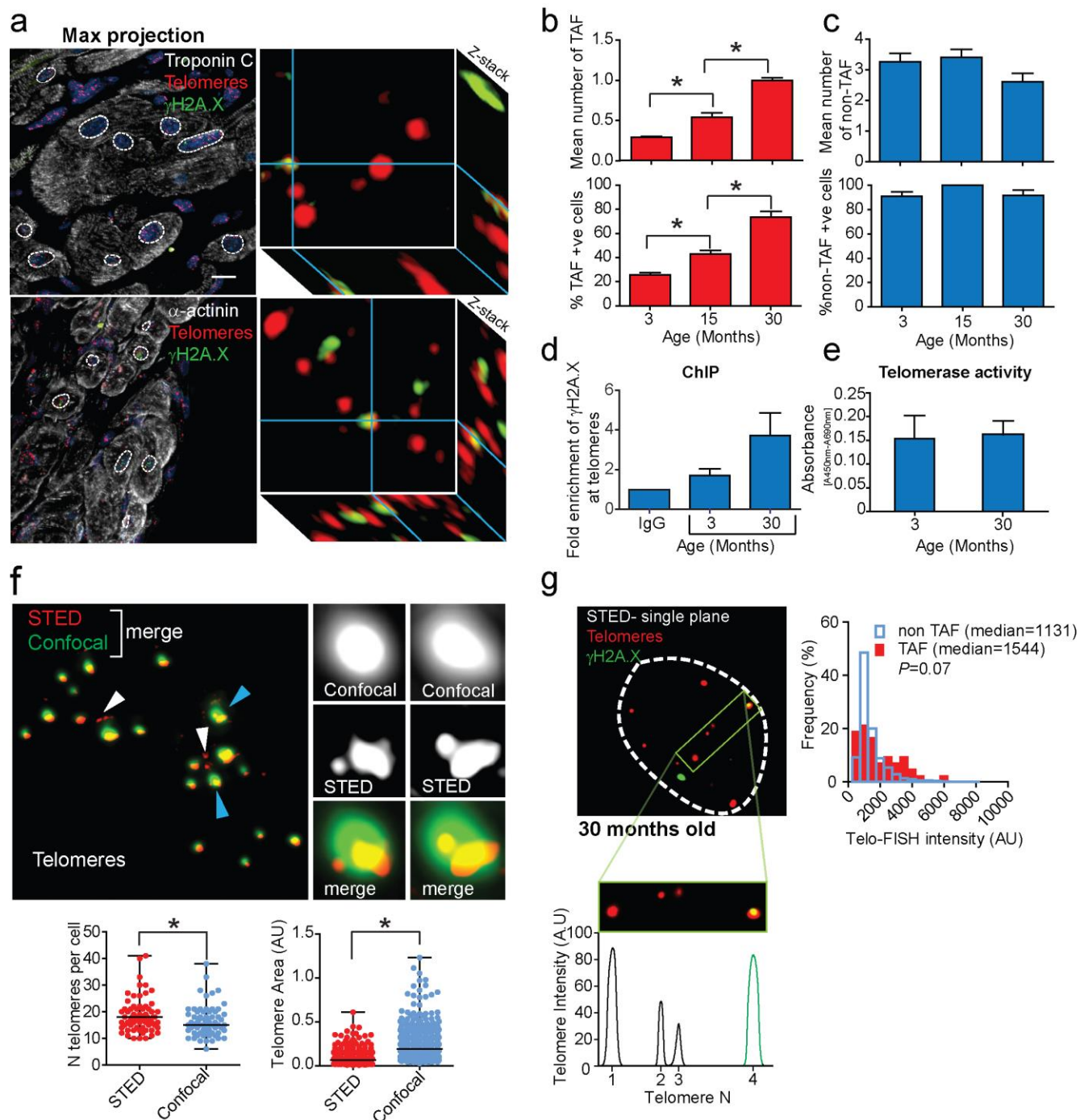


Figure 1. Length-independent telomere damage in aged mouse cardiomyocytes.

(a) Representative images of γ H2AX immuno-FISH in troponin-C/ α -actinin- (top left and bottom left panels respectively) positive mouse cardiomyocytes (white – troponin-C/ α -actinin; red – telo-FISH; green – γ H2AX). Images are Z-projections of 0.1 μ M stacks taken with a 100x oil objective. Scale bar: 10 μ M. Right panels represent a single Z-plane where co-localisation between a γ H2AX foci and telomere was observed. (b) Mean number of TAF (top) and mean percentage of TAF-positive nuclei (bottom) in α -actinin positive cardiomyocytes from C57BL/6 mice. Data are mean $\pm$ SEM of $n=4-7$ mice per age group. 102-155 α -actinin positive cardiomyocytes were quantified per age group. Statistical analysis performed using One Way ANOVA (Holm-Sidak method); * $P<0.05$. (c) Mean number of non-TAF (top) and mean percentage of non-TAF-positive nuclei (bottom) in α -actinin positive cardiomyocytes from C57BL/6 mice. Data are mean $\pm$ SEM of $n=4-7$ mice per age group. 102-155 α -actinin positive cardiomyocytes were quantified per age group. Statistical analysis performed

using One Way ANOVA; * $P < 0.05$. **(d)** Fold enrichment of γ H2AX at telomere repeats by real-time PCR. Graph represents fold enrichment of γ H2AX at telomeric repeats between IgG control, 3 and 30 month whole mouse hearts; Data are mean $\pm$ SEM of $n=3$ mice per age group. **(e)** Quantitative PCR-ELISA TRAP assay comparing telomerase activity of 3 and 30 month old C57BL/6 mice whole heart lysates. Data are mean $\pm$ SEM of $n=4$ mice per age group. Two-tailed t-test revealed no statistical significant differences. **(f)** Representative images of conventional confocal versus STED microscopy for detection of telomeres by FISH. Comparison between average number of telomere detectable per cell (left graph) and mean telomere area (right graph) in mouse cardiomyocytes, detected by either standard confocal or STED microscopy. Data are represented as the mean for each measurement, with the horizontal line representing the group mean. **(g)** (Left) Representative image of immuno-FISH using STED microscopy for γ H2A.X and telomeres in cardiomyocytes from 30 month old mice; (right) Histograms representing qFISH analysis comparing individual telomere length either co-localising (TAF) or not co-localising (non-TAF) with γ H2AX DDR foci in mouse cardiomyocytes. A total of 200 cardiomyocytes were analysed. Mann-Whitney test reveals no statistical significance between TAF and non TAF $P=0.07$.

Although the majority of the cardiomyocytes in the adult heart are considered post-mitotic, the adult heart retains limited but measurable potential for cardiomyocyte proliferation^{8,10}. We next investigated if increased TAF was the outcome of telomere shortening driven by replication and/or impaired telomerase activity. Having first observed that telomerase activity was not affected by mouse age (**Figure 1e**), we found a reduction of 17% in telomere FISH signal when comparing 4m to 30m old mice. However, the median telomere FISH signal detected in old wild-type (30 month old) mice was comparatively higher than that found in 4th generation *TERC*^{-/-} (G4) (**Extended data Figure 1d**).

To determine if the shortest telomeres were the ones signalling a DDR, we used super-resolution stimulated emission depletion microscopy (STED) to accurately detect telomere length by Q-FISH in cardiomyocytes. Using STED, we could detect telomere signals substantially below the diffraction limit of ~260 nm. This was evidenced by an increased number of telomeres detected per cardiomyocyte, as well as decreased individual telomere area when compared to confocal microscopy (**Figure 1f**). STED microscopy also revealed the existence of clusters of telomeres with varying lengths, which would otherwise be identified as single telomere signals by confocal microscopy (**Figure 1f**).

We then proceeded to analyse telomere length by Q-FISH in cardiomyocytes from old mice using STED. We analysed the telomere length at telomeres co-localising with a DDR (TAF) and those not co-localising with a DDR (non-TAF) in 30 month old mice (**Figure 1g**) and human hearts (**Extended data Figure 1c**). We found no significant difference in the length of TAF+ and TAF- telomeres in either 30 month old mouse or human cardiomyocytes (**Figure 1g and Extended Data Figure 1d**), indicating that in cardiomyocytes, TAF occur independently of telomere shortening. Based on these analyses, we conclude that the initial observation of length-independent telomere-associated DNA damage is not due to the limitations of conventional confocal microscopy and that the shortest telomeres (which can only be detected by STED) are not preferentially signalling a DDR. While cardiomyocyte proliferation is considered to be negligible in adult humans and mice, it is possible that TAF may be the outcome of a small fraction of dividing cardiomyocytes. To further ascertain if age-associated accumulation of TAF is linked to cardiomyocyte proliferation and turnover during ageing, we analysed our data in a mathematical model of a cardiomyocyte population over 27 months of a mouse lifespan. Our simulations reveal that, even considering relatively high estimates of cardiomyocyte cell division rates (4-15%), proliferation still cannot account for the rate of the age-dependent increase in TAF. Rather, if we assume that proliferation plays no role in the TAF increase with age and that TAF

are generated in non-dividing cells, there is a high degree of correlation between the model and our experimental data (**Extended Data Figure 1e**).

Uncapping of telomeres has also been suggested as a possible mechanism for the induction of a DDR at telomeres. For instance, in a mouse model of telomere dysfunction, *mdx^{4cv}/mTR^{G2}*, reduced expression of shelterin components Tpp1, Polt1a, and Pot1b was suggested to result in increased telomere erosion in cardiomyocytes¹⁴. In contrast, we found no significant differences in expression of any shelterin components in cardiomyocytes isolated from young and old wild-type mice (**Extended Data Figure 2a**). Similarly, we observed no significant difference in the abundance of TRF2 (an essential component of t-loop formation) in either TAF or non-TAF in human cardiomyocytes *in vivo* (**Extended Data Figure 2b**). Altogether, our data support the notion that TAF increase with age in cardiomyocytes and this occurs as a result of a process that is independent of cell proliferation and linked to neither telomere shortening nor overt alteration of telomere regulatory factors, such as shelterin components and telomerase. Having shown the phenomenon of telomere dysfunction occurring in cardiomyocytes *in vivo*, we also found an age-dependent increase in TAF (but not non-TAF), in other post-mitotic cells such as skeletal muscle myocytes and hippocampal neurons, which indicates the widespread nature of this phenomenon (**Extended Data Figure 3**).

Telomere Damage is Persistent in Cardiomyocytes

Our previous work demonstrated that stress-exposure leads to activation of a persistent DDR at telomeric regions^{12,15}. In order to investigate the kinetics and nature of the DDR in cardiomyocytes, we utilised different *in vitro* models. We first identified that exposure to X-ray radiation (10Gy) resulted in both Telomere-Associated Foci (TAF) and non-Telomere Associated DNA damage Foci (non-TAF) in mouse embryonic cardiomyocytes positive for Troponin and PCM1 (**Figure 2a & b and Extended Data Figure 4a**). However, only TAF were persistent, with non-TAF number becoming significantly reduced with time (**Figure 2c**). These data suggest that the majority of genomic DNA damage in cardiomyocytes is reparable and only telomeric DNA damage is irreparable and persistent. Cultures of cardiomyoblasts were used to validate the above observation (**Extended Data Figure 4b & c**) and allow real-time visualization of DNA repair. Three days subsequent to X-ray irradiation, we monitored DDR using a 53BP1-GFP fusion protein¹⁶ and time-lapse microscopy (**Figure 2d**). Over a 10 hour time-course, the majority of individual DDR foci could be seen to be rapidly resolved with only approximately 20% of the original DNA damage foci persisting throughout the time course (**Figure 2e**). Subsequent analysis of end-point TAF demonstrated the fraction of unresolved DNA damage was consistent with TAF numbers at this time point (**Extended Data Figure 4c**).

Double strand breaks can arise in telomeres due to replication errors when replication forks encounter single strand breaks. In fact, telomere repeats have been shown to be sensitive to replication stress and induce a DDR¹⁷. As the cardiomyoblasts retain their proliferative potential in culture, which is not reflective of the reported behaviour of adult cardiomyocytes *in vivo*¹⁰, we sought to ascertain if TAF could be induced in the absence of cell division. In order to test this hypothesis, we pre-incubated cardiomyoblasts with EdU for 3 hours and subjected them to either irradiation (10Gy) or 10 μ M H₂O₂ followed by 24 hours recovery in the presence of EdU. We found that the mean number of TAF was significantly increased in cells, which did not incorporate EdU following exposure to stressors (**Figure 2f**) indicating that TAF can be induced in the absence of DNA replication. We further isolated and cultured adult mice cardiomyocytes and exposed them to 5 μ M H₂O₂. We observed that the mean number of TAF was significantly increased after treatment (**Figure 2g and Extended Data Figure 4d**). Furthermore, we did not find evidence that the shortest telomeres were being specifically targeted by stressors. In fact, EdU-negative irradiated cardiomyoblasts had a slightly higher median telomere length in damaged telomeres (TAF) compared to telomeres that did not co-localise with γ H2A.X (non-TAF), however, such a difference was not found in adult murine cardiomyocytes treated with H₂O₂ (**Figure 2h**). To determine if persistent TAF could also be induced in adult cardiomyocytes *in vivo*, we exposed young mice to a whole-body dose of 2Gy X-ray irradiation and measured the level of TAF in cardiomyocytes after 11 months recovery. Both the mean number of TAF and percentage of cardiomyocytes positive for TAF were significantly higher (**Figure 1h**).

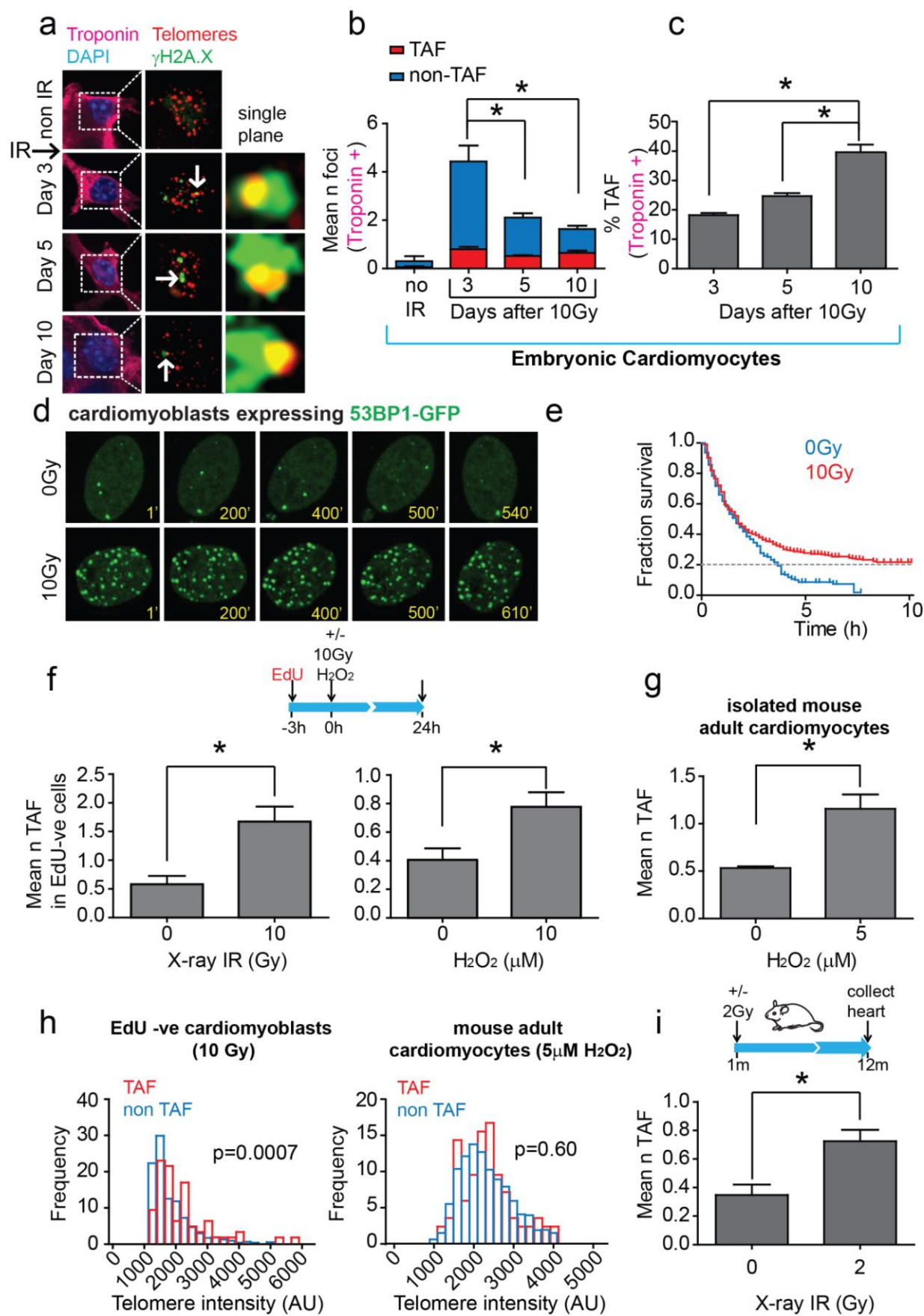


Figure 2 Stress-induced Telomere-Associated Damage is Persistent and occurs irrespectively of cell division.

(a) Representative images of mouse embryonic cardiomyocytes at days 0, 3, 5 and 10 days following 10Gy X-irradiation. Left panels represent troponin I-positive embryonic cardiomyocytes (troponin I – magenta; DAPI – light blue). Middle

panels display γ H2AX foci (green) and telomeres (red) in Z projections of 0.1 μ M slices, with white arrows indicating co-localisation. Co-localising foci are amplified in the right-hand panels (amplified images represent a single Z-plane where co-localisation was observed). **(b)** Mean number of both TAF and non-TAF in troponin I-positive mouse embryonic cardiomyocytes at days 0, 3, 5 and 10 following 10Gy X-irradiation. Data are mean $\pm$ S.E.M of $n=3$ independent experiments; 30-50 troponin positive cardiomyocytes were analysed per experiment. Statistical analysis performed using One-Way ANOVA (Holm-Sidak method); * $P<0.05$. Significant differences were found for mean number of non TAF, but not for mean number of TAF. **(c)** Mean percentage of γ H2AX foci co-localising with telomeres (% TAF) in troponin I-positive mouse embryonic cardiomyocytes at days 0, 3, 5 and 10 following 10Gy X-irradiation. Data are mean $\pm$ SEM of $n=3$ independent experiments. Statistical analysis performed using One-Way ANOVA (Holm-Sidak method); * $P<0.05$ **(d)** Representative time-lapse images of H9C2 rat cardiomyoblasts expressing AcGFP-53BP1 from 3 days after 10Gy irradiation at the indicated times (mins). Images are maximum intensity projections with a 6.7 μ M focal depth. **(e)** Kaplan-Meyer survival curves for AcGFP-53BP1c DDR foci in H9C2 cells 3 days after 10Gy irradiation at 10 minute intervals for 24 hours. >500 foci from 10 cells were tracked per condition. Gehan-Breslow Test was used $P<0.001$. **(f)** Schematic illustration depicting H9C2 cells were incubated in 10 μ M EdU in normal growth medium for 3 hours, followed by either 10Gy X-irradiation or incubation with 10 μ M H₂O₂ and cultured for a further 24 hours in the presence of 10 μ M EdU in normal growth medium. Mean number of TAF in EdU positive cells following X-irradiation (left graph) or H₂O₂ (right graph). Data are mean $\pm$ SEM of $n=3$ independent experiments. 50 cells were analysed per experiment. Statistical analysis performed using two-tailed t test; * $P<0.05$. **(g)** Mean number of TAF in isolated mouse adult cardiomyocytes 24hr after treatment with 5 μ M H₂O₂. Data are mean $\pm$ SEM of adult cardiomyocytes isolated from 3 month-old C57BL/6 wild-type mice. Statistical analysis performed using two-tailed t test; * $P<0.05$. **(h)** Histograms representing qFISH analysis comparing individual telomere intensities of telomeres either co-localising (TAF) or not co-localising (non-TAF) with γ H2AX DDR foci in 10Gy irradiated EdU-negative H9C2 cardiomyoblasts (left graph) or 5 μ M H₂O₂ treated mouse adult cardiomyocytes from 3 month-old C57BL/6 wild-type mice ($n=3$ mice). More than 100 cells were analysed per experiment. Statistical analysis performed using Mann Whitney test. **(i)** Schematic illustration showing 1 month old C57BL/6 mice were treated with 2Gy whole body X-irradiation, followed by a recovery period of 11 months before culling at 12 months of age. Mean number of TAF in α -actinin positive cardiomyocytes. Data are mean $\pm$ SEM of $n=3$ mice per group. 90 α -actinin positive cardiomyocytes were quantified per condition. Statistical analysis performed using two-tailed t test; * $P<0.05$.

Telomere-specific DNA Damage Drives a Senescent-like Phenotype

Having demonstrated that TAF increase with age and can be induced due to stress, we then tested if telomere-specific damage could directly drive a senescent-like phenotype in the cardiomyocyte lineage. To this end, we transfected cardiomyoblasts with an endonuclease that specially targets telomeres (a TRF1-FokI fusion protein¹⁸). Following 5 days of culture, numerous DNA damage foci were observed with the significant majority of damage co-localising with telomeres (**Figure 3a & b**). Telomeres were targeted by the endonuclease irrespective of their length, similarly to what was observed with spontaneous TAF formation *in vivo* (**Figure 3c**). *De novo* TAF formation induced a senescent phenotype in cardiomyoblasts characterised by, in addition to TAF, a significant decrease in the proliferation marker Ki-67, upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and SA- β -Gal activity, as well as increased cellular hypertrophy (**Figure 3d & e**). These data show that length independent telomere damage induces senescence in cardiomyoblasts.

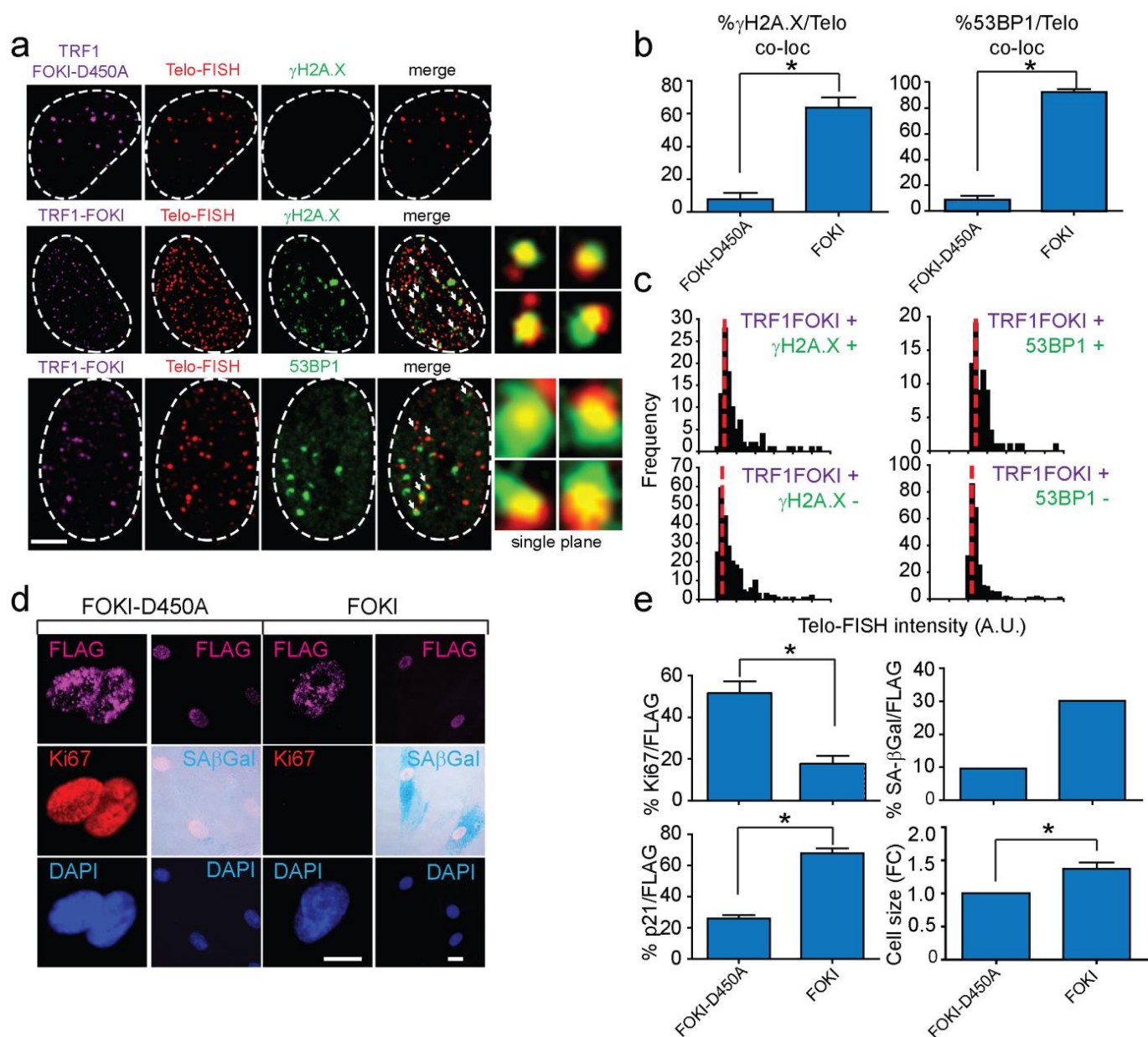


Figure 3 TRF1-FokI Fusion Protein Induces Telomere Specific Double Strand Breaks and senescence in cardiomyoblasts.

(a) Representative images of H9C2 cardiomyoblasts 4 days following transfection with a FLAG-tagged TRF1-FokI-D450A (top row) or TRF1-FokI (middle and bottom row) fusion protein (cell treatments the same for all subsequent panels in figure) (purple – FLAG; red – telo-FISH; green – γ H2A.X/53BP1). Images are z-projections of 0.1 μ M stacks taken with 100X objective. White arrows indicate co-localisation between telomeres and γ H2A.X/53BP1, with co-localising foci amplified in the right panels (taken from single z-planes where co-localisation was found). Scale bar represents 25 μ m. **(b)** Percentage of γ H2A.X (left) or 53BP1 (right) foci co-localising with telomeres. Data are mean $\pm$ SEM of n=3 independent experiments. More than 50 cells were analysed per condition. Statistical analysis was performed by two-tailed t-test * P<0.05. **(c)** Histograms displaying telomere intensity for telomeres co-localising (bottom) or not co-localising (top) with γ H2AX (left) or 53BP1 (right) DDR foci. Red dotted lines represent median. Statistical analysis performed using two tailed t test; * P<0.05; More than 50 cells were analysed per condition. Mann-Whitney tests show no significant difference in telomere intensity between TAF and non-TAF, with either γ H2A.X (left) or 53BP1 (right) DDR foci. **(d)** Representative images of detection of senescent markers (purple – FLAG; red – Ki-67; light blue – DAPI; darker cytoplasmic blue – SA- β -Gal). Scale bar represents 100 μ m. **(e)** Mean percentage of FLAG-positive cells positive for Ki-67, p21, SA- β -Gal activity and cell size. Data are mean $\pm$ SEM of n=3 independent experiments. More than 100 cells were quantified per condition. For SA- β -Gal data are presented as mean of >100 cells representative of 1 experiment. Two additional independent experiments confirmed these findings (not shown). Statistical analysis performed using two tailed t test; * P<0.05.

Aged cardiomyocytes activate senescent pathways but not a typical SASP.

Within the heart, cardiomyocytes comprise only approximately 30% of the total cells¹⁹. To overcome this heterogeneity and obtain an accurate representation of the cardiomyocyte transcriptome during ageing, we devised a new method for isolation of an enriched population of cardiomyocytes. In short, we conducted a retrograde *Langendorff* perfusion for dissociation of cardiomyocytes, followed by removal of CD31+/CD45+/Scal+ interstitial cells *via* magnetic bead sorting (**Figure 4a**). This method allowed us to obtain a highly enriched cardiomyocyte population (**Extended Data Figure 5a**). qRT-PCR quantification of mRNAs encoding the cyclin-dependent kinase inhibitors p16^{INK4a}, p21^{CIP}, and p15^{INK4b} in 3 and 20 month old animals demonstrated an age-dependent increase in expression of all three genes (**Figure 4b**). Immunohistochemistry on tissue sections from ageing mice validated the increase of p21^{CIP} at the protein level, specifically in cardiomyocytes (**Figure 4c**). Furthermore, we detected increased activity of Senescence-associated- β -Galactosidase (SA- β -Gal) in old mice (**Figure 4d**). While SA- β -Gal positivity was rare, we could detect it in cardiomyocytes but no other cell-types from old mice. We also observed in cardiomyocytes by centromere FISH an age-dependent increase of Senescence-associated distension of satellites (SADS), a characteristic of senescence²⁰ (**Figure 4e**).

Global transcription analysis of cardiomyocyte populations isolated from 5 young (3 month old) and 5 old (20 month old) animals by RNA-sequencing revealed 416 genes to be significantly differentially expressed between young and old (**Extended Data Figure 5b**). Principal component analysis revealed that both cohorts separate well with the first and second components, accounting for 80.1% and 7.8% of the cumulative variance across the data-set.

Consistent with very low proliferation rates in cardiomyocytes *in vivo*, we did not observe any significant changes in the expression of proliferation genes (**Extended Data Figure 5d**). On the other hand, genes involved in the regulation of myofilaments, contraction, and cardiomyocyte hypertrophy were enriched in old mice (Myh7, Capn3, Ankrd1, Myom3, Myot, Mybpc2) (**Extended Data Figure 5e**).

Interestingly, pro-inflammatory genes associated with the SASP²¹ such as Il1a, Il1b, Il6, Cxcl1 and Cxcl2 were not differentially expressed between cardiomyocytes from young and aged animals (**Figure 4f**). In order to determine if SASP factors were secreted by cardiomyocytes, we collected conditioned medium from isolated cardiomyocytes from young and old mice. In accordance with the RNA-seq results, we did not find any significant differences in the levels of secreted proteins using a cytokine array that included 32 pro-inflammatory cytokines and growth factors previously reported in senescence (**Figure 4f**).

Our data are in contrast with a previous report that shows increased expression of SASP components in murine heart with age using whole heart homogenates²². We therefore compared the expression previously reported SASP components in non-purified and purified cardiomyocyte populations. Consistently, we found that following a simple *Langendorff* heart perfusion that collects a heterogeneous population of cardiomyocytes and stromal cells, we observed significant differences in expression of SASP components such as Il-6 and Cxcl1 between young and old mice (**Extended Figure 6a**). However the population of purified cardiomyocytes demonstrated no such differences, suggesting that other cell-types other than cardiomyocytes could explain previous observations (**Extended Figure 6a**). Interestingly, we found that 3 secreted proteins, not commonly categorised as SASP components, were significantly increased at the mRNA level in aged purified cardiomyocytes: Edn3, Tgfb2, and Gdf15. Of these, only Edn3 was increased exclusively in aged cardiomyocytes, suggesting that it may play an important role in cardiac ageing (**Extended Figure 6 b-d**). The SASP has been shown to impact on proliferation of neighbouring cells, ultimately inducing senescence²³. Consistently, we found that conditioned medium isolated from old adult cardiomyocytes reduced proliferation of young adult fibroblasts (measured by EdU incorporation) (**Extended Figure 6e**). We conclude that aged cardiomyocytes *in vivo* activate a number of senescent effector pathways, including hypertrophy and a non-typical SASP.

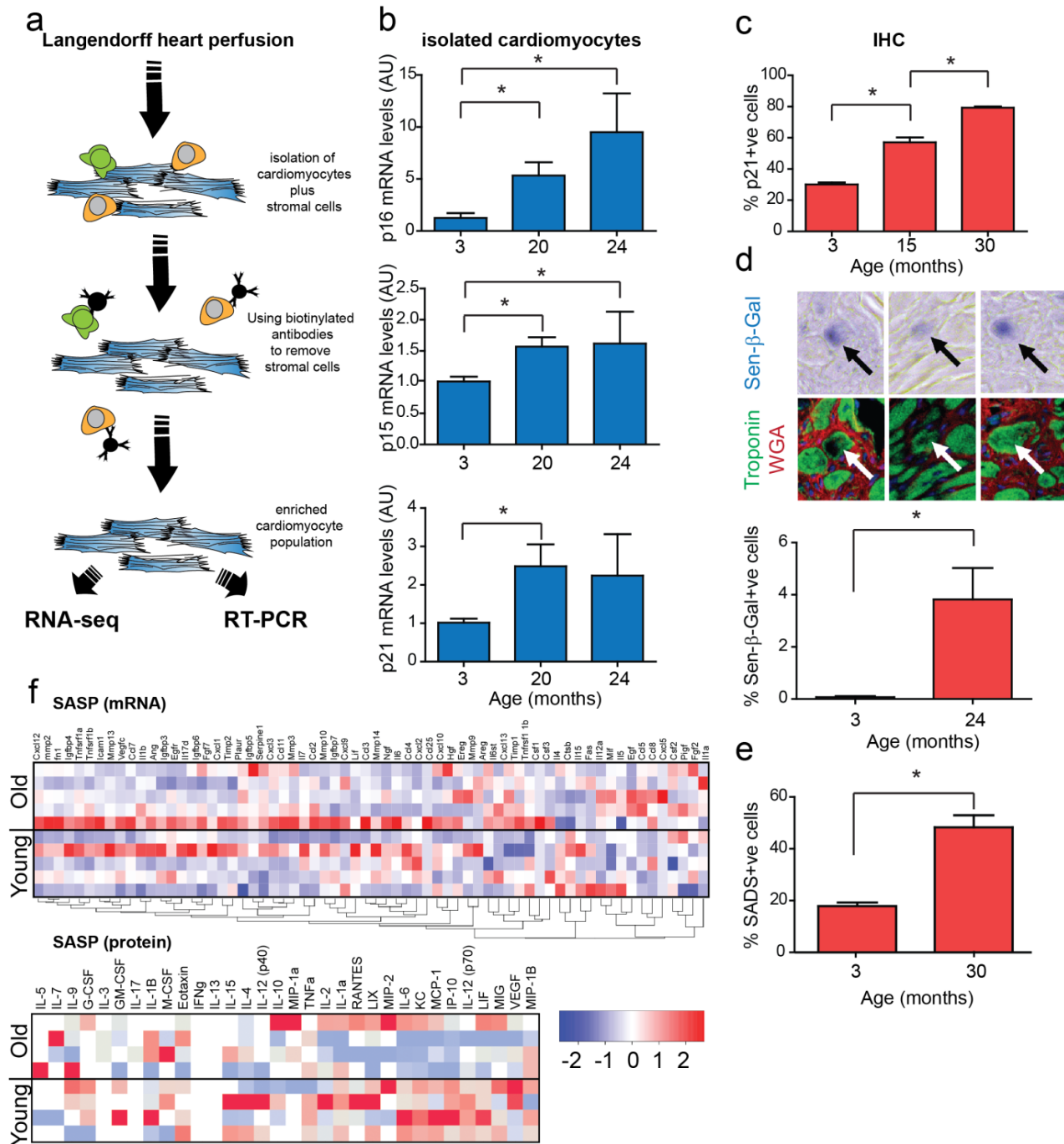


Figure 4 Aged cardiomyocytes activate senescent pathways but not the SASP.

(a) Schematic illustrating cardiomyocyte isolation procedure. (b) Real-time PCR gene expression analysis in isolated mouse cardiomyocytes from C57BL/6 mice. Data are mean $\pm$ SEM of $n=3-4$ per age group. Statistical analysis performed One-Way ANOVA (Holm-Sidak method); * $P<0.05$. (c) Mean percentage of p21-positive cardiomyocyte nuclei from 3, 15 and 30 month old C57BL/6 mice by Immuno-histochemistry (IHC). Data are mean $\pm$ SEM of $n=4$ per age group. >100 cardiomyocytes were quantified per age group. Statistical analysis performed using One-Way ANOVA (Holm-Sidak method); * $P<0.05$. (d) Mean percentage of 3 and 24 month old mouse cardiomyocytes staining positive for SA-β-Gal *in vivo* with representative images above (blue – SA-β-Gal; green – Troponin C; red – WGA). Statistical analysis performed using two-tailed t-test * $P<0.05$. Data obtained from the analysis of >500 cardiomyocytes per mouse, 4 mice per age group. (e) Mean percentage of SADS-positive cardiomyocyte nuclei from 3 and 30 month old mouse cardiomyocytes positive for SADS *in vivo*, as detected by centromere-FISH. Data are mean $\pm$ SEM of $n=4$ per age group. More than 200 cardiomyocytes per age group were quantified. Statistical analysis performed using two-tailed t-test * $P<0.05$. (f) SASP Heatmap: Pearson correlation clustered heatmap showing a curated list of known SASP genes (top panel) or a selection of secreted SASP proteins (bottom panel) in young (3 months) and old (20 months) mouse cardiomyocytes ($n=5$ per age group). The colour intensity represents column Z-score, where red indicates highly and blue lowly expressed.

Mitochondrial ROS drives TAF in Mouse Cardiomyocytes *in vivo*

Mitochondrial dysfunction has been described as both a driver and consequence of cellular senescence^{16,24,25}. Interestingly, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of RNA-seq data from isolated cardiomyocytes from young and old mice revealed that the most negatively enriched Gene ontology term is the mitochondrial inner membrane (**Extended Data Figure 7a**). Consistently, in cardiomyocytes from old mice we observed an overall decline in expression of most mitochondrial genes, particularly those genes involved in the Electron Transport Chain (ETC) (**Figure 5a**) and mitochondrial ultrastructural defects by transmission electron microscopy (**Extended Figure 7b**). We then speculated whether mitochondrial ROS could be a driver of telomere dysfunction in cardiomyocytes *in vivo*. Previous data indicate that mitochondrial ROS can drive telomere shortening *in vitro*²⁴ and that telomere regions are particularly sensitive to oxidative damage¹². Consistent with this hypothesis, we found increased mRNA expression of the pro-oxidant enzyme monoamine oxidase A (MAO-A) and decreased expression of antioxidant enzymes mitochondrial MnSOD and catalase in isolated cardiomyocytes from old mice (**Figure 5b**). Furthermore, we found increased lipid peroxidation marker, 4-HNE, and DNA oxidation marker, 8-oxodG, in cardiomyocytes with age (**Figure 5c**). To address whether these age-associated changes are causal in TAF induction, we utilised a model of cardiomyocyte-specific overexpression of MAO-A (MHC-MAO-A tg)²⁶. In this transgenic mouse model, both the mean number and percentage of cardiomyocytes positive for TAF were significantly increased compared to age matched controls (**Figure 5d**) and mice displayed cardiac dysfunction and hypertrophy (**Extended Figure 7c**). Critically, when transgenic animals were treated with the antioxidant N-acetyl cysteine (NAC), both the increase in TAF (**Figure 5d**) and cardiac dysfunction was significantly rescued (**Extended Figure 7c**). Complementary studies in old MnSOD^{+/-} and Catalase^{-/-} mice also revealed that these had a higher number of TAF than aged-matched controls (**Figure 5e & f**). Furthermore, we found a significant increase in TAF in cardiomyocytes from Polg^{mut/mut} mice, a model of accelerated ageing due to mitochondrial dysfunction (**Figure 5g**). Increased telomere dysfunction was associated with increased expression of p21, cardiac hypertrophy, and decreased expression of mitochondrial proteins (**Extended Figure 7d**). Finally, treatment of isolated adult cardiomyocytes with rotenone, a mitochondrial complex I inhibitor, induced TAF, which could be rescued by treatment with antioxidant NAC (**Figure 5h**). In summary, cardiomyocytes from aged heart exhibit down regulation of mitochondrial inner membrane and electron transport genes, and this is associated with indicators of increased ROS metabolism that is causative of telomere-associated DNA damage.

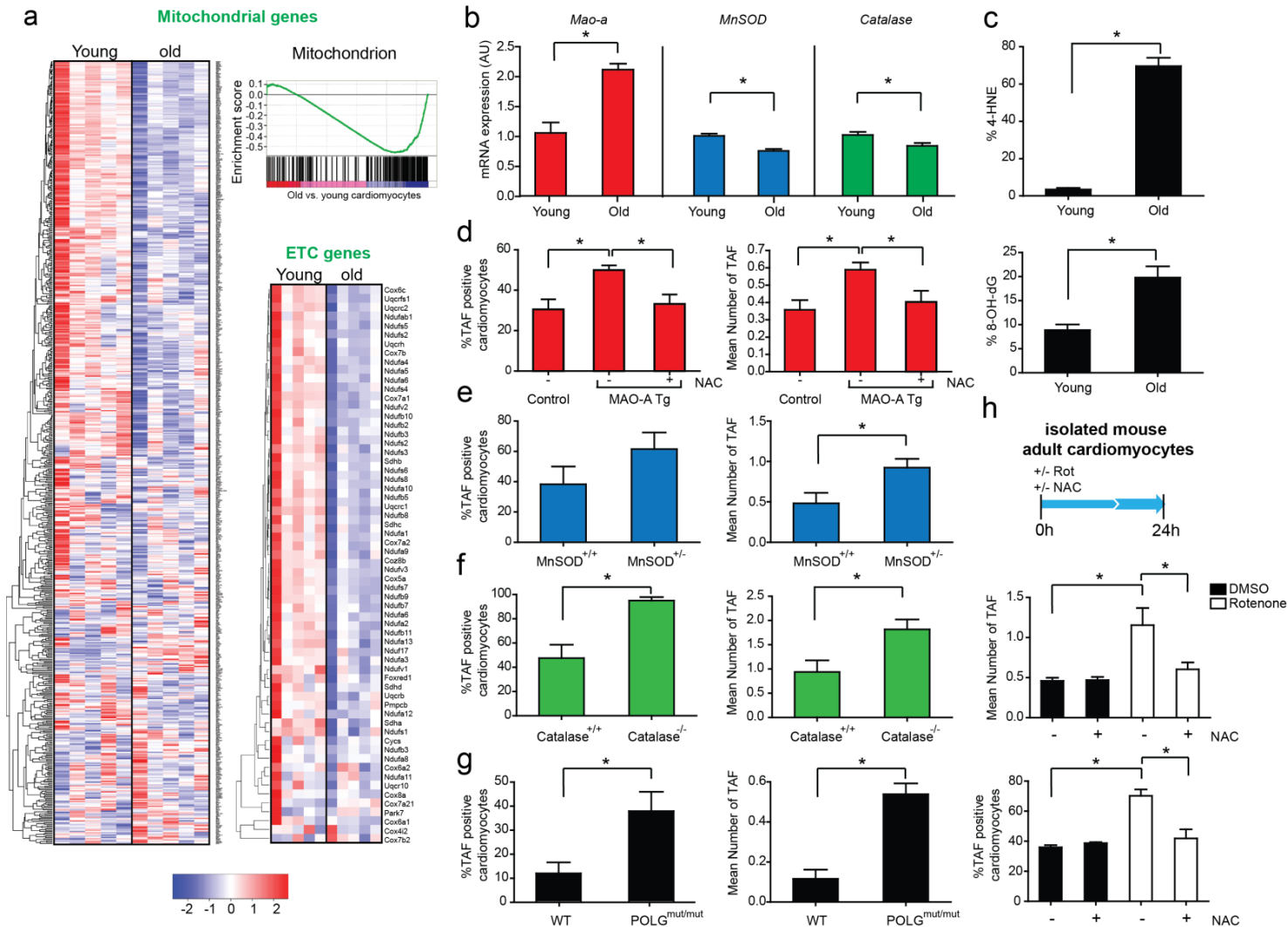


Figure 5 Mitochondrial dysfunction is a feature of cardiomyocyte senescence and drives TAF in Mouse Cardiomyocytes *in vivo*

(a) Mito and ETC genes with GSEA analysis: Clustered heatmap showing all genes associated with the "Mitochondrion" GO term in young and old, mouse cardiomyocytes as observed by the GSEA pre-ranked list enrichment analysis (normalised enrichment score: -1.70; FDR q-value < 0.05). Alongside this is a column clustered heatmap displaying a list of genes from the electron transport chain (ETC) GO ontology. In both instances genes are by column and samples by row with the colour intensity representing column Z-score, where red indicates highly and blue lowly expressed. **(b)** Real-time PCR gene expression analysis of MAO-A, MnSOD and catalase in isolated mouse cardiomyocytes from young (3 months) and old (20 months) mice. Data are mean $\pm$ SEM of $n=4-5$ per age group. Asterisks denote a statistical significance at $P < 0.05$ using two-tailed t-test. **(c)** Mean percentage of 4-HNE- (top) or 8oxodG- (bottom) positive cardiomyocytes from 3 month (young) or 30 month (old) aged mice. Data are mean $\pm$ SEM of $n=4$ per age group. 100 cardiomyocytes were quantified per age group. Asterisks denote a statistical significance at $P < 0.05$ using two-tailed t-test.

(d-g) Mean percentage of TAF-positive nuclei (left graphs) or mean percentage of TAF (right graphs) in wild-type (control) compared to MAO-A transgenic mice with or without drinking water supplemented with 1.5g/kg/day NAC from the age of 4 to 24 weeks, *MnSOD*^{+/+} vs *MnSOD*^{-/-}, *Catalase*^{+/+} vs *Catalase*^{-/-}, WT vs *POLG*^{mut/mut} mice. Data are mean $\pm$ S.E.M of $n=3-4$ per group. 100 cardiomyocytes were quantified per age group. Statistical analysis was performed using two-tailed t test or One-way ANOVA (for multiple comparisons); * $P < 0.05$. **(h)** Schematic depicting isolated mouse adult cardiomyocytes isolated from 4 animals were treated with or without 100nm rotenone either in the presence of 5mM NAC or vehicle control (pre-treated for 30 minutes before rotenone treatment), for 24 hours before fixation. Mean number of TAF (top graph) and mean percentage of TAF-positive nuclei (bottom graph) from 4 separate cardiomyocyte cultures isolated from 3 month-old mice. 50 cardiomyocytes were quantified per condition. Asterisks denote a statistical significance at $P < 0.05$ using One-way ANOVA (Holm-Sidak method).

Clearance of p16^{ink4} positive cells reduces cardiac hypertrophy

Cardiac hypertrophy occurs with ageing. Furthermore, it accompanies diseases such as ischemia, hypertension, valvular disease, and heart failure. In order to determine cardiac function with ageing in mice we used Magnetic Resonance Imaging (MRI). We found no significant difference in cardiac function (ejection fraction). However, we observed an increased mean left ventricle mass (mean of Diastolic and Systolic mass) indicative of hypertrophy and increased ventricle wall rigidity, indicative of a decline in diastolic dysfunction, both of which are documented characteristics of cardiac ageing in humans and mice ²⁷(**Figure 6a and b**). Previously, we showed that specific induction of TAF was associated with increased cell size in cardiac myoblasts *in vitro* and that ROS induced TAF induced cardiomyocyte hypertrophy *in vivo*. Consistent with a role for TAF-induced senescence in age-dependent cardiac hypertrophy, we found that larger cardiomyocytes from old mice had generally increased TAF frequencies (**Figure 6b**). In order to determine if there is a causal relationship between senescence and cardiac hypertrophy, we used the INK-ATTAC mouse model, in which a small molecule, AP20187 (AP), induces apoptosis through dimerization of FKBP-fused Casp8. Using this model, it has previously been shown that clearance of p16-expressing cells improves multiple parameters of physical health and function within ageing mice²⁸⁻³¹

In order to establish if elimination of p16^{ink4a} positive cells reduced TAF in cardiomyocytes, we aged INK-ATTAC mice until they were 27 months old and treated them with AP for 2 months (**Figure 6c**). We confirmed by RNA-*in situ* hybridization that both p16 and eGFP positive cells were significantly reduced in hearts following AP treatment (**Figure 6d**). Additionally, we found that TAF in cardiomyocytes were significantly reduced (**Figure 6e**), however, we failed to detect any differences in telomere FISH signals between INK-ATTAC mice with or without clearance of p16-positive cells (**Figure 6f**). Consistent with a role for cardiomyocyte senescence in age-dependent cardiac hypertrophy, we found that AP treatment significantly reduced the area of cardiomyocytes (**Figure 6g**). Similar results were observed in a model of cardiac hypertrophy induced by thoracic irradiation. We found that TAF induced by thoracic irradiation in INK-ATTAC mice were restored to the levels found in sham irradiated mice following AP treatment (**Extended Figure 8a-c**). Similarly, we found that irradiation resulted in cardiomyocyte hypertrophy and this was completely rescued by elimination of p16^{ink4a} positive cells (**Extended Figure 8d**).

To further investigate the therapeutic impact of targeting senescent cells to counteract cardiac ageing, we treated aged wild-type mice with the previously described senolytic drug, navitoclax¹¹. We

found that navitoclax reduced TAF and hypertrophy in cardiomyocytes (**Extended Figure 8e-f**) and selectively killed senescent cardiomyoblasts *in vitro* (**Extended Figure 8i and l**). Altogether our data shows that p16-expressing cells are responsible for senescence induced cardiac hypertrophy.

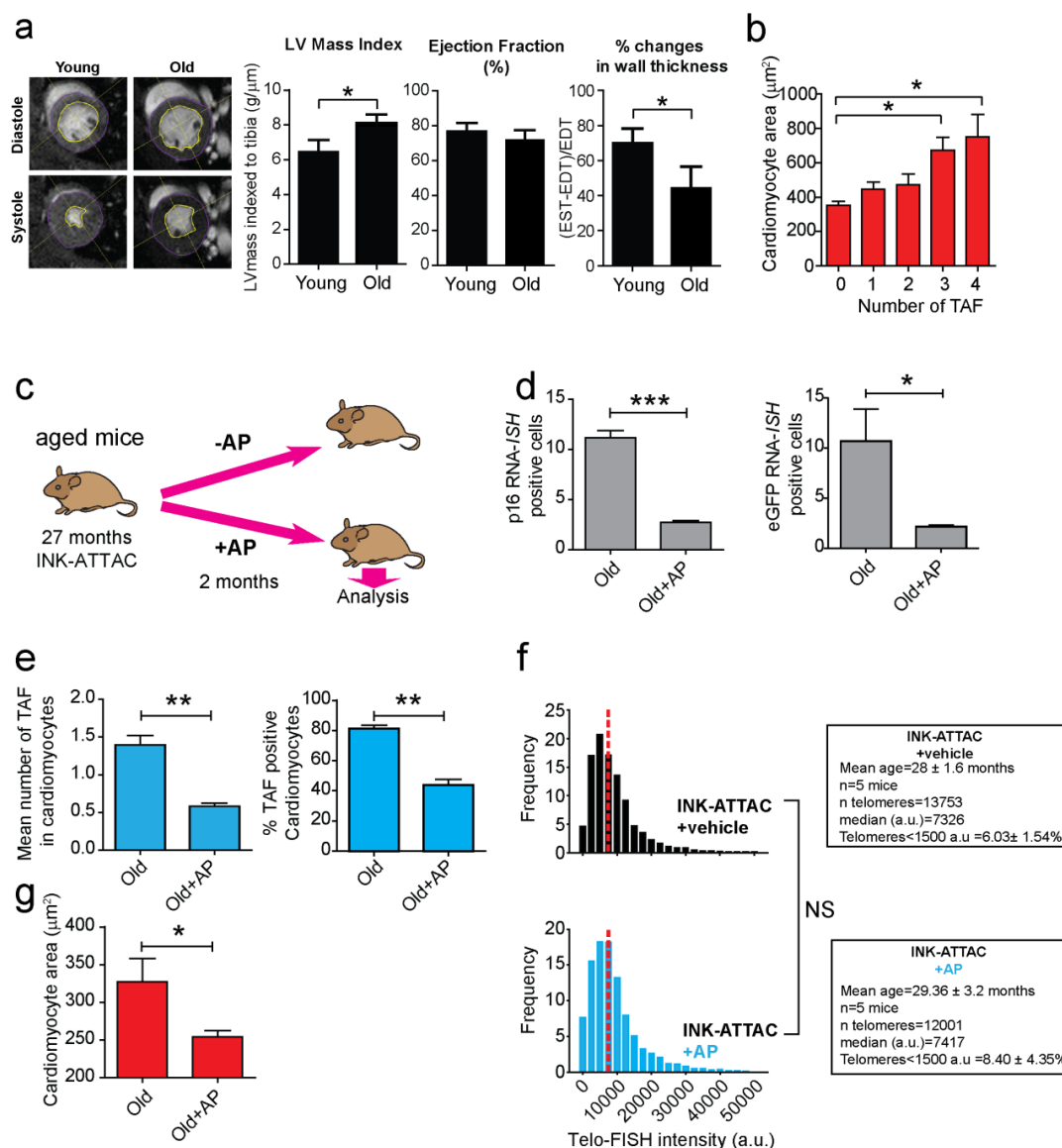


Figure 6 Clearance of p16 positive cells in old mice reduces cardiac hypertrophy and telomere dysfunction without affecting telomere length.

(a) Examples of individual short axis cine-MR images of 3 or 20 m mouse hearts. Ejection fraction and LV thickness was calculated based on manual measurements of Left ventricle epicardial and endocardial borders. Percentage change wall thickening calculation based on wall thickness at the 4 points as indicated. Measurements were made in all cine slices at end diastole and end systole. Graphs representing data obtained from MRI analysis of >7 animals per age group. Data are mean $\pm$ S.E.M. Asterisks denote a statistical significance at $P < 0.05$ using two tailed t-test. **(b)** Comparison between mean number of TAF per cardiomyocyte and cardiomyocyte area in 22 month old animals. Data are mean $\pm$ S.E.M. of $n=4$. 100 cardiomyocytes were quantified per age group. Asterisks denote a statistical significance at $P < 0.05$ using one-way ANOVA. **(c)** Schematic depicting experimental design for figures d-f: 27 month old INK-ATTAC mice were treated 4 times with AP20187 (or Vehicle), 3 days in a row, every 2 weeks (2m-long treatment in total) and were sacrificed afterwards for analysis. **(d)** Comparison between the number of p16- or -eGFP positive cardiomyocytes by RNA-*in situ* hybridization per plane (40x objective) in INK-ATTAC mice (28-29m old) treated with vehicle or AP20187. Data are mean $\pm$ SEM of $n=5$ per age group. >200 cardiomyocytes were analysed per condition. Asterisks denote a statistical significance at $P < 0.05$ using two-tailed t-test. **(e)** Mean number of TAF (left graph) and mean percentage of TAF-positive nuclei (right graph) in cardiomyocytes. Data are mean $\pm$ S.E.M. of $n=6$ per age group. >100 cardiomyocytes were analysed per condition **(f)** Histograms showing distribution of individual telomere intensities measured by Q-FISH in INK-ATTAC mice (28-29m old) treated with vehicle or AP20187. >150 cardiomyocytes were analysed per condition. **(g)** Mean cardiomyocyte area μm^2 . Data are mean $\pm$ S.E.M. of $n=6$ per age group, >150 cardiomyocytes analysed per condition. Asterisks denote a statistical significance at $P < 0.05$ using two-tailed t test or Mann Whitney test.

Discussion

Recent studies have implicated ROS-induced DNA damage in the transition of cardiomyocytes from proliferative embryonic to postnatal post-mitotic cells³². Consistent with this, we found most cardiomyocytes from adult mice contain non-telomeric DNA damage foci throughout their lives, which remain fairly constant. While this DNA damage is sufficient to inhibit cell cycle activity, it is of a reversible nature, since adult cardiomyocytes still possess the ability, albeit limited, to regenerate in response to injury³³ and reduced DNA damage by decreased oxidative stress is sufficient to permit cell cycle re-entry of adult cardiomyocytes³⁴. Surprisingly, during the ageing process and despite low level of proliferation, we observe enrichment of DDR proteins at telomere regions, notoriously known for their inefficient repair capacity, fuelled by the actions of telomere binding proteins. For instance, displacement of TRF2 from telomeres has been shown to result in ligase IV dependent telomere fusions^{35,36,37} and TRF2 and its binding partner RAP1 have been shown to prevent NHEJ-dependent telomeric DNA fusions by inhibiting DNA-PK and ligase IV mediated end-joining³⁸. In contrast, homologous recombination can repair telomere-induced DNA damage, however this process is restricted to proliferating cells undergoing S-phase and therefore not likely to be relevant for post-mitotic cardiomyocytes³⁹. As such, within cardiomyocytes, a cocktail of age-dependent mitochondrial dysfunction and oxidative stress coupled with lack of regenerative capacity, fuels the occurrence of irreparable telomere-associated damage, which may instigate a senescent-like phenotype (**Extended Data Figure 9**). In fact, our data provide the first demonstration that with age, changes in oxidative stress induced by impaired antioxidant defences, cardiomyocyte-specific expression of pro-oxidant enzymes, or increased mtDNA mutation burden, contribute directly to age-dependent telomere-associated DNA damage in cardiomyocytes. This persistent form of DNA damage occurs independently of cell-division and telomere length. Another factor that could impact on telomere maintenance during ageing is the activity of the enzyme telomerase, however, previous data indicate that telomerase activity is present in some differentiated cardiomyocytes during development and absent in uninjured adult cardiomyocytes⁴⁰. Additionally, in whole heart lysates we failed to observe any age-dependent changes in telomerase activity, so we postulate that it is unlikely that it plays a role in the process.

While our data indicate that mitochondrial dysfunction and ROS can induce cardiomyocyte senescence, it remains entirely possible that the observed age-dependent changes in mitochondrial gene expression and morphology are a consequence of telomere dysfunction. In mouse models of

accelerated telomere shortening, critically short telomeres have been shown to repress PGC1- α and β mediated mitochondrial biogenesis^{14,41}. However, increased mitochondrial ROS driven by telomere dysfunction has been shown to induce DNA damage and activate a DDR in a positive feedback loop, making it experimentally complex to unravel which is the initiating step in the process^{16,25}.

Our model explains the role of telomeres in ageing mice, considering that mice have much longer telomere length than humans; no age-dependent changes in telomerase activity; and that telomerase knock-out models require breeding over multiple generation to experience myocardial dysfunction⁷.

There is still uncertainty regarding the physiological role of cardiomyocyte senescence during the ageing process. Two previous studies have reported that cardiomyocytes with age become positive for p16^{42,43}, however, both studies relied on an antibody that we and others⁴⁴ could not validate. Also, beneficial effects of clearance of senescent cells in murine ageing heart have been attributed to senescent cells in proliferation-competent cells such as fibroblasts and epithelial cells present in the pericardium or vascular smooth muscle cells in the aorta²⁸. Previous studies have also proposed a role for telomere shortening in cardiomyocyte senescence: short telomeres have been observed in aged murine cardiomyocytes⁴² and mouse models of accelerated telomere shortening have cardiac dysfunction¹⁴. However, whether short telomeres *per se* are causal in cardiomyocyte senescence during natural ageing has not been determined. Our data suggest that telomere length is not a limiting factor in cardiomyocyte senescence since: i) specific elimination of p16 positive cells in aged mice did not affect telomere length or the frequency of very short telomeres; ii), super-resolution STED microscopy that allowed the detection of very weak telomere FISH signals and more effectively resolved clustered telomere signals than conventional confocal microscopy, could not detect differences in FISH intensity between telomeres co-localizing and not with γ H2A.X. A possible experiment to test the impact of telomere length in cardiomyocyte senescence would be to overexpress the enzyme telomerase specifically in cardiomyocytes from old animals. However, this experiment would not eliminate the possibility that non-canonical functions of telomerase may impact on senescence independently from its effects on telomeres.

Key questions remain regarding the consequences of cardiomyocyte senescence. While telomere DNA damage in cardiomyocytes activates the classical senescence-inducing pathways, p21^{CIP} and p16^{INK4a}, cardiomyocytes do not express a typical senescence-associated secretory phenotype (SASP). In regenerative tissues such as the skin and liver, the SASP plays an important role in immune cell recruitment, clearance of senescent cells but also in the activation of a regenerative response^{45,46}. It is possible that telomere damage results in a persistent activation of the p53 pathway (a known downstream player in the DDR), which has been shown to inhibit NF- κ B activity (a major regulator of

the SASP). In fact, recently, it has been suggested that mitochondrial dysfunction may selectively inhibit some of the SASP components by activation of p53⁴⁷. We further report that other factors such as Edn3, Tgfb2 and Gdf15 may be released by senescent cardiomyocytes and induce bystander effects. Interestingly, TGF- β ligands have been shown to be involved in the induction of paracrine senescence in human fibroblasts²³.

Our data suggest that cardiomyocyte senescence results in hypertrophy, a feature of myocardial ageing, which can be restored by clearance of senescent cells. Myocardial hypertrophy was thought to occur throughout ageing as an adaptive mechanism to compensate for a net decline in cardiomyocyte number. However, recently this view has been challenged by the demonstration of the lack of significant changes in cardiomyocyte numbers with age¹⁰. Our data provide a new model to explain myocardial hypertrophy driven by telomere-induced cardiomyocyte senescence.

Altogether, this study provides evidence for the concept that cardiomyocyte senescence is a major effector of myocardial ageing and offers a proof-of-principle that modulation of cardiac senescence is a viable treatment strategy. While described in myocytes, we speculate that our proposed mechanism may explain post-mitotic senescence in other tissues such as neurones⁴⁸ and adipocytes⁴⁹.

Materials and Methods

Cell Culture and Treatments. Primary mouse cardiomyocytes were isolated from day 17.5 embryonic C75BL/6 mice and cultured in DMEM (SIGMA), Medium 199, 10% horse serum, 5% foetal calf serum, penicillin/streptomycin 100 U/ml, 2mM glutamine, at atmospheric conditions (air plus 5% CO₂). H9C2 rat heart-derived embryonic myocytes (ATCC) were cultured in DMEM (SIGMA), 5% foetal calf serum, penicillin/streptomycin 100 U/ml, 2mM glutamine, at atmospheric conditions (air plus 5% CO₂). Cells were always passaged prior to reaching 70% confluence. H9C2 rat heart-derived embryonic myocytes were transiently transfected with a 53BP1-GFP reporter protein using the plasmid pG-AcGFP-53BP1c using Lipofectamine 2000 (ThermoFisher) at a ratio of 3 μ L Lipofectamine 2000 to 1 μ g DNA following the manufacturer's protocol. H9C2 cells were transiently transfected with either TRF1-FokI-D450A or TRF1-FokI plasmids as described above. Cells were cultured for several days, according to experimental design, and transfected cells detected with an anti-FLAG antibody (SIGMA).

Stress-induced senescence was induced in H9C2 cells and embryonic cardiomyocytes by 10Gy X-ray irradiation. In both cell types, we observed senescence after 10 days using SA- β -Gal assay (>70% positive cells) and absence of proliferation marker Ki-67. H9C2 senescent or proliferating cells were

treated with ABT-263 (Navitoclax) (AdooQ Bioscience, USA) and viability was assessed using a Tali Image-Based Cytometer (Invitrogen).

For EdU incorporation assays, cells were incubated in 10 μ M EdU in normal growth medium for 24 hours. EdU was then detected using the Click-iT[®] EdU Imaging Kit (Invitrogen), according to manufacturers' protocol.

Animals and Procedures. C57BL/6 mice were used for ageing studies were analysed at either 3, 15, 20, 24, or 30 months of age. For whole body X-ray irradiation, 1 month old C57BL/6 mice were irradiated with 2Gy followed by 11 month recovery period before culling. *TERC*^{-/-} C57BL/6 male mice were bred to produce successive generations of mice with decreasing telomere length. Hearts from fourth-generation (G4) mice were collected. The project was approved by the Faculty of Medical Sciences Ethical Review Committee, Newcastle University (project license no. 60/3864).

Mouse models for elevated reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction: Catalase^{-/-} and MnSOD^{+/-} were aged until 22-24 months of age and mice with a knock-in missense mutation (D257A) at the second endonuclease-proofreading domain of the catalytic subunit of the mitochondrial DNA (mtDNA) polymerase Pol γ (*PolgA*^{mut/mut} mice) and age-matched *PolgA*^{+/+} mice were aged until 12 months. All mice were group-housed in individually ventilated cages with RM3 expanded chow provided by special diet services. Mice were kept in a room with a constant temperature of 25°C with a 12-hour light/dark cycle. Experiments were conducted in compliance with the UK Home Office (Reference P3FC7C606) and the Newcastle University Animal Welfare Ethical Review Board (Ethics number 425). MAO-A transgenic mice (MAO-A Tg) with cardiac-specific overexpression of MAO-A driven by the α -MHC promoter were previously described²⁶. This line was maintained by breeding of Tg MAO-A males with C57BL6/J females. MAO-A Tg offspring at 6 months of age and their NTg control littermates were used for the experiments. N-acetyl-cysteine was given at 1.5 g/kg/day between 1 month and 6 months of age. Mice were housed in a pathogen-free facility and all experiments were approved by the local ethic committee of the University of Toulouse **#CEEA-122 2015-01.** All investigations conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the Directive 2010/63/EU of the European Parliament.

Clearance of senescent cells. Based on concepts devised by JLK and TT, INK-ATTAC mice were subsequently made and characterized at Mayo in a collaboration among the JLK-TT, NKL, and van Deursen laboratories. Animals were crossed onto a C57BL/6 background in the van Deursen laboratory and bred, genotyped, and aged in the JLK-TT laboratory. Mice were housed at 2–5 mice per cage in a 12 h light/12 h dark cycle at 24 °C with free access to food (standard mouse diet, Lab

Diet 5053, St Louis, MO, USA) and water in a pathogen-free facility. AP20187 (10 mg/kg) or vehicle was administered to 27-month-old mice by intraperitoneal injection every 3 days, for 2 months and were culled afterwards for analysis. *Senolytics*. C57BL/6 mice at approximately 22 months of age were mice were purchased from Charles River (Charles River Laboratories International, UK). Mice were randomly assigned to a treatment group. ABT263 (navitoclax) or vehicle alone was administered to mice by gavage at 50 mg/kg body weight per day (mg/kg/d) for 7 d per cycle for two cycles with a 1-week interval between the cycles. Mice were allowed to recover for 1 additional week and hearts were collected directly into 40 mM KCl to arrest in diastole.

Thoracic Irradiation. A TrueBeam linear accelerator (Varian Medical Systems, Palo Alto) was used for the mouse studies. Anesthetized INK-ATTAC mice (2 months of age) received a single, 20Gy radiation dose delivered to the thoracic region. The radiation beam was collimated to an area encompassing the mouse lungs and the radiation field positions on the mice were verified using kV-CBCT and 2D kV imaging of the animals prior to irradiation. The dose rate at the prescription point was 14.8 Gy/ min, using 89 cm source to the surface distance. Dose was prescribed to midline in the mice and was confirmed using film and ion chamber dosimetry. All mice prophylactically received 100 mg/ml Baytril antibiotic in their drinking water for 3 weeks post-irradiation. One month following irradiation, mice were randomized to AP20187 (10 mg/kg), delivered by intraperitoneal injection (treatments twice weekly) or vehicle groups. Body weight was monitored weekly. Mice were euthanized 6 months post-irradiation exposure using a lethal dose of pentobarbital. Animal experiments involving INK-ATTAC mice were performed under protocols approved by the Mayo Clinic IACUC.

Human Tissue Collection and Ethics. Human heart tissue was obtained from patients undergoing open heart surgery for aortic stenosis, with a section of the right atrial appendage being placed in 10% neutral buffered formalin (VWR, 9713.9010) immediately after dissection. Subsequent processing steps for paraffin embedding were the same as for mouse tissue (as described above). All tissue samples were obtained under the clause in the Human Tissue act that enables anonymised samples to be taken without consent in the context of an ethically approved study. This study was approved by the Research Ethics Committee UK, REC reference number: 10/H0908/56.

Live-Cell Imaging. For live-cell time lapse microscopy of 53BP1 reporter fluorescence, H9C2 cells were plated on glass coverslip bottomed dishes (MatTek), and cells were imaged every 10 minutes for 10 hours as Z-stacks over 7 μ m with a 63X objective (NA=1.4), using a Zeiss Spinning Disk confocal

microscope with cells incubated at 37°C with humidified 5% CO₂. AcGFP-53BP1 foci dynamics were analysed using Imaris Software.

Crosslinked Chromatin Immunoprecipitation Assay (ChIP). Crosslinked ChIP assay was carried out using 25µg crosslinked chromatin prepared from 3 or 30 month ground mouse heart tissue as described in (Mann *et al.*, 2010), using anti-γH2AX (phospho S139) (Abcam, ab2893) and species and isotype matched control ChIP grade IgG (Abcam, ab46540). Real-time PCR specific for telomeric repeats was performed as described in⁵⁰. Briefly, 4 µL of ChIP eluate was added to a final volume of 13 µl quantitative PCR reaction containing 6.5 µL Jumpstart SYBR master mix (Sigma) and 10pmol appropriate primer mix. Telomere PCR reaction conditions were: 10 seconds at 95°C followed by 40 cycles of 10 seconds at 95°C, 30 seconds at 55°C, and 30 seconds at 72 °C followed by ABI7500 Fast Real-Time PCR System machine predetermined melt curve analysis (Applied Biosystems). Each PCR reaction was performed in triplicate. All reactions were normalized to the control antibody and fold enrichment above background was calculated using the following equation: $(1/(2A)) \times 100$. The values were then adjusted to the values of total input and expressed as log to the base 2.

Cardiomyocyte Isolation and Purification.

Animals were anesthetized and hearts were removed and placed on the Langendorff setup. Myocytes were first obtained by enzymatic digestion and sedimentation and further purified using the EasySep™ Mouse Biotin Positive Selection Kit, which allowed removal of CD31, SCA1 and CD45 positive cells. Purity of adult cardiomyocyte culture was confirmed by immunofluorescent staining against CD31, SCA1, CD45 and α-actinin. RNA from purified adult cardiomyocytes was extracted using Qiagen RNA extraction kit. Adult cardiomyocytes were cultured using MEM with Hank's salts and L-glutamine (SIGMA), 0.1mg/ml BSA, 10mM Butanedione monoxime, ITS Liquid Media Supplement (SIGMA). Wells were coated with laminin (0.01mg/ml).

MR Imaging and analysis. Magnetic resonance images were acquired using a horizontal bore 7.0T Varian microimaging system (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) equipped with a 12-cm microimaging gradient insert (40 gauss/cm) and analysed as described previously (Rachael E. Redgrave IJC Heart & Vasculature 2016). Percentage change in wall thickening was calculated from the mean of wall thickness at 4 points in all slices at end systole and end diastole thickness. % change = (EST-EDT)/EDT.

Embryonic Cardiomyocyte Isolation and Culture. Under sterile conditions, hearts were removed from E17.5 embryos and then cut into multiple fragments in cardiomyocyte balanced salt buffer (CBSB) (116mM NaCl, 20mM HEPES, 1mM NaH₂PO₄, 5.365mM KCl, 831nM MgSO₄). Heart fragments were then incubated in CBSB with 80U/ml collagenase type II (Worthington) for 5 minutes. Allowing fragments to settle, supernatant was removed and centrifuged at 700×g for 5 minutes. Remaining fragments were then re-suspended in cardiomyocyte enzyme solution (CBSB, 80 U/mL collagenase II and 0.25 mg/mL trypsin) for 30 minutes, with gentle shaking. Fragments were allowed to settle and then supernatant containing dissociated cells was removed and centrifuged at 700×g for 5 minutes, washed in FBS and stored at 4⁰C. Remaining fragments were then re-suspended as before into cardiomyocyte enzyme solution. After centrifugation, the supernatant was discarded and pellet was again re-suspended in 4°C FBS and placed on ice. Re-suspension, centrifugation and collection was then repeated until all fragments had been dissolved (7-10 cycles). All FBS suspensions were pooled together, centrifuged at 700 x g for 5 minutes. The supernatant was then discarded and cells re-suspended in cardiomyocyte growth medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), supplemented with 17% Medium 199, 5% FBS, 10% Horse serum (SIGMA, H0146), 100µg.ml⁻¹ streptomycin, 100 units.ml⁻¹ penicillin and 2mM l-glutamine). Cells were then seeded into a collagen-coated (1mg.ml⁻¹) T75 culture flask (SIGMA) and incubated at 37°C for 2 hours. After the incubation the supernatant, containing cardiomyocytes, was collected from the flask and the adherent fibroblasts discarded. Cardiomyocytes were then cultured in Cardiomyocyte Growth Medium.

Immunofluorescence. Cells were grown on sterile coverslips and fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes. Cells were permeabilised for 45 minutes in PBG-T (PBS, 0.4% Fish-skin Gelatin, 0.5% BSA, 0.5% Triton X-100). Cells were then incubated in primary antibody for 1 hour at room temperature, followed by incubation in secondary antibody for 45 minutes.

Primary antibodies used: rabbit monoclonal anti-γ-H2AX (1:200, #9718; Cell Signalling), rabbit polyclonal anti-53BP1 (1:200, #4937; Cell Signalling), mouse monoclonal anti-α-actinin (1:100, A7811; SIGMA), goat Poly-clonal anti-troponin I (1:200, Catalogue, Company), goat Poly-clonal anti-troponin C (1:200, Abcam ab30807), mouse monoclonal anti-PCM1 (1:200, ab154142; Abcam), mouse monoclonal anti-FLAG (1:1000, F1804; SIGMA), rabbit polyclonal anti-Ki67 (1:250 (4µg ml⁻¹), ab15580; Abcam)).

Secondary antibodies used: Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 594, or Alexa Fluor® 647 (Invitrogen). Membrane staining for hypertrophy quantification was performed with wheat germ agglutinin (WGA) labelling (Alexa Fluor® 647 conjugate, W32466, Invitrogen) as per manufacturer's instructions.

Assessment of hypertrophy was assessed by cross-sectional area using established methods as described⁵¹. Troponin C was used to identify cardiomyocytes and membranes labelled with WGA. Only cardiomyocytes in the left ventricle free wall were analysed and only in the areas in the sub-epicardium region. To control for tissue orientation only myocytes that were surrounded by capillaries all displaying a cross-sectional orientation were analysed.

Immuno-FISH and FISH. Immuno-FISH was performed as described⁵². Briefly, cells grown on coverslips were fixed with 2% paraformaldehyde, and immunocytochemistry was conducted as described above, with the use of either rabbit monoclonal anti- γ H2AX (1:200, 9718; Cell Signalling) or rabbit polyclonal anti-53BP1 (1:200, 4937; Cell Signalling). After incubation with secondary antibody, cells were washed with PBS and fixed with methanol: acetic acid (3:1) for 30 minutes. After PBS washes, cells were dehydrated through 70%, 90% and 100% ice-cold ethanol for 3 minutes each. Cells were then air-dried and incubated in 10 μ L PNA hybridisation mix (70% deionised formamide (SIGMA), 25mM MgCl₂, 1M Tris pH 7.2, 5% blocking reagent (Roche) containing 2.5 μ g/mL Cy-3-labelled telomere specific (CCCTAA) peptide nucleic acid probe (Panagene), inverted on a glass microscope slide, for 10 minutes at 80°C. Probe hybridisation was carried out by incubation in a humidifier chamber, for 2 hours at room temperature in the dark. Sections were then washed with 70% formamide in 2 $\times$ SSC for 10 minutes, 2 $\times$ SSC for 10 minutes and PBS for 10 minutes. Coverslips were then dehydrated through 70%, 90% and 100% ice-cold ethanol for 3 minutes each and then air dried. Coverslips were then mounted with ProLong[®] Gold Antifade Mountant with DAPI (ThermoFisher).

For immuno-FISH in formalin-fixed paraffin-embedded heart, muscle, and brain mouse tissues, sections were de-paraffinated and hydrated through 100% HistoClear (twice), 100% ethanol (twice), 95% ethanol, 70% ethanol and distilled water (twice) for 5 minutes each. Antigen retrieval was achieved *via* boiling samples for 10 minutes in 0.1M citrate buffer. Slides were allowed to cool and then washed in distilled water twice for 5 minutes each. Sections were then incubated in blocking reagent (1:60 Normal Goat Serum in PBS/0.1% BSA) for 30 minutes at room temperature, followed by incubation with primary antibody in blocking reagent overnight at 4°C. After 3 X 5 minute PBS washes, sections were incubated in biotinylated secondary antibody (1:200) in blocking reagent for 30 minutes at room temperature, followed by further 3 X 5 minute PBS washes, and then incubated in avidin-DCS (1:500) in PBS for 30 min. Cross-linking was then performed *via* incubation in 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min. After 3 X 5 minute PBS washes, FISH was carried out as described above. For centromere FISH (SADS detection) a FAM-labelled, CENPB-specific (centromere)

(ATTCGTTGGAAACGGGA) peptide nucleic acid probe (Panagene) was used. Frequency of SADS was assessed by quantification of decondensed/elongated centromeres.

Immunohistochemistry. De-paraffination, hydration and antigen retrieval of formalin-fixed paraffin-embedded heart tissues was performed as previously described. Sections were incubated with M.O.M mouse IgG blocking reagent (90 μ L blocking reagent: 2.5mL TTBS) for one hour at room temperature. After two times five minute PBS washes, sections were incubated with avidin for 15 minutes, rinsed with PBS, and then incubated with biotin for 15 minutes at room temperature. Primary antibody was then diluted in M.O.M diluents (7500mL TTBS : 600uL protein concentrate) and incubated overnight at 4°C. After 2 $\times$ 5 minute PBS washes, sections were incubated in biotinylated-mouse IgG reagent diluted in blocking solution (1:200) for 30 minutes at room temperature. After 2 $\times$ 5 minute PBS washes, endogenous peroxidase activity was blocked by incubating sections in 0.9% H₂O₂ in water for 30 minutes. After 2 $\times$ 5 minute PBS washes, sections were incubated in AB-Complex for 30 minutes at room temperature. After 3 $\times$ 5 minute PBS washes, sections were then incubated in NovaRed solution for up to 10 minutes, rinsed with water, counterstained with haematoxylin for 2 minutes, washed in PBS and then transferred to ammonia water for 30 seconds. After a 1 minute wash in water, sections were then dehydrated through 70%, 90% and 100% ethanol and then histoclear for 5 minutes each, Sections were then mounted with DPX.

Primary antibodies used: mouse monoclonal anti-4HNE (1:100, MHN; JaiCA), mouse monoclonal anti-8-OHdG (1:100, MOG; JaiCA), rabbit polyclonal anti-p21 (1:200, ab7960; Abcam).

RNA *in situ* hybridization. RNA-ISH was performed after RNAscope protocol from Advanced Cell Diagnostics Inc. (ACD). Paraffin sections were deparaffinised with Histoclear, rehydrated in graded ethanol (EtOH) and H₂O₂ was applied for 10 min at RT followed by two washes in H₂O. Sections were placed in hot retrieval reagent and heated for 30 min. After washes in H₂O and 100% EtOH, sections were air dried. Sections were treated with protease plus for 30 min at 40 °C, washed with H₂O and incubated with target probe (p16, eGFP) for 2 h at 40 °C. Afterwards, slides were washed with H₂O followed by incubation with AMP1 (30 min at 40 °C) and next washed with wash buffer (WB) and AMP2 (15 min at 40 °C), WB and AMP3 (30 min at 40 °C), WB and AMP4 (15 min at 40 °C), WB and AMP5 (30 min at RT) and WB and, finally, AMP6 (15 min at RT). Finally, RNAscope 2.5 HD Reagent kit-RED was used for chromogenic labelling. After counterstaining with haematoxylin, sections were mounted and coverslipped.

Senescence-Associated β -Galactosidase Activity Assay. SA- β gal activity assay was performed as described previously⁵³. For *in vitro* studies cells were grown on sterile coverslips and for *in vivo* studies samples were cryo-embedded and staining performed on 10 μ m sections. Samples were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 5 minutes, washed with PBS for 5 minutes and then incubated at 37°C overnight in SA- β gal solution containing 150mM sodium chloride, 2mM magnesium chloride, 40mM citric acid, 12mM sodium phosphate dibasic, 5mM potassium ferricyanide, 5mM potassium ferrocyanide and 1mg ml⁻¹ 5-bromo-4-chloro-3-inolyl- β -d-galactosidase (X-Gal) at pH 5.5. For *in vivo* staining and quantifications sections were co-labelled with anti-Troponin C and WGA as above.

Microscopy. For fluorescence microscopy a Leica DM5500B wide-field fluorescence microscope and Zeiss AxioObserver Spinning Disk confocal were used. For super-resolution STED microscopy a Leica SP8 confocal (inverted) gSTED 3D super resolution microscope was used.

TRAP Assay. Heart samples were snap-frozen in liquid nitrogen immediately after dissection. Using a liquid-nitrogen-cooled pestle and mortar, tissues were ground into a fine powder. Telomerase activity was then determined following the TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA kit (Roche).

RNA-sequencing. Paired-end reads were aligned to the mouse genome (mm9) using a splicing-aware aligner (tophat2). Only unique reads were retained. Reference splice junctions were provided by a reference transcriptome (Ensembl build 67), and novel splicing junctions determined by detecting reads that spanned exons that were not in the reference annotation. True read abundance at each transcript isoform was assessed using HTSeq (Python) before determining differential expression with the tool DESeq2, which models mean-variance dependence within the sample set. Significance was determined using an FDR corrected p-value ≤ 0.05 . Alignment statistics for each replicate are included in the supplementary data.

Cufflinks FPKM determination. To calculate library normalised read counts for each transcript in every replicate, we used the tool Cufflinks, which returns the proportion of reads per million, which mapped to each gene isoform.

GSEA Gene set enrichment analysis. We perform a gene set enrichment analysis by creating a ranked list of the DESeq2 results file where genes are ranked by their log transformed, non-FDR-corrected p-values. This list is then used as an input to the GSEA software, which assesses positive or negative shifts of GO ontology classes in the global distribution of gene expression. This is achieved by the

calculation of an enrichment score, which reflects the movement of a particular ontological class to the positive and negative extremes of the distribution of the expression of all genes. Permutation testing then allows for the estimation of significance prior to FDR correction.

Heatmaps. Heatmaps were created in R using the *ggplots* package. Those heatmaps displaying normalised (row scaled – Z-score) FPKM gene expression across a series of replicates were clustered using a Pearson correlative clustering approach in the “hclust” R package.

PCA. Principle component analysis was performed in R using the *prcomp* method.

Computational Modelling. Two different models were constructed to examine different hypotheses on how TAF accumulate in cells. The models were encoded in the Systems Biology Markup Language (SBML) modelling standard ⁵⁴ with the Python SBML shorthand tool ⁵⁵. Model simulations were carried out in COPASI ⁵⁶ and the results were analysed and plotted in R using ggplot2⁵⁷. We used stochastic simulation (Gillespie Direct Method) in order to be able to account for the variability in the experimental data. The models were deposited in BioModels ⁵⁸ and assigned the identifiers MODEL1608250000 and MODEL1608250001.

Statistical Analysis. We conducted two-tailed *t*-tests, one-way ANOVA, Gehan-Breslow, and Mann-Whitney tests using GraphPad Prism.

End notes

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgements: This work was funded by BBSRC grants BB/H022384/1 and BB/K017314/1 to JFP, BHF project grant PG/15/85/31744 to GR and JFP, NIH grant AG013925 to JLK, grants from the Connor Group, Noaber Foundation, and grant from Région Midi-Pyrénées, France to JMP. CJP and JFP were funded by the MRC-Arthritis Research UK Centre for Integrated research into Musculoskeletal Ageing (CIMA) grant MR/K0063121/1. We thank Rolando Berlinguer-Palmini for expert assistance in performing STED microscopy and Simon Tual-Chalot for the expert assistance in magnetic resonance imaging. We thank Prof. Roger Greenberg for kindly providing us with the TRF1-FOKI plasmid. We thank Gabriele Saretzki for expert assistance in TRAP assays, Thomas von Zglinicki for providing mice tissues and Glyn Nelson for assistance in live-cell microscopy.

Author Contributions:

R.A. performed the majority of experiments. DM, JC, AL, JB, HS, MO, DJ, CP, CCM, MS, CMR, AW, ED, EF, KKK, MJS, CMR, NKLB, JM, GDR, VDE and TT performed and evaluated individual experiments; AO, JM, AP, JLK, TT, NKLB and PDA designed and supervised individual experiments; LG and JLK provided materials; JMP, GDR and JFP designed and supervised the study; JFP, RA and GDR wrote the manuscript with contributions from all the authors.

Data deposition: The RNA-seq data from this publication have been submitted to the GEO database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Competing financial interests statement:

Patents on INK-ATTAC mice are held by Mayo Clinic and licensed to Unity Biotechnology. J.L.K. and T.T. may gain financially from these patents and licenses. This research has been reviewed by the Mayo Clinic Conflict of Interest Review Board and was conducted in compliance with Mayo Clinic Conflict of Interest policies. The remaining authors declare no competing financial interests.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Joao.Passos@ncl.ac.uk

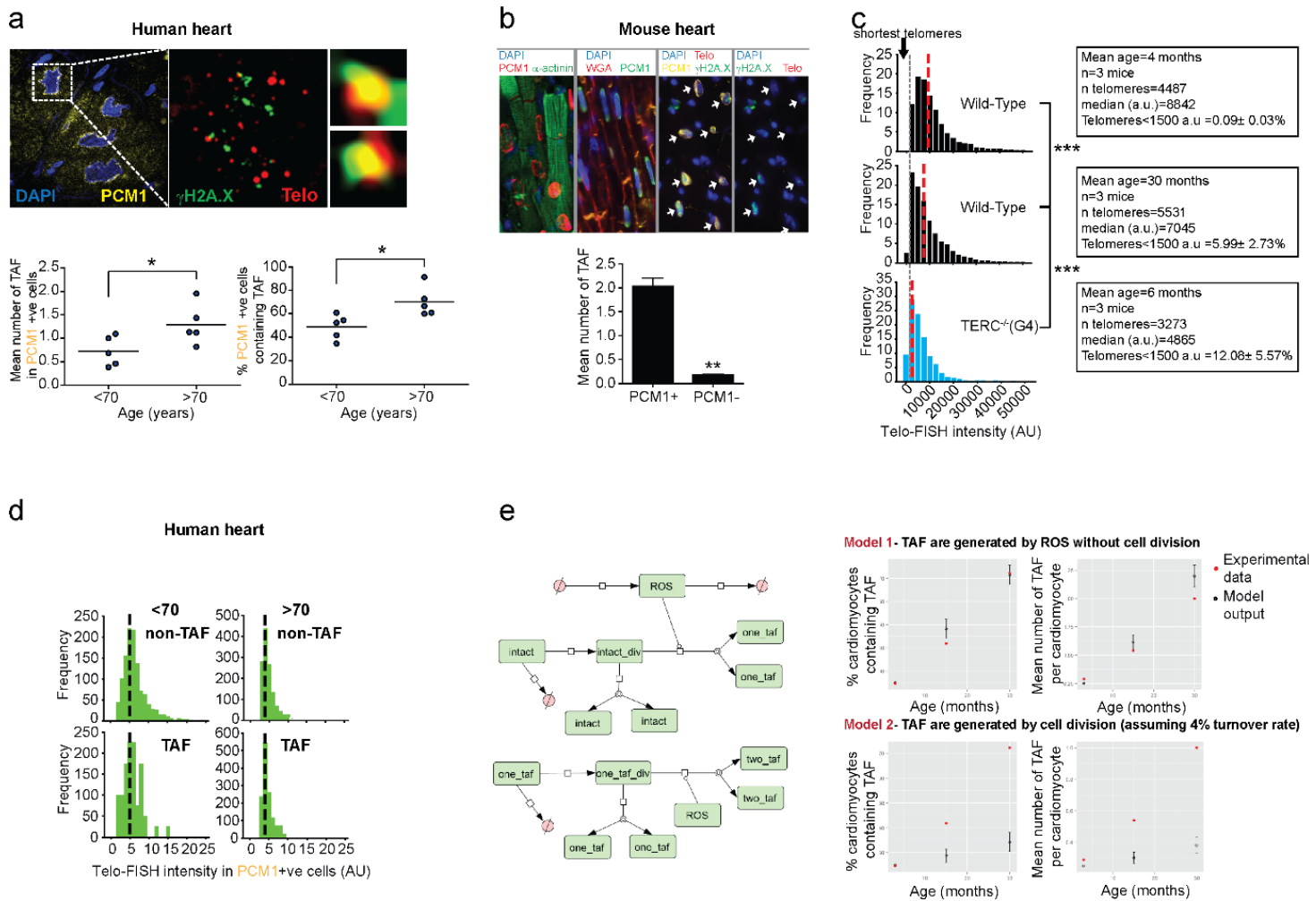
References

- 1 van Deursen, J. M. The role of senescent cells in ageing. *Nature* **509**, 439-446, doi:10.1038/nature13193 (2014).
- 2 Bodnar, A. G. *et al.* Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349-352 (1998).
- 3 de Lange, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* **19**, 2100-2110, doi:10.1101/gad.1346005 (2005).
- 4 Griffith, J. D. *et al.* Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop. *Cell* **97**, 503-514 (1999).
- 5 d'Adda di Fagagna, F. *et al.* A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194-198 (2003).
- 6 Strait, J. B. & Lakatta, E. G. Aging-associated cardiovascular changes and their relationship to heart failure. *Heart Fail Clin* **8**, 143-164, doi:10.1016/j.hfc.2011.08.011 (2012).
- 7 Wong, L. S. M. *et al.* Telomere biology in cardiovascular disease: the TERC^{-/-} mouse as a model for heart failure and ageing. *Cardiovascular Research* **81**, 244-252, doi:10.1093/cvr/cvn337 (2008).
- 8 Senyo, S. E., Lee, R. T. & Kuhn, B. Cardiac regeneration based on mechanisms of cardiomyocyte proliferation and differentiation. *Stem Cell Res* **13**, 532-541, doi:10.1016/j.scr.2014.09.003 (2014).
- 9 Richardson, G. D. Simultaneous Assessment of Cardiomyocyte DNA Synthesis and Ploidy: A Method to Assist Quantification of Cardiomyocyte Regeneration and Turnover. *J Vis Exp*, doi:10.3791/53979 (2016).
- 10 Bergmann, O. *et al.* Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell* **161**, 1566-1575 (2015).
- 11 Zhu, Y. *et al.* Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell* **15**, 428-435, doi:10.1111/accel.12445 (2016).
- 12 Hewitt, G. *et al.* Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nat Commun* **3**, 708 (2012).
- 13 Richardson, G. D., Laval, S. & Owens, W. A. Cardiomyocyte Regeneration in the mdx Mouse Model of Nonischemic Cardiomyopathy. *Stem Cells Dev* **24**, 1672-1679, doi:10.1089/scd.2014.0495 (2015).
- 14 Chang, A. C. Y. *et al.* Telomere shortening and metabolic compromise underlie dystrophic cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, 13120-13125, doi:10.1073/pnas.1615340113 (2016).
- 15 Fumagalli, M. *et al.* Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat Cell Biol* **14**, 355-365 (2012).
- 16 Passos, J. F. *et al.* Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol* **6**, 347 (2010).
- 17 Suram, A. *et al.* Oncogene-induced telomere dysfunction enforces cellular senescence in human cancer precursor lesions. *Embo J* **31**, 2839-2851 (2012).
- 18 Dilley, R. L. *et al.* Break-induced telomere synthesis underlies alternative telomere maintenance. *Nature* **539**, 54-58, doi:10.1038/nature20099 (2016).
- 19 Nag, A. C. & Zak, R. Dissociation of adult mammalian heart into single cell suspension: an ultrastructural study. *Journal of Anatomy* **129**, 541-559 (1979).
- 20 Swanson, E. C., Manning, B., Zhang, H. & Lawrence, J. B. Higher-order unfolding of satellite heterochromatin is a consistent and early event in cell senescence. *The Journal of Cell Biology* **203**, 929-942, doi:10.1083/jcb.201306073 (2013).

- 21 Coppé, J. P. *et al.* Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biology* **6**, e301 (2008).
- 22 Ock, S. *et al.* Deletion of IGF-1 Receptors in Cardiomyocytes Attenuates Cardiac Aging in Male Mice. *Endocrinology* **157**, 336-345, doi:10.1210/en.2015-1709 (2016).
- 23 Acosta, J. C. *et al.* A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* **15**, 978-990 (2013).
- 24 Passos, J. F. *et al.* Mitochondrial Dysfunction Accounts for the Stochastic Heterogeneity In Telomere-Dependent Senescence. *PLoS Biology* **5**, e110 (2007).
- 25 Correia-Melo, C. *et al.* Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *The EMBO Journal* **35**, 724-742, doi:10.15252/embj.201592862 (2016).
- 26 Villeneuve, C. *et al.* p53-PGC-1 α Pathway Mediates Oxidative Mitochondrial Damage and Cardiomyocyte Necrosis Induced by Monoamine Oxidase-A Upregulation: Role in Chronic Left Ventricular Dysfunction in Mice. *Antioxidants & Redox Signaling* **18**, 5-18, doi:10.1089/ars.2011.4373 (2013).
- 27 Dai, D.-F., Chen, T., Johnson, S. C., Szeto, H. & Rabinovitch, P. S. Cardiac Aging: From Molecular Mechanisms to Significance in Human Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling* **16**, 1492-1526, doi:10.1089/ars.2011.4179 (2012).
- 28 Baker, D. J. *et al.* Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184-189, doi:10.1038/nature16932 (2016).
- 29 Baker, D. J. *et al.* Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**, 232-236 (2011).
- 30 Ogrodnik, M. *et al.* Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nature Communications* **15691**, doi:10.1038/ncomms15691 (2017).
- 31 Farr, J. N. *et al.* Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice. *Nat Med advance online publication*, doi:10.1038/nm.4385 (2017).
- 32 Puente, B. N. *et al.* The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response. *Cell* **157**, 565-579, doi:10.1016/j.cell.2014.03.032 (2014).
- 33 Malliaras, K. *et al.* Cardiomyocyte proliferation and progenitor cell recruitment underlie therapeutic regeneration after myocardial infarction in the adult mouse heart. *EMBO Molecular Medicine* **5**, 191-209, doi:10.1002/emmm.201201737 (2013).
- 34 Nakada, Y. *et al.* Hypoxia induces heart regeneration in adult mice. *Nature* **541**, 222-227, doi:10.1038/nature20173 (2017).
- 35 van Steensel, B., Smogorzewska, A. & de Lange, T. TRF2 Protects Human Telomeres from End-to-End Fusions. *Cell* **92**, 401-413 (1998).
- 36 Smogorzewska, A., Karlseder, J., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A. & de Lange, T. DNA Ligase IV-Dependent NHEJ of Deprotected Mammalian Telomeres in G1 and G2. *Current Biology* **12**, 1635-1644 (2002).
- 37 pCelli, G. B. & de Lange, T. DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. *Nat Cell Biol* **7**, 712-718 (2005).
- 38 Bae, N. S. & Baumann, P. A RAP1/TRF2 Complex Inhibits Nonhomologous End-Joining at Human Telomeric DNA Ends. *Molecular Cell* **26**, 323-334 (2007).
- 39 Mao, P. *et al.* Homologous recombination-dependent repair of telomeric DSBs in proliferating human cells. *Nat Commun* **7**, 12154, doi:10.1038/ncomms12154 (2016).
- 40 Richardson, G. D. *et al.* Telomerase expression in the mammalian heart. *The FASEB Journal* **26**, 4832-4840, doi:10.1096/fj.12-208843 (2012).
- 41 Sahin, E. *et al.* Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* **470**, 359-365 (2011).

- 42 Rota, M. *et al.* The Young Mouse Heart Is Composed of Myocytes Heterogeneous in Age and Function. *Circulation Research* **101**, 387 (2007).
- 43 Torella, D. *et al.* Cardiac Stem Cell and Myocyte Aging, Heart Failure, and Insulin-Like Growth Factor-1 Overexpression. *Circulation Research* **94**, 514 (2004).
- 44 Sawicka, M. *et al.* The Specificity and Patterns of Staining in Human Cells and Tissues of p16INK4a Antibodies Demonstrate Variant Antigen Binding. *PLoS ONE* **8**, e53313, doi:10.1371/journal.pone.0053313 (2013).
- 45 Demaria, M. *et al.* An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Developmental Cell* **31**, 722-733 (2014).
- 46 Krizhanovsky, V. *et al.* Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell* **134**, 657-667 (2008).
- 47 Wiley, Christopher D. *et al.* Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metabolism* **23**, 303-314 (2016).
- 48 Jurk, D. *et al.* Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. *Aging Cell* **11**, 996-1004, doi:10.1111/j.1474-9726.2012.00870.x (2012).
- 49 Minamino, T. *et al.* A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med* **15**, 1082-1087 (2009).
- 50 Cawthon, R. M. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Research* **30**, e47, doi:10.1093/nar/30.10.e47 (2002).
- 51 Shenje, L. T. *et al.* Mutations in Alström Protein Impair Terminal Differentiation of Cardiomyocytes. *Nature communications* **5**, 3416-3416, doi:10.1038/ncomms4416 (2014).
- 52 Passos, J. *et al.* Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS biology* **5**, doi:10.1371/journal.pbio.0050110 (2007).
- 53 Dimri, G. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 9363-9367, doi:10.1073/pnas.92.20.9363 (1995).
- 54 Hucka, M. *et al.* The systems biology markup language (SBML): a medium for representation and exchange of biochemical network models. *Bioinformatics* **19**, 524-531 (2003).
- 55 Wilkinson, D. J. *Stochastic Modelling for Systems Biology*. 2nd edn, (Chapman & Hall/CRC Press, 2011).
- 56 Hoops, S. *et al.* COPASI--a COMplex PATHway Simulator. *Bioinformatics* **22**, 3067-3074, doi:10.1093/bioinformatics/btl485 (2006).
- 57 Wickham, H. *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. (Springer, 2009).
- 58 Chelliah, V. *et al.* BioModels: ten-year anniversary. *Nucleic Acids Res* **43**, D542-548, doi:10.1093/nar/gku1181 (2015).

Extended Data Figures

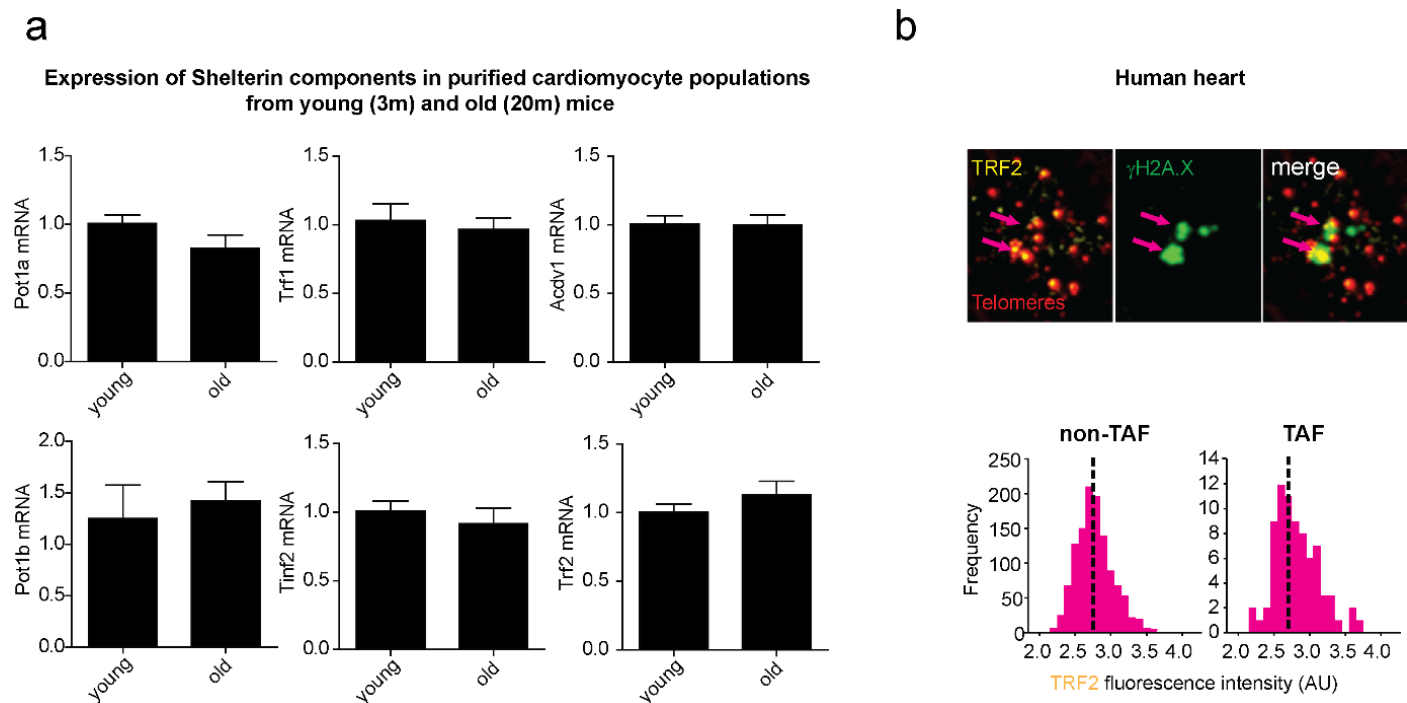


Extended figure 1.

(a) Representative images of γ H2A.X immuno-FISH in PCM1-positive human cardiomyocytes (blue – DAPI; yellow – PCM1; red – telo-FISH; green – γ H2A.X). Images are z projections of 4.5 μ M stacks taken with 100X objective. Right panels show co-localisation between telomeres and γ H2A.X, with taken from single z planes where co-localisation was found. Graphs showing mean number of TAF (left) and mean percentage of TAF positive nuclei (right) in PCM1-positive human cardiomyocytes from 46-65 and 74-82 year old human heart tissue. Data are represented as the mean for individual subjects, with the horizontal line representing group mean.

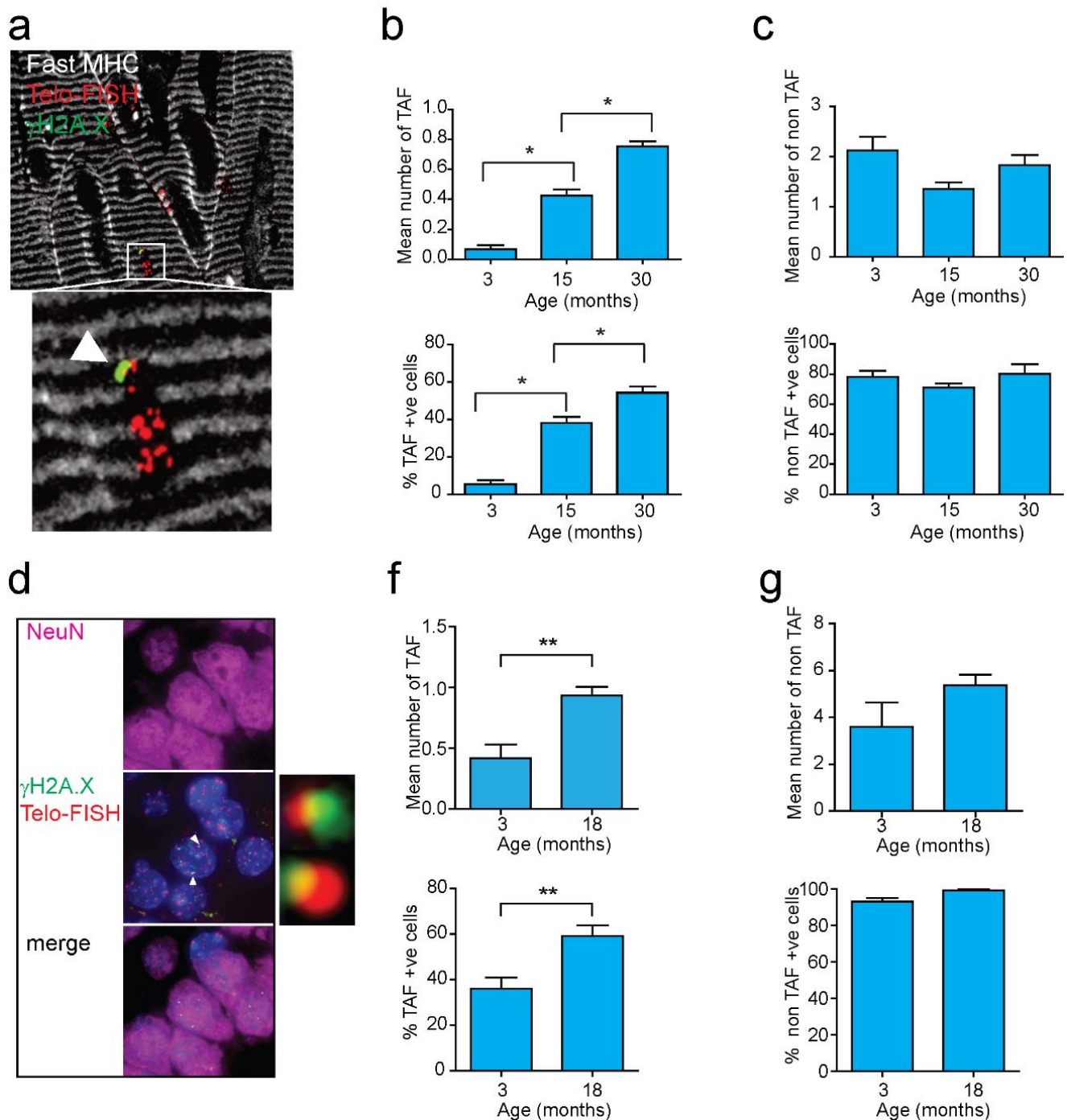
(b) Above: representative images of PCM1 and α -actinin; PCM1 and WGA and γ H2A.X, PCM1 immuno-FISH in 30 month old mouse cardiac tissue. Below: Graph representing mean number of TAF in PCM1 positive versus PCM1 negative cardiac cells; n=3 mice; >100 cardiomyocytes were quantified. Asterisk denote a statistical significance at $P < 0.05$ using two tailed t-test. **(d)** Histograms displaying telomere intensity for telomeres co-localising (bottom) or not co-localising (top) with γ H2A.X DDR foci for PCM1 positive cardiomyocytes obtained from 46-65 (left) and (74-82) year old subjects. Dotted lines represent median intensity. Mann-Whitney tests show no significant difference in telomere intensity between TAF and non-TAF in either, 46-65 or 74-82 year old subjects ($P > 0.05$). More than 100 cardiomyocytes were quantified per subject.

(e) Stochastic mathematical models representing a cardiomyocyte population throughout 27 months of a mouse's lifespan. Top panel: Network diagram of model 2, - TAF are generated by cell division. Reactions involving turnover of cells with two, three or four TAF are similar to those for cells with one TAF and are omitted for clarity. Network diagram created in CellDesigner using Systems Biology Graphical Notation. Middle and bottom panel: model output showing mean values of 100 stochastic simulations, (error bars show $\pm$ one s.d. from the mean).



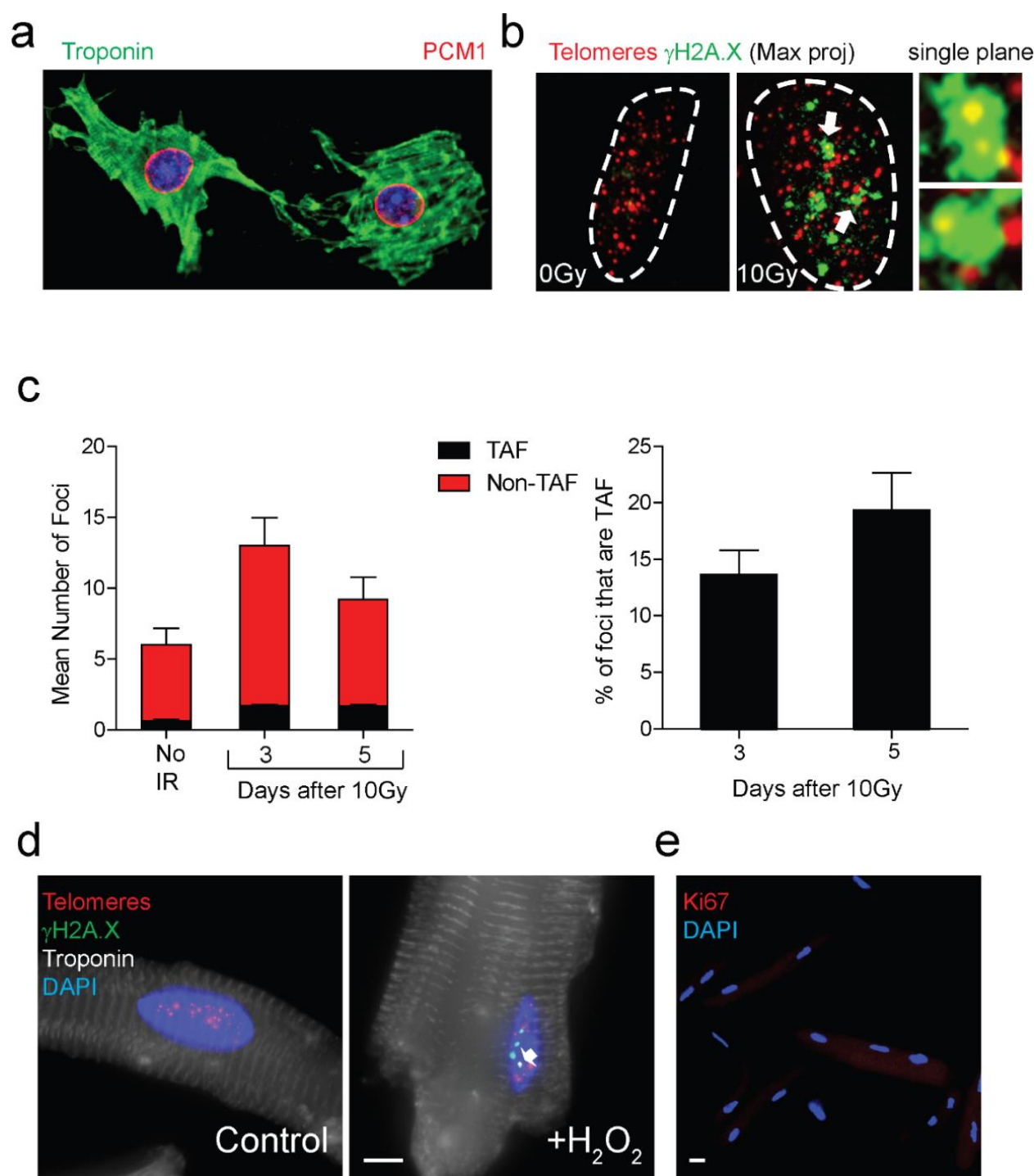
Extended figure 2.

(a) mRNA expression of shelterin components: Pot1a, Pot1b, Trf1, Trf2, Tinkf2 and Acv1 in purified cardiomyocyte populations from young (3m) and old (20m) wild-type mice. Data are mean $\pm$ S.E.M of $n=5$ mice per group. Two-tailed t-test shows no significant difference in expression ($P>0.05$). **(b)** Representative image of TRF2 immuno-FISH in PCM1-positive human cardiomyocytes (blue – DAPI; yellow – TRF2; red – telo-FISH; green – γ H2A.X). Images are z projections of 4.5 μ M stacks taken with 100X objective. (below) Histograms displaying TRF2 fluorescence intensity for TRF2 foci co-localising with telomeres also co-localising with γ H2A.X (right) or telomeres not co-localising with γ H2A.X (left) in human cardiomyocytes. Red dotted lines represent median intensity. Mann-Whitney tests show no significant difference in TRF2 intensity between TRF2 abundance at TAF and non-TAF ($P>0.05$).



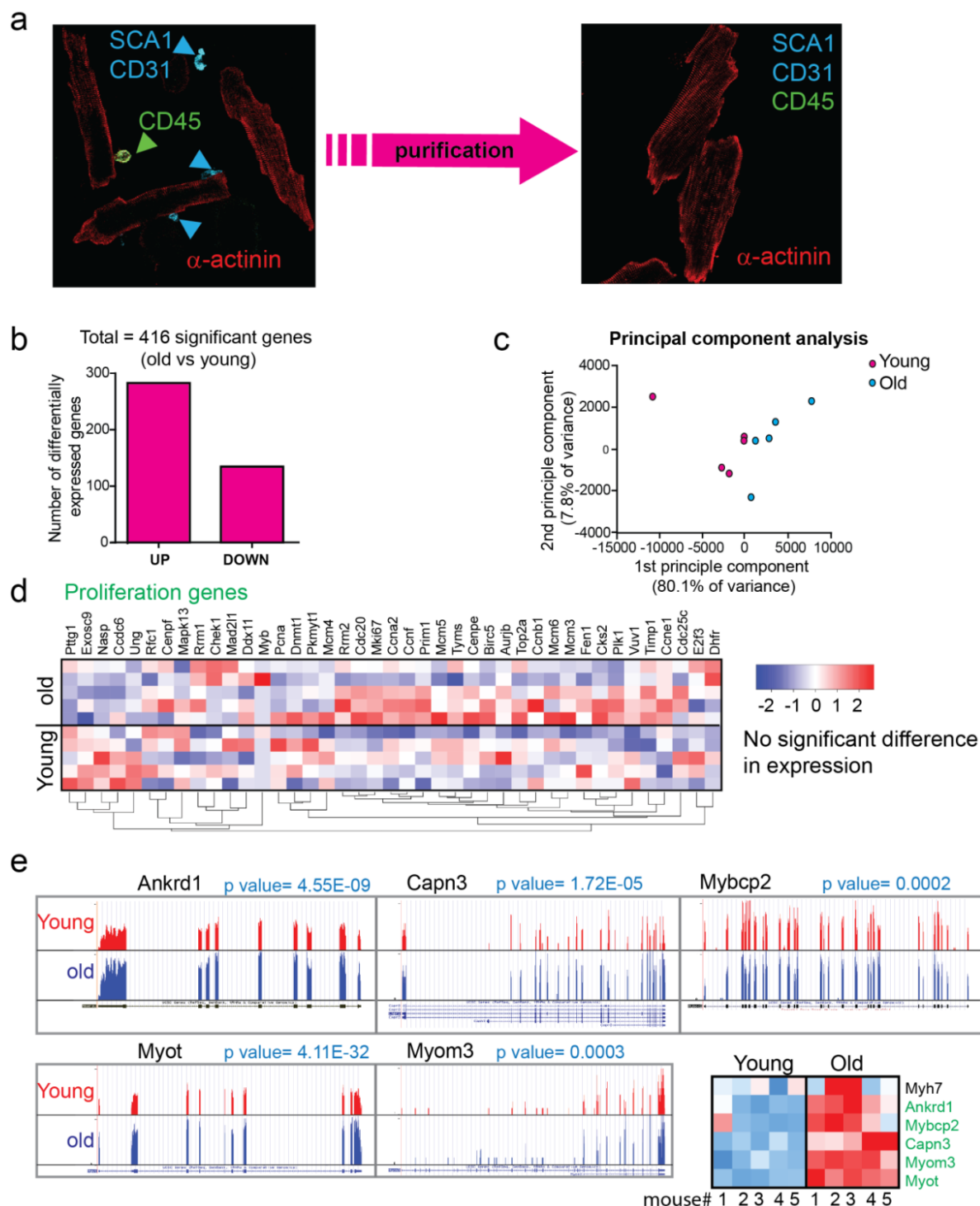
Extended figure 3.

(a) Representative image of Immuno-FISH for γ H2A.X, telomeres and fast MHC (marker of type 2 muscle fibres). White arrow indicates co-localisation between γ H2A.X and telomeres; **(b)** Mean number of TAF (top) and % of myocytes positive for TAF (bottom); **(c)** Mean number of non-TAF (top) and % of myocytes containing non-TAF (bottom) in 3, 15 and 30 month old mice. Data are mean $\pm$ SEM of n=4 per age group. More than 70 myocytes were quantified per age group. Statistical analysis performed using One Way ANOVA; * P<0.05; **(d)** representative image of Immuno-FISH for γ H2A.X, telomeres and NeuN (neuronal marker) in mouse hippocampus. White arrows indicate co-localisation between γ H2A.X and telomeres; **(e)** Mean number of TAF (top) and % of neurons positive for TAF (bottom); **(f)** Mean number of non-TAF (top) and % of neurons containing non-TAF (bottom) in 3 and 18 month old mice. Data are mean $\pm$ SEM of n=5-7 per age group. More than 100 neurons were quantified per age group. Statistical analysis performed using two-tailed t-test; * P<0.05.



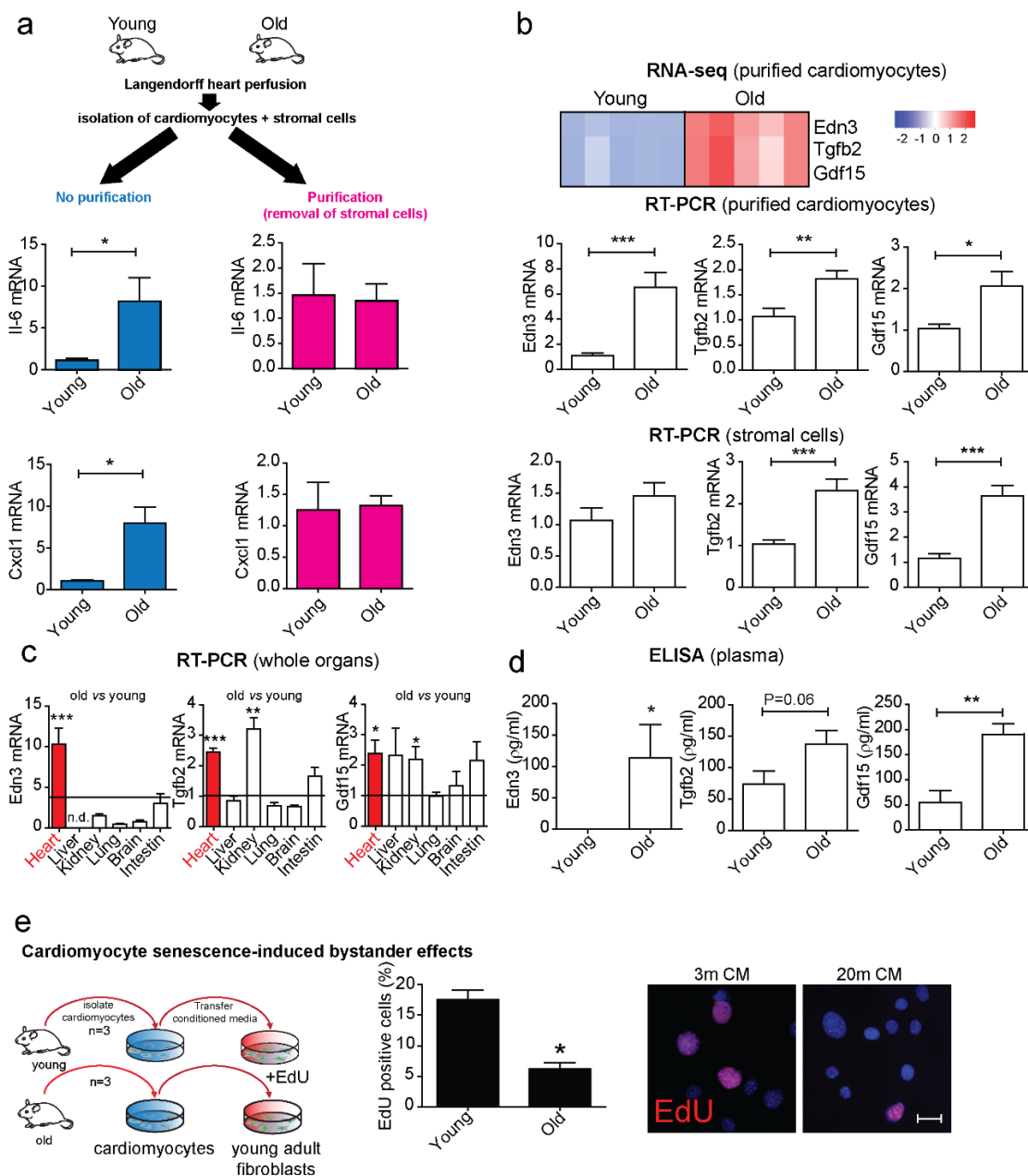
Extended figure 4.

(a) Representative image of mouse embryonic cardiomyocytes (green – Troponin C; red- PCM1; blue- DAPI) by 40× objective; (b) Representative images of γ H2AX immuno-FISH in H9C2 cardiomyoblasts 3 days 10Gy X-irradiation (red – telo-FISH; green – γ H2AX). Right panels represent a single Z-plane where co-localisation between a γ H2AX focus and telomere was observed; (c) Mean number of both TAF and non-TAF (left graph) and mean percentage of γ H2AX foci co-localising with telomeres (% TAF) (right graph) in H9C2 cardiomyoblasts at days 0, 3, and 5 days following 10Gy X-irradiation. Data are mean $\pm$ S.E.M of $n=3$. >50 cells were quantified per condition; (d) Representative micrographs of Immuno-FISH for γ H2A.X, telomeres and Troponin C in control and H_2O_2 treated adult mice cardiomyocytes. Arrow indicates co-localisation between telomeres and γ H2A.X; (e) Representative image showing absence of proliferation marker Ki67 in isolated adult mouse cardiomyocytes. Scale bar corresponds to 10 μ m.



Extended figure 5.

(a) Representative images of cardiomyocytes isolations before (left) and after (right) purification to remove SCA1-, CD31- and CD45-positive cells. (b) Counts of differentially expressed genes calculated using DESeq2 at %5 FDR. (c) Principal component analysis (PCA) of FPKM expression for young (red) and old (blue) cardiomyocytes. Components one and two account for 80.1% and 7.8% of the total variance respectively. (d) Correlation clustered heatmap of a curated list of known proliferation genes in young and old cardiomyocytes. The colour intensity represents column Z-score, with red indicating high and blue low expression. Note that there is no enrichment for differential expression in this subset of pro-proliferation genes. (e) Trace plots and heatmap of the relative expression of Ankrd1, Capn3, Mybcp2, Myot, Myom3 and their associated FDR corrected q-values derived from DESeq2.

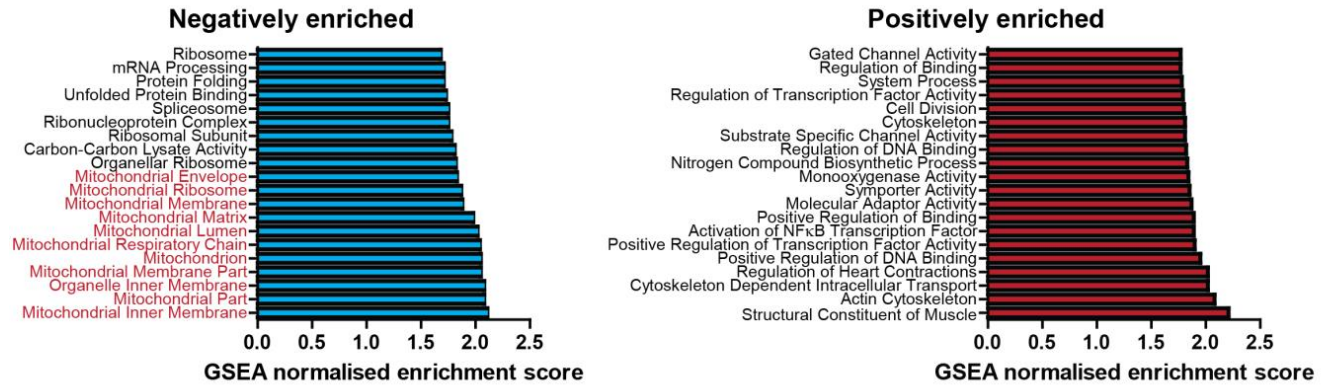


Extended figure 6. Senescent cardiomyocytes have a non-canonical SASP phenotype and can induce bystander effects.

(a) Stromal cells isolated as part of the *Langendorff* heart perfusion contribute to the previously reported increased SASP in aged cardiomyocytes: (left) Using the traditional cardiomyocyte isolation method, significant increases in mRNA expression of SASP components Il-6 and Cxcl1 are observed with age; (right) Following removal of stromal cells, no significant differences could be found. Data are mean $\pm$ S.E.M of $n=4-6$ mice per group; **(b)** (above) RNA-sequencing of purified cardiomyocytes from 4 mice per age group reveal age-dependent increased expression of 3 secreted proteins Edn3, Tgfb2 and Gdf15; (middle) mRNA expression of Edn3, Tgfb2 and Gdf15 was independently validated by RT-PCR in young and old isolated adult cardiomyocytes. Data are mean $\pm$ S.E.M of $n=8$ mice per group; (below) Stromal cells show age-dependent increased expression of Tgfb2 and Gdf15 but not Edn3. Data are mean $\pm$ S.E.M of $n=8$ mice per group. **(c)** Only Edn3 shows an age-dependent increase in expression in the heart. Tgfb2 and GDF15 increase significantly both in heart and kidney. Data are mean $\pm$ S.E.M of $n=4-7$ mice per group. **(d)** Edn3, Tgfb2 and Gdf15 increase with age at the protein level in plasma. **(e)** (left) Schematic depicting experimental design: Cardiomyocytes were isolated by *Langendorff* heart perfusion and purified and cultured for 48h. Conditioned medium (CM) was collected and added to cultures of mouse adult fibroblasts in the presence of 10 μ M EdU; (middle) Quantification of % of EdU incorporation in mouse adult fibroblasts after treatment for 48h with CM from young and old cardiomyocyte. Data are mean $\pm$ S.E.M of $n=3$ mice per

age group; More than 200 cells were quantified per condition; (right) representative images of EdU staining. Statistical analysis: for multiple comparisons One-way ANOVA was used, otherwise two-tailed t-test.

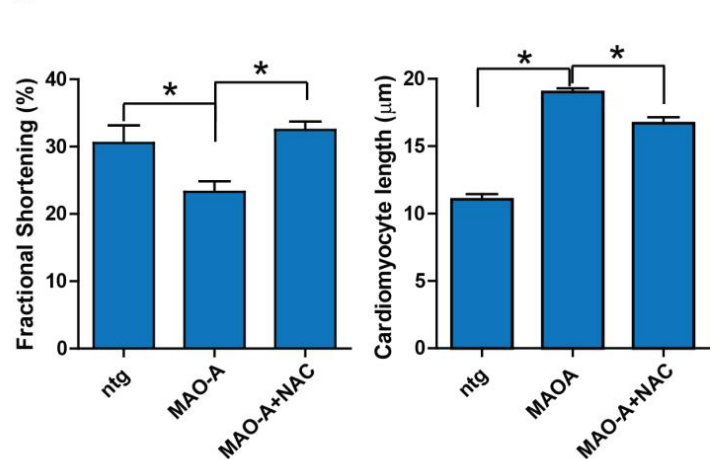
a



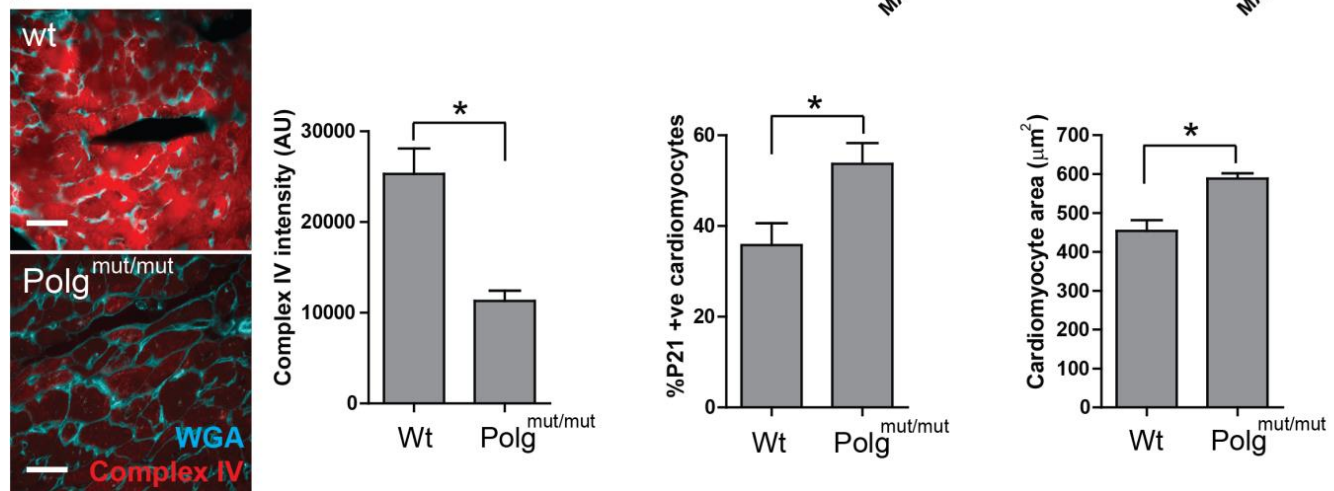
b



c

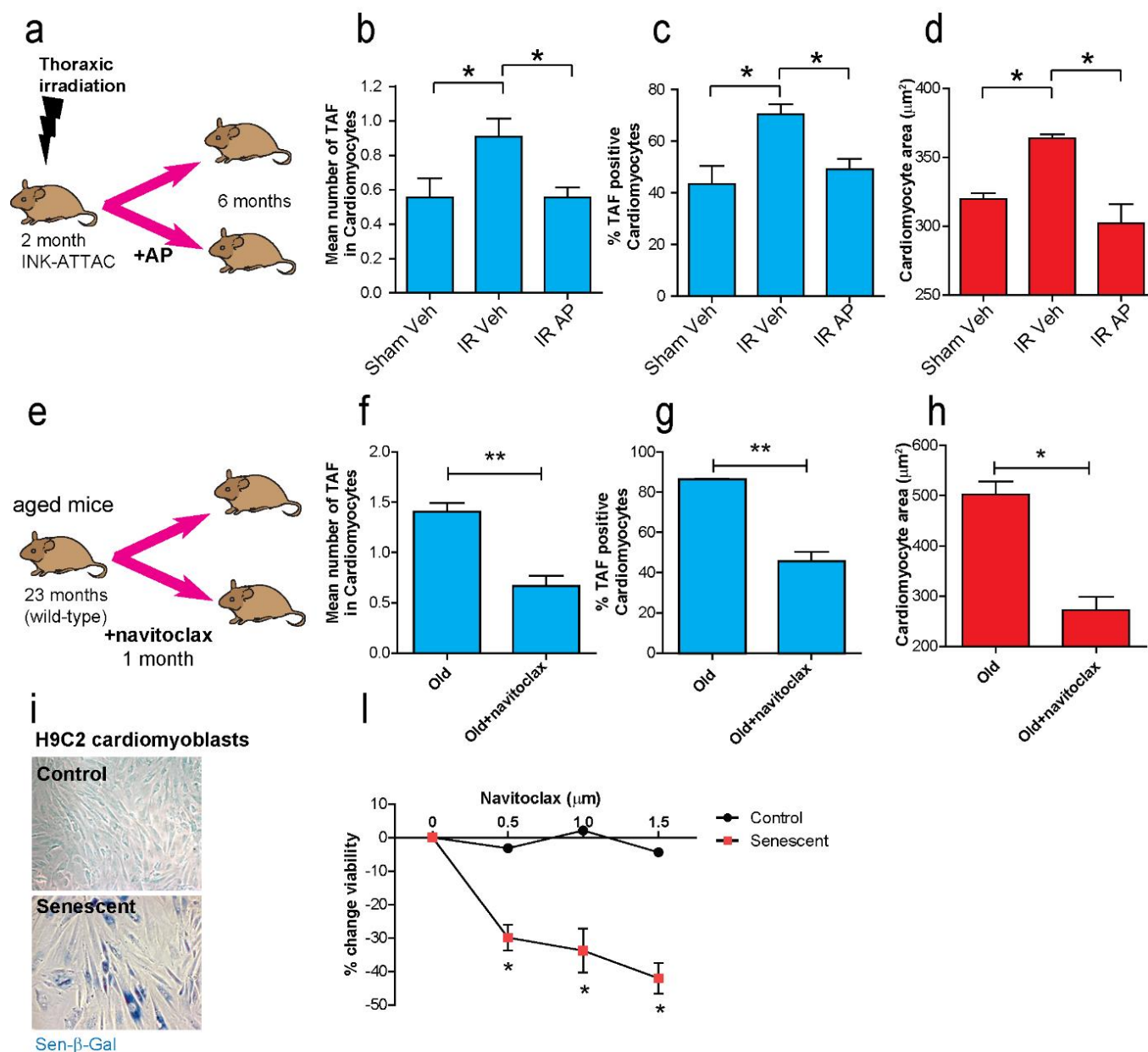


d



Extended figure 7.

(a) Normalised GSEA enrichment scores for the top 20 positively and negatively enriched GO ontologies. Those negatively enriched ontologies associated with mitochondrial structure and function are highlighted in red. (b) Transmission electron microscopy to detect mitochondrial ultrastructural defects in young (3 months) and old (20 months) mice. (c) Fractional shortening and cardiomyocyte length analysis on WT, MAO-A or MAO-A mice with or without drinking water supplemented with 1.5g/kg/day NAC from the age of 4 to 24 weeks. Data are mean $\pm$ S.E.M of n=5-10 mice per group. (d) Representative images of mitochondrial complex IV (red) and WGA (blue) in 12 month old WT and Polg^{mut/mut} mice. Graphs represent complex IV intensity (left), p21 positivity by immunohistochemistry and mean cardiomyocyte area (right). Data are mean $\pm$ S.E.M of n=3-5 mice per group. More than 100 cardiomyocytes were quantified per group. Asterisks denote a statistical significance at P < 0.05 using two-tailed t-test.



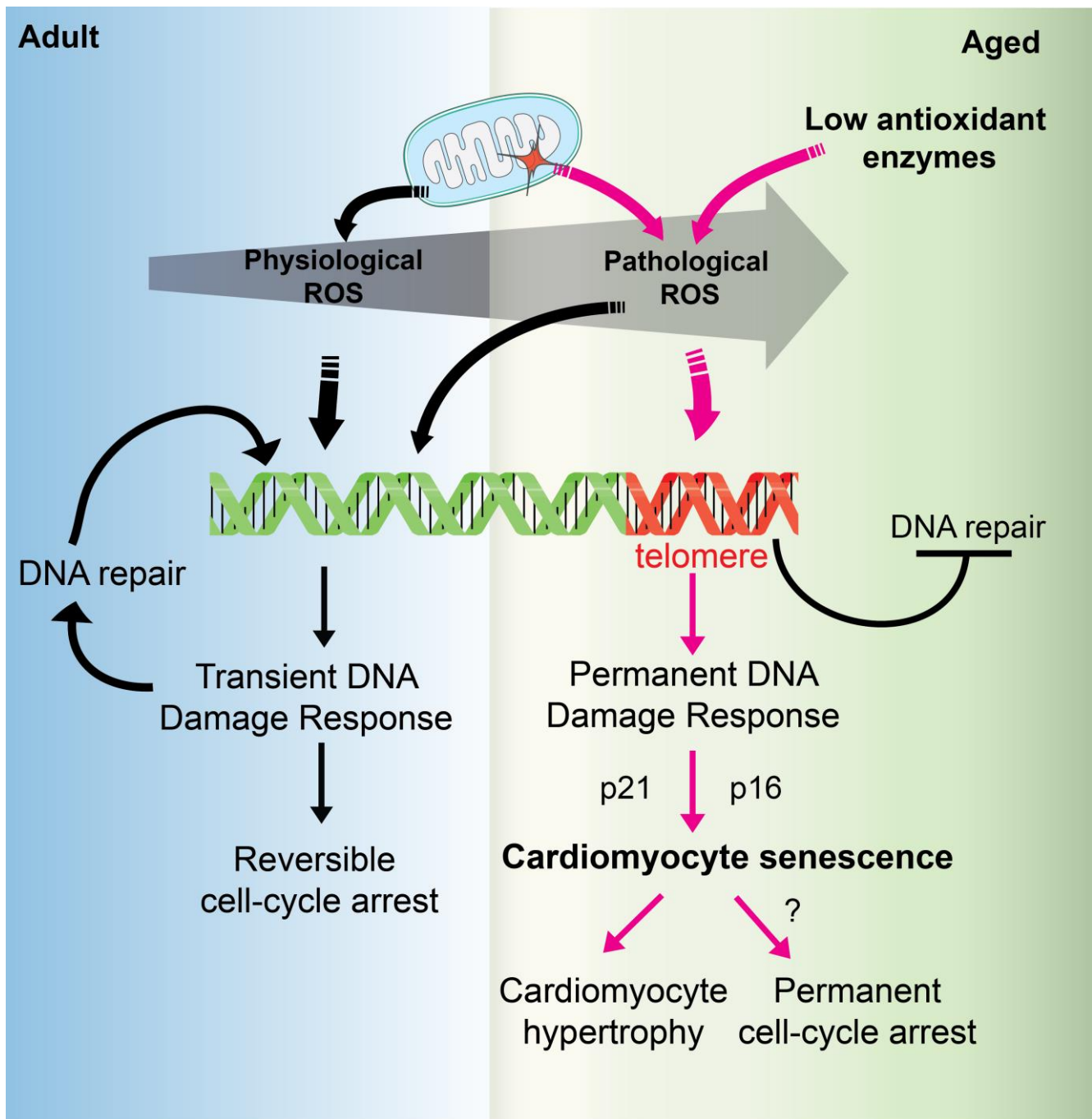
Extended figure 8.

(a) Schematic depicting experimental design for figures e-g: 2 month old INK-ATTAC mice underwent thoracic X-irradiation and then sacrificed at 6 months of age; **(b)** and **(c)** Mean number of TAF (left graph) and mean percentage of TAF-positive nuclei in cardiomyocytes; **(d)** Mean cardiomyocyte area μm^2 . Data are mean $\pm$ SEM of $n=6-10$ per age group. Asterisks denote $P < 0.05$ using one-way ANOVA; **(e)** Schematic depicting experimental design for figures f-h: 23 month old mice were provided Navitoclax or vehicle for 7 days (50mg/kg/day) alternating with 7 days of rest without navitoclax for 2 rounds of treatment; **(f)** Mean number of TAF and **(g)** mean percentage of TAF-positive nuclei in cardiomyocytes; **(h)** Mean cardiomyocyte area μm^2 . Data are mean $\pm$ SEM of $n=3$ per treatment group. Asterisks denote $*P < 0.05$ or $**P < 0.001$ using two-tailed t-test; **(i)** H9C2 cardiomyoblasts were induced to senescence (representative Sen- β -Gal image) via exposure to 10 Gy X-ray radiation; **(j)** Navitoclax treatment significantly reduced cell viability in senescent cardiomyoblasts in a dose dependent manner. Navitoclax had no effect on the viability of non-senescent cardiomyoblasts. Data are mean $\pm$ SEM $n=3$ for each treatment group and dosage. Statistical analysis via two-way ANOVA.

Conclusion de la première étude

Cette étude collaborative entre notre équipe et celle de JF.Passos de l' « Institute for Ageing » de Newcastle a permis de conjuguer nos techniques d'isolement, purification et traitement des cardiomyocytes adultes, et notre savoir-faire sur l'hypertrophie et le stress oxydant cardiaque avec leur expertise concernant l'évaluation des dommages télomériques.

Ainsi, nous avons démontré que les cardiomyocytes peuvent acquérir des caractéristiques de la sénescence en association avec l'âge. En effet, sur des cardiomyocytes isolés et enrichis, via une technique que j'ai développée au sein de notre laboratoire, le phénotype sénescence se traduit par l'acquisition de marqueurs classiques de la sénescence, comme l'expression d'inhibiteurs de cycle cellulaire tels que p16^{INK4a}, p53, p15^{INK4b} et p21^{CIP1}. L'ensemble de ces résultats associés à l'utilisation de la stratégie de gène suicide permet pour la première fois de démontrer que les cardiomyocytes sont sensibles au processus de sénescence. Ce processus de sénescence des cardiomyocytes est logiquement retrouvé lors du vieillissement mais aussi dans un contexte de sénescence induite par un stress génotoxique. En outre, il est intéressant de noter certaines caractéristiques originales de ce processus, comme l'acquisition d'une structure hypertrophiée et l'acquisition d'un profil sécrétoire non-conventionnel (SASP). Ces derniers résultats sont le fruit d'un travail collaboratif particulier puisque l'étude du SASP a été principalement menée par notre équipe et l'évaluation de l'hypertrophie des cardiomyocyte a été réalisée au sein de l'institute for Ageing lors d'un séjour de 2 mois financé par l'université Paul Sabatier (Bourse ATUPS). De plus, ce travail démontre le lien étroit qu'il existe entre l'induction de la sénescence et les dommages spécifiques aux télomères (TAF). De façon très intéressante, et contrairement à d'autres types cellulaires réplikatifs, la sénescence et l'apparition des TAF restent indépendantes de la longueur des télomères. Les télomères constituent donc une structure particulièrement importante dans l'induction de la sénescence, même au sein de cellules post-mitotiques. Enfin, par l'utilisation de modèles de modulation du stress oxydant mitochondrial, comme le modèle de souris surexprimant le MAO-A, qui a été généré par le Dr. Jeanne Mialet-Perez (Villeneuve et al., 2013), nous avons démontré l'importance de ce phénomène dans l'apparition des TAF. L'altération mitochondriale couramment observée lors du vieillissement cardiaque pourrait ainsi être une source d'activation de la sénescence des cardiomyocytes et constituerait une cible d'intérêt dans une stratégie d'élimination des cellules sénescents cardiaques.



Model to explain cardiomyocyte senescence. In young adult mice, a continuous cycle of “physiological” low level ROS maintains a transient DDR which is a contributor to the low myocardial turnover. During ageing, mitochondrial dysfunction and low expression of antioxidant enzymes, induces “pathological” high ROS which randomly induces telomere-associated DNA damage that results in a permanent DNA Damage Response sufficient to robustly activate p21 and p16 senescence pathways. Cardiomyocyte senescence is a driver of myocardial hypertrophy and may contribute to impaired regeneration; however the latter hypothesis remains to be tested experimentally (**Extended Figure 9**)

Etude 2 : Identification de marqueurs moléculaires spécifiques des cardiomyocytes

Avant-propos

L'objectif de cette étude est d'identifier de nouvelles cibles moléculaires pouvant spécifiquement signer la sénescence des cardiomyocytes. En effet, les marqueurs actuellement utilisés, en plus de manquer de spécificité, ne peuvent être utilisés pour signer l'acquisition d'un phénotype sénescence sein d'un type cellulaire particulier (Sharpless and Sherr, 2015). De plus, ces marqueurs ont été identifiés à partir de cellules en sénescence répliquative et leurs fonctions au sein des cellules post-mitotiques reste à ce jour inconnu. La découverte de nouveaux marqueurs de sénescence spécifiques des cardiomyocytes est un enjeu majeur pour l'identification de la sénescence cardiaque, et la compréhension de la fonction des cellules sénescences.

Ainsi, nous avons utilisé les données transcriptomiques (RNA_seq) obtenus dans l'étude précédente sur des cardiomyocytes sénescents isolés et purifiés afin d'identifier 6 candidats potentiels nouveaux marqueurs de sénescence (**voir Tableau 3**). Ces marqueurs ont été validés sur différents modèles de sénescence physiologique et induite et sur différentes espèces.

	Gene name	Protein name	localization	Fold increase (vs 3 months)	p-value
Non-secreted	Prom2	Prominin-2	Plasma membrane	8,05	2,38x10 ⁻³⁸
	Pah	Phenylalanine hydroxylase	Cytoplasm	6,24	1,6x10 ⁻²⁷
	Kcnk1	Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 1	Plasma membrane	4,13	3,4x10 ⁻¹⁴
	Gene name	Protein name	localization	Fold increase (vs 3 months)	p-value
Secreted	Edn3	Endothelin-3	Extracellular	3,66	1x10 ⁻¹⁹
	Gdf15	Growth differentiation factor 15	Extracellular	2,10	1,86x10 ⁻⁶
	Tgfb2	Transforming growth factor β 2	Extracellular	1,95	7,96x10 ⁻¹⁰

Tableau 3. Liste des gènes candidats marqueurs de sénescence spécifiques des cardiomyocytes sénescents

Article 2 (en cours d'écriture)

Expression of Prominin-2 and SASP specific factors GDF15, EDN3 and TGF- β 2 by cardiomyocytes delineate senescence associated hypertrophy and stress induced premature senescence.

Maggiorani D¹, Martini H¹, Manzella N¹, Brun S³, Dutaur M, Santelli J¹, Gayon R⁴, Iché A⁴, Duthoit C⁴, Lairez O³, Parini A¹, Passos JF⁵, Adams PD⁶, Douin-Echinard V¹ and J Mialet-Perez¹

(1) Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, UMR1048, 31432 Toulouse, Cedex 4, France

(2) Paul Sabatier University, 31062 Toulouse, Cedex 9, France

(3) Rangueil Hospital, CHU, 31059 Toulouse, Cedex 9, France

(4) Vectalys, Parc Technologique du Canal, 31400 Toulouse, France

(5) Ageing Research Laboratories, Newcastle University Institute for Ageing, Newcastle upon Tyne NE4 5PL, United Kingdom

(6) Institute of cancer sciences, CR-UK Beatson Institute, University of Glasgow, G61 1BD, United Kingdom

Running title: Specific signature of cardiomyocyte senescence

Corresponding authors:

Dr Jeanne Mialet-Perez, jeanne.perez@inserm.fr

Dr Victorine Douin-Echinard, victorine.douin@inserm.fr

I²MC, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, UMR1048, 1 av Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France

Abstract (231 words)

Age-associated diseases have now been demonstrated to be linked with the progressive accumulation of senescent cells within the failing tissue. Originally defined as a stable cell cycle arrest, cellular senescence is also characterized by deep remodeling of cell biology such as the acquisition of a senescence-associated secretory phenotype (SASP) and cellular hypertrophy. Senescence can be induced by telomeric attrition (replicative senescence) and by exposition to cellular stress signals such as oxidative stress, which induce telomeric damage, activation of the DNA Damage Response (DDR) and increased expression of CDKI genes (p16, p53/p21). These genes are classically used as markers of senescence because their expression increases in several tissues during ageing but they are not tissue-specific. Therefore, a real challenge resides in the identification of new specific markers associated to cardiomyocyte senescence. At the cardiac level, ageing is characterized by left ventricular hypertrophy, increased sensitivity to stress and highest risk of developing heart failure. As most cardiomyocytes are post-mitotic cells, characterization of physiological or stress induced premature senescence in these cells and their role in heart failure remain poorly understood. We demonstrated that cardiomyocyte senescence is characterized by the expression of Prominin 2, downstream of the p53 pathway, and by the acquisition of specific SASP factors, Edn3, Gdf15 and Tgfb2. These new markers offer innovative perspectives in the understanding and the identification of cardiomyocyte senescence and their potential deleterious role in heart failure.

Introduction

Advanced age remains a strong predictor for poor outcomes in patients with chronic or acute heart failure (HF). HF is a highly heterogeneous pathology with different epidemiological and etiological profiles. However, age-related changes in cardiac structure and longer exposure to risk factors may render the elderly more prone to develop HF with preserved ejection fraction (HFpEF) (Lazzarini et al., 2013). Age related organ dysfunction is now clearly related to increased numbers of senescent cells in the tissue. At a cellular level, in replicative proficient cells, the progressive induction of a senescence program is defined by stable cell-cycle arrest involving cell cycle regulators (cycline-dependent kinase inhibitors, CDKIs) and by the secretion of paracrine mediators (such as pro-inflammatory cytokines, chemokines, proteases and growth factors) initially proposed as a mechanism to prevent tumorigenesis (Childs et al., 2015). Senescence has recently been shown not to be restricted to age dependent molecular changes. Indeed, molecular pathways of cellular senescence have been characterized during human and mouse morphogenesis (Muñoz-Espín et al., 2013b; Storer et al., 2013) and during tissue repair, in the border zone of cardiac infarct area (Zhu et al., 2013) or in skin wounds (Demaria et al., 2014). The transient senescence profile in that case allows the coordination of different stromal cellular partners to facilitate angiogenesis and limitation of scar fibrosis mainly through paracrine mediators. However, the definition of cell senescence state may vary according to the cell population of interest. In the adult mammalian heart, cardiomyocytes are mostly post-mitotic cells, although a small percentage of mononuclear diploid cardiomyocytes could still afford weak proliferation potential (Bersell et al., 2009; Patterson et al., 2017; Senyo et al., 2013). In this context, cell-cycle inhibitor expression (p21, p15 and Rb) that classically characterizes senescent cells is early achieved in most cardiomyocytes, after the first postnatal week in mice (Mahmoud et al., 2013; Pasumarthi and Field, 2002; Puente et al., 2014; Walsh et al., 2010). However, we and others have previously demonstrated that specific telomere dysfunctions, by genetically conditioned shortening (Sahin et al., 2011) or by increased telomere associated foci during ageing (Anderson J *et al.*, submitted) could further activate DNA damage responses associated with p53-dependent downstream pathways. Moreover, targeted deletion of p16 positive senescent cells in mice during ageing or after gamma-irradiation and senolytic treatment could alleviate some features of cardiac ageing such as cardiomyocyte hypertrophy suggesting that senescence pathways in cardiomyocytes could be shared during ageing and adverse cardiac remodeling. Indeed, the interaction of these pathways with physiological ageing could contribute to increased susceptibility of the elderly to HFpEF. At present, there is a strong need to identify and compare cardiomyocyte-

specific senescence pathways associated with physiological cardiac and pathological heart remodelling. In-depth understanding of pathological cardiac ageing requires the development of new cardiac predictor tools in order to detect and follow cardiomyocyte senescent pathways.

Thanks to the depletion of endothelial and immune stromal cardiac cells we previously performed RNA-sequencing on highly enriched aged cardiomyocytes and identified a network of genes with enhanced expression during physiological senescence (Anderson R *et al.*, submitted).

In this study, we focused on stress-induced premature cardiomyocyte senescence models and validated key gene expression networks identified during physiological cardiomyocyte senescence and pathological cardiac remodelling.

As mitochondrial dysfunction and ROS production have been tightly associated with telomere associated damages and cardiac ageing, we used two models known to increase ROS production and induce heart failure, by treatment with the anti-tumor drug doxorubicin or by triggering mono-amine oxydase A (MAO-A) activity in cardiomyocytes.

Results

Stress induced premature senescence by doxorubicin in H9c2 enhances the expression of genes identified in aged cardiomyocytes

We previously identified 6 genes highly up-regulated in cardiomyocytes with ageing in mice by RNA-sequencing. These genes encoded secreted factors (Gdf15, Tgfb2, Edn3), a transmembrane glycoprotein (Prom2) the potassium channel (Kcnk1) and the phenylalanine hydroxylase, Pah, a cytoplasmic enzyme catalyzing tyrosine formation. Gdf15 and Tgfb2 belonged to the TGF- β family and have previously been associated with heart failure, cardiac fibrosis and ageing (Chan *et al.*, 2016; Ek *et al.*, 2016; Kempf and Wollert, 2009). Edn3 is part of the endothelin family and its expression has been shown to increase with age in the renal medulla of Wistar rats (Lattmann *et al.*, 2005). We asked if the combination of some of these genes could compose a specific cardiomyocyte senescence signature. To this purpose H9c2 cardiomyoblasts were treated for 96h with doxorubicin (doxo) to promote stress induce premature senescence (SIPS) (Figure 1). As expected, doxorubicin treatment increased relative gene expression of the cell cycle inhibitors p21 and p15 (Figure 1A), and activation of the p53 pathway, monitored by phosphorylation of p53 protein (p-p53) (Figure 1B). SIPS induction in H9c2 was further confirmed by the use of lentiviral vectors harboring reporter genes under the control of the p21 promoter or p53 response elements (p53RE) (Figure 1C). As shown in figure 1D,

Doxo treatment significantly increased the percentage of single (p53RE+ p21-; p21+, p53RE-) and double (p53RE+, p21+) positive cells in the culture. The trigger of p53-dependent pathway in double positive h9c2 treated cells was associated with a significant increase in mean cardiomyoblast size compared to control cells and doxo treated p53RE- p21- cells (Figure 1E). These results suggested that the p53 pathway could control senescence associated cardiomyoblast hypertrophy.

We then tested the expression of the 6 genes previously identified in cardiomyocytes from old mice. As shown figure 1E, Prom2 and Kcnk1 were induced by 6-8 fold compared to control-treated cardiomyoblasts and Pah and Edn3 expression increased 20-25 fold. Gdf15 increased 5 fold whereas Tgfb2 expression was moderately but significantly induced by doxo treatment.

In conclusion, doxo treatment in cardiomyoblast cultures mimicked age related gene modifications and cellular hypertrophy, features associated with cardiac ageing. We then assessed whether doxo treatment *in vivo* could recapitulate cardiomyocyte SIPS signature observed *in vitro*. To this purpose, young mice were injected ip with doxo (5 mg/kg), three times, every 2 other days then hearts were collected 4 weeks after the last injection (Supplementary figure 1). Induction of SIPS-related gene expression by doxo treatment was validated by up-regulation of p21 gene expression in cardiac tissue compared to control PBS injected mice. Whereas this protocol did not induce Prom2, Kcnk1 and Pah gene expression, doxo significantly stimulated the expression of genes encoding the secreted proteins Gdf15 and Tgfb2, with a trend for Edn3 expression (Supplementary figure 1). These results showed that *in vivo* doxo treatment triggered partial stress induced premature cardiomyocyte senescence as revealed by the association of p21 expression with specific cardiomyocyte SASP factors, Gdf15 and Tgfb2.

Degradation of mono-amine oxidase-A substrate and ROS production stimulated SIPS and partially induced age-related cardiomyocyte gene expression

In a second step, we asked if the endogenous enzymatic activity of monoamine oxidase-A (MAO-A), associated with ROS production, could be sufficient to drive age-related cardiomyocyte gene expression. Expression and activity of MAO-A localized at the outer membrane of mitochondria have been previously shown to increase in cardiomyocyte with ageing. Degradation of its substrate, biogenic amines such as catecholamine and serotonin, leads to H₂O₂ that can be converted into highly reactive hydroxyl radical. Furthermore, we have previously shown that cardiac MAO-A surexpression increases oxidative stress, cardiomyocyte mitochondrial dysfunction and heart failure (Villeneuve et al., 2013).

H9c2 cardiomyoblasts constitutively expressing MAO-A were treated with tyramine and relative gene expression of the classical senescence associated genes was monitored. After 96h treatment, H9c2 up-regulated CDKIs of the INK4 family (p15 and p16) as well as the p53-downstream effector p21 CDKI (Figure 2). This premature senescence phenotype was associated with a selective increase in Prom2, Gdf15 and Tgfb2 relative gene expression whereas Kcnk1 and Edn3 were not.

In a second set of experiments, we tested the impact of tyramine treatment on SIPS induction thanks to the use of lentiviral vectors with reporter genes under the control of the p16 promoter or the p21 promoter and immunofluorescence analysis. Chronic treatment of the transduced H9c2 with tyramine for 10 days led to the detection of single (p16+) and double positive (p21+, p16+) h9c2 with p16 promoter activity confirming the triggering of SISP (supplementary figure 2A).

We asked whether this oxidative stress induced premature cardiomyocyte senescence signature could be assessed *in vivo* in transgenic mice with cardiomyocyte specific MAO-A surexpression (supplementary figure 2B). As expected, forced MAO-A activity in cardiomyocytes induced *in vivo* an increased expression of the CDKI genes p16, p15 and p21, reflecting the triggering of oxidative stress induced cardiomyocyte senescence. These INK4 and p21 dependent senescence pathways were associated with significant induction of the three cardiomyocyte derived SASP factors, Gdf15, Tgfb2 and Edn3 while the non-secreted protein encoding genes, Pah and Knck1, were conversely significantly down-regulated (supplementary figure 2B).

Activation of p53 controls Prom2 and Gdf15 expression.

In order to evaluate the role of the p53 dependant pathway in SIPS and aged related cardiomyocyte gene expression, H9c2 were treated with nutlin3a, a potent inhibitor of p53-MDM2 interaction leading to p53 accumulation and senescence induction in serum-supplemented cell cultures (Leontieva and Blagosklonny, 2010). As expected, activation of the p53 pathway by nutlin3a induced the up-regulation of p21 relative gene expression but not of the INK4 family (p16, p15). H9c2 transduced with the p53RE and p21 lentiviral reporter vectors were treated by nutlin3a and analyzed by immunofluorescence microscopy (Figure 3B). We observed that nutlin3a treatment specifically increased the percentage of p53RE+ H9c2, single (p53RE+, p21-) or double (p53RE+ p21+) positive cells whereas the percentage of single p21+ H9c2 was not significantly modified (Figure 3C). Interestingly, as for doxo treatment, the stimulation of the p53 pathway, identified in double positive p53RE+ p21+ h9c2 treated cells was associated with significant increase in cell size compared with nutlin3a treated p53RE- p21- h9c2 and control h9c2 (Figure 3D).

We next analyzed the ability of p53 to up-regulate expression of genes associated with cardiomyocyte ageing. Relative gene expression analysis showed significant up-regulation of Prom2 and Gdf15 in Nutlin3a treated H9c2 whereas Pah, Kcnk1, Edn3 and Tgfb2 were not (Figure 3E). This result is in agreement with the presence of p53 response elements identified in the promoter of the human Prom2 gene (Lyakhov et al., 2008) and the human Gdf15 gene (Osada et al., 2007) suggesting a direct transcriptional control of these genes by the p53 protein in rat cells. In conclusion, we showed that nutlin3a treatment and increased p53 availability is intimately associated with cell size growth and partially reproduced transcriptional gene signature of aged cardiomyocytes with specific up-regulation of Prom2 and Gdf15 but not of Pah, Kcnk1, Edn3 and Tgfb2.

Induction of Prom2 gene expression is associated with physiological cardiac senescence in mice and rats.

In order to delineate a specific marker to identify senescent cardiomyocytes, we selected genes that were significantly increased with age, induced by SIPS and which encode plasmatic membrane (Prom2, Kcnk1) or intracellular (Pah) proteins, excluding secreted proteins (Gdf15, Edn3 and Tgfb2). We first evaluated the tissue-specificity of Prom2, Kcnk1 and Pah gene expression with ageing by comparison of cardiac tissue with others organs such as liver, kidney, lung, brain and the intestine from young or old mice. As shown in figure 4A, p16, p15 and p21 CDKIs were induced at various levels in several tissues and were not specific of the ageing heart, as previously reported (Sharpless and Sherr, 2015b). At the contrary, ageing induced major expression of Prom2, Kcnk1 and Pah in the heart compared to other tissues (Figure 4A). In order to check cell-specificity, we compared relative gene expression of Prom2, Kcnk1 and Pah in cardiomyocytes and in the stromal cell fraction constituted by heterogeneous non cardiomyocyte cell types such as endothelial cells, fibroblasts, smooth muscle cells and immune resident cells (Figure 4B). We observed, with ageing, a significant up-regulation of p16 and p21 CDKIs both in cardiomyocytes and cardiac stromal cells from old mice compared to young whereas p15 induction significantly increased in cardiomyocytes only. Relative expression of Prom2, Kcnk1 and Pah displayed a 20-fold increase in aged cardiomyocytes compared to young whereas ageing led to a 5-fold increase in cardiac stromal cells. These results confirmed that cardiomyocytes undergoing physiological senescence preferentially up-regulated the genes of interest compared to cardiac stromal cells.

We then evaluated the physiological senescence signature of cardiomyocytes in rats and confirmed the up-regulation of p16, p15 and p21 CDKI relative gene expression with ageing. Conversely, only

Prom2 gene expression was significantly increased in the heart of aged rats whereas Pah was unchanged and Kcnk1 significantly decreased (Figure 4C).

These results unambiguously identified Prom2 as a specific transcriptional signature of physiological cardiac senescence in mice and rats and prompted us to study this marker at the protein level.

Prom2 expression delineated hypertrophic senescent cardiomyocytes in aged mice and humans.

Thanks to the use of commercially available antibody against Prominin2 (see Material and Methods), immunohistofluorescence was performed on cardiac left ventricle cryosections from young or old mice and Prom2 staining was analyzed by confocal microscopy (Figure 5A). Numeration of cardiomyocytes positive for Prominin-2 showed increased percentage in aged mice compared to young (Figure 5B). In aged mice, bright Prominin-2 staining was observed in cardiomyocytes, close to and at the plasma membrane visualized by wheat germ agglutinin staining (WGA+) whereas in young mice, Prominin-2 staining was scattered and poorly co-localized with plasma membranes of cardiomyocytes.

In order to determine whether Prominin-2 expression could delineate senescent cardiomyocytes, mean cell area of aged Prom2+ or Prom2- cardiomyocytes was measured and compared with young cardiomyocytes (Figure 5C). We showed that cardiomyocytes from aged mice expressing Prom-2 were hypertrophic compared to aged Prom-2 negative cardiomyocytes and young cardiomyocytes, suggesting that Prom-2 expression specifically identified cardiomyocytes undergoing senescence-associated hypertrophy.

In order to explore the validity of such marker in humans, atrial biopsies from patients at different ages without cardiomyopathy were tested for PROM2 gene expression. Interestingly, we find a correlation between age and PROM2 expression, revealing increased gene expression of PROM2 in cardiac tissue with ageing (Figure 5D). To assess if pathological settings could modulate PROM2 expression with age, biopsies from aged patients with heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) or heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF) were tested for PROM2 gene expression (Figure 5E). Whereas p16 and p21 CDKI gene expression was not significantly increased compared to young donors, PROM2 was specifically up-regulated in aged donors with cardiac HEpEF. Interestingly, patients with HFpEF exhibit also left ventricular hypertrophy and these results are consistent with the above findings in aged mice, confirming the strong link between age-related pathology, cardiomyocyte hypertrophy and PROM2 expression in humans.

Discussion

In this study, we have characterized a network of genes specifically associated with cardiomyocyte senescence (Prom2, Pah, Kcnk1, Edn3, Gdf15, Tgfb2) and have compared their expression profile during physiological cardiac ageing in C57BL/6 mice and in different models of SIPS. Interestingly, three of these genes, Edn3, Kcnk1 and Pah, have previously been reported to be up-regulated in cardiac tissue from aged mice of the FBV background using microarrays (Inuzuka et al., 2009). A recent concept states that senescence pathways may vary according to organs and cell types so there is a need to identify specific molecular signature (Bernardes de Jesus and Blasco, 2012; Sharpless and Sherr, 2015b). Here, we provide evidence that combination of these markers identified by a high-throughput screening (RNAseq) on highly enriched cardiomyocytes from aged mice is highly specific for cardiomyocyte senescence in the context of ageing *in vivo* and in two different models of oxidative stress induce premature senescence *in vitro* (doxorubicin treatment or activation of MAO-A to generate H₂O₂ production).

The senescence of cardiomyocytes is characterized by the acquisition of an original SASP including both EDN3, GDF15 and TGFβ2. Induction of Gdf15 or Tgfb2 expression was also observed, at lesser extent, in cardiac stromal cells with ageing, and in some other organs during ageing. In a previous study, the secretion of these markers in the plasma of aged mice was validated by ELISA with a significant increase for EDN3 and GDF15, but a trend for TGFβ2 (Anderson R *et al.*, submitted). Nevertheless, the co-expression of these three genes by senescent cardiomyocytes could constitute a specific signature for cardiac ageing and a new secretory phenotype for this cell type. It should be interesting to consider studying this SASP for its autocrine and paracrine effects on surrounding cells. The use of recombinant endothelin3, TGFβ2 and GDF15, either alone or in combination to treat adult cardiomyocytes or H9c2 cells, as well as cardiac stromal cells, could give us information about their role in the induction of hypertrophy, fibrosis and paracrine senescence. Endothelin family peptides (EDN1, EDN2 and EDN3) and TGFβ2 are already known to promote cardiac cell hypertrophy (Bupha-Intr et al., 2012; Schultz et al., 2002b; Tamamori et al., 1996), but also to induce pro-fibrotic responses (Dobaczewski et al., 2011; Rodríguez-Pascual et al., 2014; Wu et al., 2016a). In addition, some other studies demonstrated that these molecules have the ability to promote the induction of senescence, making them good candidates for paracrine senescence (Katakura et al., 1999; Olmos et al., 2017). The expression of Edn3 and Tgfb2 could therefore cause a deleterious context for the development of cardiac pathologies with an action on the cardiomyocytes themselves but also the

neighboring cells. In addition, GDF15, which is a Tgf β receptor ligand, has a paradoxical effect on the heart. It is secreted during cardiac failure (Chan et al., 2016) and can exert a protective effect against ventricular dilatation in transverse aortic constriction models (TAC) (Xu et al., 2006). As such, GDF15 is a biomarker that tends to be used as a signature for cardiac injury (George et al., 2016). Other studies showed that GDF15 has a protective effect against apoptosis, but it remains an inducer of cardiomyocyte hypertrophy (Heger et al., 2010). In addition, the expression of Gdf15 is found in association with irradiation-induced SISP and cigarette smoke (Park et al., 2016b; Wu et al., 2016b). Interestingly, our experiments showed that part of the senescence signature of cardiomyocytes was dependent on the activation of p53. Using Nutlin3a, we observed specific activation of the p53/p21 pathway without activation of the INK4 family genes. Interestingly, both Prom2 and Gdf15, which display responsive elements for p53 in their promoters, showed upregulation with Nutlin3a (Lyakhov et al., 2008; Osada et al., 2007). During ageing, an important role for p53 has been demonstrated in the heart, which could explain the regulation of Prom2 and GDF15. The translation of our findings in the context of cardiac remodeling induced by stress *in vivo*, demonstrated the upregulation of classical senescence pathways such as p21 and p16 associated with Edn3, Gdf15 and Tgfb2 induction. However, in these two distinct models of cardiac stress, injection of doxorubicin and overexpression of cardiac MAO-A, we did not detect any up-regulation of Prom2, Pah or Kcnk1 suggesting a strong relationship between these genes and physiological senescence. Most interestingly, Prominin2 expression, which is induced both during mouse and rat cardiac ageing shows a good correlation with age in human atrial samples. In addition, analysis of Prominin2 expression revealed strong association of this marker with cardiomyocyte hypertrophy during ageing or during p53 dependent stress-induced senescence. Markedly, Prom2 was specifically upregulated in aged human samples that displayed cardiac hypertrophy and HFpEF suggesting a causative link between Prom2 expression and senescence-associated hypertrophy.

Prominin2 is a membrane glycoprotein originally identified in renal epithelial cells with structural and partial homology with prominin1 (CD133), a marker of stem cells (Fargeas et al., 2003; Walker et al., 2013). Prominin2 has been localized in cell protrusions, such as the primary cilium but its function remains poorly described. In the study performed by Singh et al., overexpression of Prominin 2 in fibroblasts increased the number of cilia and decreased the number of caveolae (Singh et al., 2013). Caveolae are membrane microdomains appearing as lipid invaginations, which are mainly composed of cholesterol and caveolin (Caveolin1 -2 or -3) (Parton and Simons, 2007) and serve as transduction platform for signaling pathways (Fridolfsson et al., 2014; Lamaze et al., 2017). Singh's study suggested that the Prominin 2 membrane could capture cholesterol, making it unavailable for caveola

formation. With aging, a disruption of caveolae structures is observed in cardiac tissue (Ratajczak et al., 2003) and a recent study demonstrated that decreasing caveolae in fibroblasts induced a senescent phenotype associated with mitochondrial dysfunction and activation of p53 (Yu et al.). In addition, caveolae negatively regulate cardiomyocyte hypertrophy *in vivo* and *in vitro* (Horikawa et al., 2011; Markandeya et al., 2015; Wu et al., 2017). Thus, overexpression of Prominin2 in senescent cardiomyocytes may reduce the amount of caveolae, promoting hypertrophy and cardiac dysfunction (Fridolfsson and Patel, 2013; Insel and Patel, 2009). This hypothesis will need to be evaluated in future studies.

We have demonstrated that senescent cardiomyocytes overexpressed Kcnk1 gene in mice but this gene expression profile was not conserved in rat or humans. The latter encodes a membrane protein which regulates potassium (K⁺) levels in cardiomyocytes during repolarization (Enyedi and Czirják, 2010; Lesage et al., 1997). KCNK1 is strongly expressed in the atria and to a lesser extent in the ventricles (Gaborit et al., 2007). However, its role in cardiac physiology and pathophysiology remains poorly described. Recent work by Christensen shows that repression of KcnK1 leads to atrial fibrillation (AF) in zebrafish and that decreased expression of Kcnk1 in humans is associated with AF (Christensen et al., 2016). In addition, another study demonstrated overexpression of Kcnk1 in the endocardium of IC patients, confirming that deregulation of KcnK1 expression is associated with a cardiac pathological context (Heidecker et al., 2010). Finally, the Pah gene, which encodes for an intracellular protein, phenylalanine hydroxylase is also a new marker of cardiomyocyte senescence. This protein mainly allows the hydrolysis of phenylalanine to tyrosine and its repression is the cause of a severe pathology phenylketonuria (Mitchell et al., 2011). Tyrosine is an essential amino acid for the synthesis of catecholamines (Fernstrom and Fernstrom, 2007) which are the substrates of MAO-A and MAO-B. These enzymes can be the source of oxidative stress, and by the latter, contribute to senescence induction in cardiomyocytes, as demonstrated in the first part of the study (Maggiorani et al., 2017). In accordance with our data, overexpression of Pah in the elderly heart has been previously reported, but this study did not evaluate cardiomyocyte specificity (Park et al., 2009).

In conclusion, we have identified a novel molecular signature specifically associated with cardiomyocyte senescence. We believe that the identification of these new markers could bring new and more fundamental notions on the general biology and function of cardiomyocytes in senescence. This specific characterization of gene expression networks associated with cardiomyocyte senescence will afford new opportunities to improve the complex monitoring of cardiac ageing.

Material and methods

Animals and procedure

For evaluation of gene expression during senescence, male C57BL/6J mice were purchased from Janvier-Labs and studied at the age of 3-5 months (young group, Y) and 20-24 months (old group, O). Heart and other organs (liver, kidney, lung, brain and intestine) were collected and snap-frozen in liquid nitrogen after lethal pentobarbital injection. Sprague Dawley rat from Janvier-Labs were sacrificed at 3 months (Young group, Y) or 24 months old (Old group, O) and the whole heart was collected and snap-frozen in liquid nitrogen. Study of cardiomyocytes senescence was performed on 20 weeks old C57BL/6 MAO transgenic mice (tg-MAO) with cardiac overexpression of monoamine oxidase-A (MAO-A) and control littermates. This animal model was previously designed and validated in our laboratory (Villeneuve et al., 2013) and allows the specific surexpression of MAO-A in the adult cardiomyocytes thanks to the alpha-MHC promoter. For the doxorubicine (doxo) treatment, 6 weeks old C57BL/6 mice were treated by intraperitoneal injection at day 0, day 4 and day 7 with 5 mg/kg doxo or PBS as control. Four weeks later, animals were sacrificed. All mice were maintained under specific pathogen-free conditions and handled according to procedures performed in accordance with the recommendations of the European Accreditation of Laboratory Animal Care (86/609/EEC) and guidelines established by the Ethics and Animal Safety Committee of INSERM Toulouse/ENVT (agreement number: C31 555 07).

Cell culture and stress induced premature senescence (SIPS)

H9c2 cells from ATCC (ATCC® CRL-1446™) were cultivated with DMEM-Glutamax (Gibco) containing 10 % SVF (Sigma-Aldrich) and 1 % penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich). Cells were incubated at 37°C under 5 % CO₂ in a humidified atmosphere and treatment started when cells reach 80% of confluence. During 96 h, the cells were daily treated with a freshly prepared solution of doxo (Sigma-Aldrich), nutlin3a (Sigma-Aldrich) or tyramine (Sigma-Aldrich). Doxo was used at 100 nM, tyramine at 500 µM and nutlin3a at 5 µM. For doxo and tyramine, distilled water was used as negative control and for nutlin3a treatment, DMSO 0.1 % was used as negative control.

Lentiviral transduction and quantification

The following lentivectors used in this study were developed by Vectalys in collaboration with our team: rLV_pTP53RE.TagZsGreen (p53 response element [p53RE]), rLV_pCDKN2A.TagTurboGFP (p16)

and rLV.pCDKN1A.TagTdTomato (p21). The transduction protocol was performed in agreement with Vectalys® instructions. Transduction was realized at 80 multiplicity of infection (MOI) with 4 µg/mL of polybrene. After 6 h, the vectors were removed, cells were washed and incubated with fresh medium for 72 h. Then, cells were treated with doxo, nutlin3a or tyramine as described above. After treatment, cells were washed with PBS and fixed 10 min with 4 % paraformaldehyde (PFA). After nuclei staining with DAPI (Sigma), cells were layered with mounting medium (fluoromount aqueous mounting medium, Sigma Aldrich) and covered with coverslips. Image acquisition was performed on a Zeiss Axio Observer Z.1m inverted microscope (Carl Zeiss). The fluorescence intensity and the size of 100 cells was quantified for each condition with imageJ software.

Cardiomyocytes isolation

After injection of intraperitoneal pentobarbital (200 mg/kg) and heparin (150 units), heart was isolated and placed in Krebs calcium free buffer (130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.4 mM MgCl₂, 0.4 mM NaH₂PO₄, 4.2 mM HEPES, 10 mM glucose, 20 mM taurine and 10 mM creatine monohydrate, pH 7.2). Then, the heart was quickly excised and the aorta was cannulated for retrograde perfusion in a Langendorff apparatus at a constant flow rate of 3 mL/min at 37 °C. The heart was perfused for 5 min with Krebs buffer, followed by 8-10 min of digestion with Krebs buffer containing 12.5 µM CaCl₂ (Sigma Aldrich) and 0.52 Wünsch/mL of liberase TM (Roche Diagnostics). After the digestion, the heart was removed and the left ventricle was dissected and minced with scissors. After complete releasing of cardiomyocytes, cells were placed in a stopping buffer containing Krebs buffer, CaCl₂ (12.5 µM) and 1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich). Dispersed myocytes were then filtered through a 200 µm mesh (Dutscher) and allowed to sediment by gravity for 10 min. The supernatant was removed and the pellet kept for RNA extraction at -80°C.

Stromal cells isolation

Adult mice were first anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (200 mg/kg) and heparin (150 units). The heart was washed with 10 mL of PBS perfusion and minced into small pieces of 2 mm². Heart pieces were digested, under agitation, at 37°C in RMPI medium (Gibco) +13 Wünsch/mL of liberase TM, twice for 10 min. This concentration of liberase did not allow the recovery of viable cardiomyocytes. After digestion, RPMI medium + 10 % SVF (Sigma) was added in order to stop the enzymatic reaction and the cellular fraction was filtered with a 100 µm mesh followed by a 40 µm mesh in order to remove large cell fragments and residual cardiomyocytes. Suspended cardiac stromal cells were pelleted by centrifugation (9 min, 1300 rpm).

RNA extraction from cells and tissue

Cells were lysed in RLT from RNA easy plus mini-kit (QIAGEN) supplemented with 1% β -mercaptoethanol. For whole tissue extraction, 30 mg of tissue was lysed in RLT + β -mercaptoethanol and mechanical homogenization with beads (3 min, 30 agitations/second, Precellys). Before RNA extraction, digestion was performed with 6 mAU of proteinase K (Qiagen) diluted in RNase free water for 10 min at 55°C. All RNA extractions were made by following instructions of the RNA easy plus mini-kit (QIAGEN). An additional step of genomic DNA elimination was performed thanks to the RNAase Free DNase set (Qiagen). After extraction, RNA concentration and quality were evaluated by spectrophotometry (ND-100 Nanodrop, thermofisher).

Retro transcription and Real-Time PCR

The RNA was retrotranscribed into cDNA by the High capacity cDNA retrotranscription kit™ (Applied biosystem). Real time PCR reaction was performed on a VIAA7 thermocycler system (Applied biosystem) in 384 wells by using the SYBR-Green reagent (Takara-Clontech) and specific primers. Gene transcripts were normalized to Gapdh (for mice and rat samples) and to B2M and RPLP0 (for human experiment) gene expression. Relative mRNA compared to control group was calculated using the comparative cycle threshold (CT) method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Primers used for PCR were the following:

Species	Gene	Forward	Reverse
Mice	Prom2	CCTTCCCGGCAGAGTTGATAA	AATCACAGCACACACCACGT
	Edn3	ACACGCTTGCGTTGTACTTG	CTCCCGGAATAACTGGTGACA
	Tgfb2	TCCCCTCCGAAAATGCCATC	ACTCTGCCTTCACCAGATTCTG
	Pah	TGGATAAGCGTAGCAAGCCC	CCAGGGCACTGTGTTCTTTTC
	Cdkn1a	GCAGAATAAAAGGTGCCACAGGC	CCGAAGAGACAACGGGCACACT
	Kcnk1	CGGAATCACGTGTTACCTGC	TGAACTTCTTCAGCTCGTGGA
	Cdkn2a	CCGAACTCTTTCGGTTCGTACCC	CTGCTACGTGAACGTTGCCCA
	Cdkn2b	AGATCCCAACGCCCTGAAC	CAGTTGGGTTCTGCTCCGT
	Gdf15	ACCAGAGCCGAGAGGACTCGAA	TGGGACCCCAATCTCACCTCTG
	Gapdh	AGGTTCCGGTGGAAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
Human	PROM2	TGTAGGGCCTTGTTGGGGTGA	AGAGCTACCGAAGTCCTGTGG
	CDKN1A	GACCATGTGGACCTGTCACT	GGAGTGGTAGAAATCTGTCATGC

	CDKN2A	GCACCAGAGGCAGTAACCAT	TTTCCCGAGGTTTCTCAGAGC
	CDKN1A	ACTAGTGGAGAAGGTGCGAC	CATCATCATGACCTGGATCGC
	β2MG	GATGAGTATGCCTGCCGTGT	TGCGGCATCTTCAAACCTCC
	RPLP0	TTGCTGGCCAATAAGGTGCC	AAAAGGAGGTCTTCTCGGGC
Rat	Prom2	CTATAGAACCCACCGGGCAAG	GGGCTCTGGAACAGAGGTTAC
	Pah	CGCTGCTAAGCTAGACACCTC	AGCTTGTTTCCTGCCCAAAGT
	Cdkn1a	TGTGATATGTACCAGCCACAGG	CGAACAGACGACGGCATACT
	Kcnk1	GCTGGAGGCCAGCAATTATG	CCATAGCCTGTGGTGGAGAG
	Cdkn2a	CCCCGATACAGGTGATGATG	CAGTTCGAATCTGCACCATAGG
	Cdkn2b	GACAGGTGGAGACGGTGC	GCCCATCATCATGACCTGGA
	Gapdh	TCTCTGCTCCTCCCTGTTCTA	TCCGATACGGCCAAATCCGTT

Immunofluorescence

Hearts were included in optimal cutting temperature compound (OCT) (Sigma Aldrich) and snap frozen under ice-cold 2-methylbutane (Sigma Aldrich). Heart frozen sections (5 μm) were fixed 10 min with 4 % PFA and permeabilized with triton X-100 0.2 % for 20 min. Then, unspecific sites were blocked with PBS, 2 % BSA (Sigma Aldrich) 1 h at room temperature. Incubation with specific primary Prominin2 antibody (Rabbit anti Prominin2, Abcam Ab74997, 1:100) was realized overnight at 4°C. After 3 washing with PBS-Tween 0.025%, incubation with secondary antibody (Goat anti rabbit-alexa fluor 488, Thermofisher A11008, 1:500) and texas-red WGA (Thermo fisher W21405, 1:100) was done. Nuclei were stained with DAPI (SIGMA) and slides were mounted with mounting medium (fluoromount Aqueous mounting medium, Sigma Aldrich). Images were acquired with confocal microscope LSM780 (Carl Zeiss). For the quantification of Prominin-2 positive cardiomyocytes (PROM2+), images were analyzed with ImageJ software and cells harboring 80% of Prominin-2 staining at the plasma membrane were considered as positive with a total count of 100 cardiomyocytes per heart. Cardiomyocyte area was measured with imageJ software

Western Blot

H9c2 cells were lysed using RIPA buffer (25mM Tris, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS) containing phosphatase (PhosStop, Roche) and protease inhibitors (Protease inhibitor cocktail, Sigma Aldrich). Equal amounts of protein were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred on nitrocellulose membrane (Transblot turbo transfer system, Biorad). After 1 h of blocking with PBS, 0.1 % Tween, 5 % BSA, incubation with primary

antibody (Rabbit anti p-p53, Cell Signaling 9284, 1:500; Mouse anti p21, Santa Cruz SC-6246, 1:200; Rabbit anti β -Actin, Cell signaling 4970, 1:500) was performed overnight at 4°C. Then, after 3 washings with PBS-Tween 0.1%, secondary HRP coupled antibody (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, Cell signaling 7074 1:1000; Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody, Cell signaling 7076 1:1000) was added and incubated 2 h at room temperature. Proteins were revealed by ECL-Prime (Biorad) and image acquired with Bio-Rad ChemiDoc XRS+ camera. Relative densities were quantified using the ImageLab 4.0 software (Bio-Rad) and β -Actin was used as loading control.

Human sampling:

Patients samples were obtained after informed consent in accordance with the declaration of Helsinki and stored at the “CRB Cancer des Hôpitaux de Toulouse (BB-0033-00014)” collection. According to the French law, CRB Cancer Collection has been declared to the Ministry of Higher Education and Research (DC-2008-463) and obtained a transfer agreement (AC-2008-820) after approbation by ethical committees. Clinical and biological annotations of the samples have been declared to the CNIL (Comité National Informatique et Libertés). Patients without cardiomyopathy and less than 60 years old were classified as young (Young group, Y). Patients without cardiomyopathy and more than 65 years old were classified as aged (Old group, O). Aged patients with heart failure were classified in two different categories. Patients with heart failure with preserved ejection fraction (O + HFpEF) and patients with heart failure with reduced ejection fraction (EF < 50 %) (O + HFrEF). Heart failure diagnostic was performed according to SFC (Société française de cardiologie) guidelines. Patients with HFpEF exhibit left ventricular hypertrophy (ventricular septum thickness > 12mm) which was measured by echocardiography.

Statistical analysis

Results are expressed as mean $\pm$ SEM. The statistical significance between the two compared groups was estimated with the unpaired student's two tailed t-test (t-test student) or with the nonparametric Mann-Whitney's U test (Mann-Whitney). Multiple comparisons were performed by 1-way ANOVA with Tukey's post-hoc test and for sample without Gaussian distribution with the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc test. Difference between groups were tested with Prism Software (version 7, GraphPad software) and considered significant for $P < 0.05$.

Acknowledgments:

The authors thank the staff of the animal facility (UMS1006), Maoret J.J. and Martins F. from the Genomic and Transcriptomic Facility (GET TQ), Fontaine L. (Histology platform) and Zanoun M. (Cellular Imaging Facility Rangueil-I2MC/TRI Plateform) for their skillful technical assistance. We thank Vectalys company for their advices for transduction protocol and for developing and providing high-purity lentiviral vectors in the context of our partnership. We thank Passos JF, Ducommun B and Couderc B for helpful discussion and advices. We also thank Adams PD. for the RNA_seq analysis. This work and Maggiorani D were supported by grants from the Conseil Régional Midi-Pyrénées and Midival.

Authors contribution:

M.D, M-P.J and D-E.V designed, performed research, analyzed data and wrote the paper. M.H, M.N, B.S, D.M and S.J performed some experiments and analyzed corresponding data. B.S and L.O constituted the human atrial bank and provided samples. G.R, I.A and D.C from Vectalys provided the lentivectors and helped for transduction protocol. P.JF, A.PD provided us RNA_seq results and analysis. P. A helped to design the research.

Legends

Figure 1. Doxorubicine drives cardiomyocyte senescence signature: **(A)** Real Time PCR gene expression of classic senescence signature in H9c2 treated 96 h with doxorubicine (doxo) or distilled water (ctrl). Data are mean $\pm$ SEM of relative expression vs ctrl group. n=4 or 7 independent experiments. Statistical analysis was performed by student t-test (Cdkn2a) or Mann-Whitney test (Cdkn2b, Cdkn1a). *P<0,05; ***P<0.001; P<0.0001 vs ctrl. **(B)** Evaluation of p21 and p-p53 (phosphorylated p53) protein expression by western blotting in ctrl treated and doxo treated H9c2. Data are mean $\pm$ SEM of n=4 experiments. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney test. *P<0,05 vs ctrl. **(C)** Representative epifluorescence acquisition of H9c2 transduced by p21 (red) and p53RE (green) lentivectors and treated with doxo or distilled water (ctrl). Nuclei (blue) were stained with DAPI. Scale bar = 100 μ m. **(D)** The number of fluorescent single positive cells for p21 (p21⁺) or p53RE (p53⁺) and double positive cells (p21⁺/p53⁺) was evaluated in doxo treated cell and control after microscopic fluorescence acquisition. Data are mean $\pm$ SEM of n=3 experiments. Statistical analysis was performed by student t-test. *P<0,05; **P<0.01; ***P<0.001 vs control. **(E)** Area measurement of double positive cells for p53RE and p21 (doxo p21⁺ p53⁺) and double negative (doxo p21⁻ p53⁻) in doxo treated cells compared to double negative control cells (ctrl p21⁻ p53⁻). Data are mean $\pm$ SEM of n=3 experiments. Statistical analysis was performed by One-Way ANOVA. *P<0,05; **P<0.01. **(F)** Cardiomyocyte signature gene expression was analyzed by Real Time PCR after doxo treatment. Data are mean $\pm$ SEM of relative gene expression vs ctrl group. n=7 experiments. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney test. *P<0,05; **P<0.01; ***P<0.001 vs ctrl.

Figure 2. MAO activation leads to a partial cardiomyocyte senescence phenotype acquisition in H9c2: Real Time PCR gene expression of classic senescence markers and cardiomyocyte related senescence markers in H9c2 cells treated 96 h with tyramine 500 μ m (tyr) or distilled water (ctrl). Data are mean $\pm$ SEM of relative gene expression vs ctrl group. n=2 experiments.

Figure 3. Activation of p53 axis controls expression of Prom2 and Gdf15 gene expression: **(A)** Real Time PCR Gene expression of classic senescence markers in H9c2 treated 96 h with 5 μ M nutlin3a (nut) or DMSO 0.1 % (ctrl). Data are mean $\pm$ SEM of relative gene expression vs control group. n=4 experiments. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney test. P* P<0,05 vs ctrl. **(B)** Representative epifluorescence acquisition of H9c2 transduced by p21 (red) and p53RE (green) lentivectors and treated with nutlin3a (nut) or DMSO (ctrl). Nuclei (blue) were stained with DAPI.

Scale bar = 100µm. **(C)** The number of fluorescent single positive cells for p21 (p21⁺) or p53RE (p53⁺) and double positive cells (p21⁺/p53⁺) was evaluated in nut treated cell and ctrl after microscopic fluorescence acquisition. Data are mean ± SEM of n=3 experiments. Statistical analysis was performed by student t-test. *P<0,05; ***P<0.001 vs ctrl. **(D)** Area measurement of double positive cells for p53RE and p21 (nut p21⁺ p53⁺) and double negative (nut p21⁻ p53⁻) in nutlin3a treated cells compared to double negative control cells (ctrl p21⁻ p53⁻). Data are mean ± SEM of n=3 experiments. Statistical analysis was performed by One-Way ANOVA. *P<0,05; **P<0.01 **(E)** Relative expression of cardiomyocyte related senescence markers was analyzed by Real Time PCR after nutlin3a treatment. Data are mean ± SEM of relative gene expression vs ctrl group. n=4 experiments. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney test. *P<0,05 vs ctrl.

Figure 4. Prom2 is a specific marker of cardiomyocyte senescence: **(A)** Comparison of relative gene expression between different organs during aging (Heart, Liver, Kidney, Lung, Brain, Intestine). Data are mean relative gene expression in old (20 months) vs young (3 months) mice ± SEM. n= 7 heart, n=6 liver, n=6 kidney, n=10 lung, n=4 brain, n=6 intestine. Analysis was performed by student t-test. *P<0,05; **P<0.01; ***P<0.001 vs young group. **(B)** Evaluation of relative gene expression in isolated stromal cells (bottom panel) and cardiomyocytes (top panel) in old (O) and young (Y) mice. Data are mean ± SEM of relative gene expression vs Y group. n=8 animals per group. Statistical analysis was performed by student t-test or Mann-Whitney. *P<0,05; **P<0.01; ***P<0.001; P<0.0001 vs Y. **(C)** Real-Time PCR gene expression of cardiomyocyte related senescence markers in whole heart from young (3 months, Y) and old (24 months, O) rats. Data are mean ± SEM of relative gene expression vs Y group. n=6 animals per group. Statistical analysis was performed by student t-test (Cdkn2a, Cdkn2b, Prom2, Kcnk1) or Mann-Whitney (Cdkn1a, Pah). *P<0,05; **P<0.01 vs Y.

Figure 5. Prom2 is associated with hypertrophy in mice and human: **(A)** Representative confocal acquisition of Prominin2 protein expression (PROM2, green) and membrane staining (WGA, red) after immunofluorescence staining in young (3 months) and old (20 months) cross sectional mice heart. Scale bar = 20µm. **(B)** Quantification of PROM2⁺ cardiomyocytes in young (Y) and old (O) mice. Data are mean ± SEM of n=6 animals per group. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney test. **P<0,01 vs Y. **(C)** Area measurement of PROM2⁺ (O Prom2⁺) and PROM2⁻ cardiomyocytes (O Prom2⁻) in old mice and comparison with PROM2⁻ cardiomyocytes in young (Y Prom2⁻) mice. Data are mean ± SEM of n=6 animals per group. 100 cardiomyocytes per mice were analyzed. Statistical analysis was

performed by student t-test or Mann-Whitney test (O, Prom2- vs Y, Prom2-) **P<0,01. **(D)** Correlation between human patient age and PROM2 relative gene expression (vs reference gene RPLP0 and B2MG). n=12 patients. **(E)** Gene expression of CDKIs and PROM2 was investigated in human atrial samples of young (age < 60 years, Y), old (age > 65 years, O), old + Heart Failure with preserved Ejection Fraction (O + HFpEF) and old + Heart Failure with reduced Ejection Fraction (O + HFrEF) patients. Data are mean $\pm$ SEM of relative expression vs Y group. n=4 Y, n=9 O, n=9 O + HFpEF, n=10 O + HFrEF. Multiple comparison test Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc was performed for statistical analysis. * P<0,05.

Supplementary figure 1: (A) Schematic Protocol for doxorubicine induced cardiac senescence. **(B)** Relative gene expression of classic and specific cardiomyocyte senescence markers in whole heart of doxorubicine treated mice (doxo) and control (ctrl). Data are mean $\pm$ SEM of relative gene expression vs ctrl mice. n=5 animals per group. Statistical analysis was performed by student t-test or Mann-Whitney test (Cdkn2a, Cdkn1a, Tgfb2). *P<0,05; **P<0.01 vs ctrl.

Supplementary figure 2: (A) Representative epifluorescence images of H9c2 cells transduced with p16 (green) and p21 (red) lentivectors and treated 10 d with 500 μ M of tyramine or distilled water (ctrl). Scale bar = 100 μ m. **(B)** Real time PCR of senescence gene expression in 20 weeks old tg-MAO (tg-MAO) and control littermates (Ctrl). Data are mean $\pm$ SEM of relative gene expression vs ctrl. n=4-6 animals per group. Statistical analysis was performed by student t-test or Mann-Whitney test (Edn3). *P<0.05; **P<0.01 vs ctrl.

References

- Bernardes de Jesus, B., and Blasco, M.A. (2012). Assessing Cell and Organ Senescence Biomarkers. *Circ. Res.* 111, 97–109.
- Bersell, K., Arab, S., Haring, B., and Kühn, B. (2009). Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell* 138, 257–270.
- Bupha-Intr, T., Haizlip, K.M., and Janssen, P.M.L. (2012). Role of Endothelin in the Induction of Cardiac Hypertrophy In Vitro. *PLOS ONE* 7, e43179.
- Chan, M.M.Y., Santhanakrishnan, R., Chong, J.P.C., Chen, Z., Tai, B.C., Liew, O.W., Ng, T.P., Ling, L.H., Sim, D., Leong, K.T.G., et al. (2016). Growth differentiation factor 15 in heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction. *Eur. J. Heart Fail.* 18, 81–88.
- Childs, B.G., Durik, M., Baker, D.J., and van Deursen, J.M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat. Med.* 21, 1424–1435.
- Christensen, A.H., Chatelain, F.C., Huttner, I.G., Olesen, M.S., Soka, M., Feliciangeli, S., Horvat, C., Santiago, C.F., Vandenberg, J.I., Schmitt, N., et al. (2016). The two-pore domain potassium channel, TWIK-1, has a role in the regulation of heart rate and atrial size. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 97, 24–35.
- Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S.A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J.R., Laberge, R.-M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dollé, M.E.T., et al. (2014). An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Dev. Cell* 31, 722–733.
- Dobaczewski, M., Chen, W., and Frangogiannis, N.G. (2011). Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51, 600–606.
- Ek, W.E., Hedman, Å.K., Enroth, S., Morris, A.P., Lindgren, C.M., Mahajan, A., Gustafsson, S., Gyllenstein, U., Lind, L., and Johansson, Å. (2016). Genome-wide DNA methylation study identifies genes associated with the cardiovascular biomarker GDF-15. *Hum. Mol. Genet.* 25, 817–827.
- Enyedi, P., and Czirják, G. (2010). Molecular Background of Leak K⁺ Currents: Two-Pore Domain Potassium Channels. *Physiol. Rev.* 90, 559–605.
- Fargeas, C.A., Florek, M., Huttner, W.B., and Corbeil, D. (2003). Characterization of Prominin-2, a New Member of the Prominin Family of Pentaspan Membrane Glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 278, 8586–8596.
- Fernstrom, J.D., and Fernstrom, M.H. (2007). Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *J. Nutr.* 137, 1539S–1547S; discussion 1548S.
- Fridolfsson, H.N., and Patel, H.H. (2013). Caveolin and caveolae in age associated cardiovascular disease. *J. Geriatr. Cardiol. JGC* 10, 66–74.
- Fridolfsson, H.N., Roth, D.M., Insel, P.A., and Patel, H.H. (2014). Regulation of intracellular signaling and function by caveolin. *FASEB J.* 28, 3823–3831.
- Gaborit, N., Le Bouter, S., Szuts, V., Varro, A., Escande, D., Nattel, S., and Demolombe, S. (2007). Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J. Physiol.* 582, 675–693.
- George, M., Jena, A., Srivatsan, V., Muthukumar, R., and Dhandapani, V.E. (2016). GDF 15--A Novel Biomarker in the Offing for Heart Failure. *Curr. Cardiol. Rev.* 12, 37–46.

- Heger, J., Schiegnitz, E., von Waldthausen, D., Anwar, M.M., Piper, H.M., and Euler, G. (2010). Growth differentiation factor 15 acts anti-apoptotic and pro-hypertrophic in adult cardiomyocytes. *J. Cell. Physiol.* 224, 120–126.
- Heidecker, B., Lamirault, G., Kasper, E.K., Wittstein, I.S., Champion, H.C., Breton, E., Russell, S.D., Hall, J., Kittleson, M.M., Baughman, K.L., et al. (2010). The gene expression profile of patients with new-onset heart failure reveals important gender-specific differences. *Eur. Heart J.* 31, 1188–1196.
- Horikawa, Y.T., Panneerselvam, M., Kawaraguchi, Y., Tsutsumi, Y.M., Ali, S.S., Balijepalli, R.C., Murray, F., Head, B.P., Niesman, I.R., Rieg, T., et al. (2011). Cardiac-specific overexpression of caveolin-3 attenuates cardiac hypertrophy and increases natriuretic peptide expression and signaling. *J. Am. Coll. Cardiol.* 57, 2273–2283.
- Insel, P.A., and Patel, H.H. (2009). Membrane rafts and caveolae in cardiovascular signaling. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 18, 50–56.
- Inuzuka, Y., Okuda, J., Kawashima, T., Kato, T., Niizuma, S., Tamaki, Y., Iwanaga, Y., Yoshida, Y., Kosugi, R., Watanabe-Maeda, K., et al. (2009). Suppression of phosphoinositide 3-kinase prevents cardiac aging in mice. *Circulation* 120, 1695–1703.
- Katakura, Y., Nakata, E., Miura, T., and Shirahata, S. (1999). Transforming growth factor beta triggers two independent-senescence programs in cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 110–115.
- Kempf, T., and Wollert, K.C. (2009). Growth differentiation factor-15: a new biomarker in cardiovascular disease. *Herz* 34, 594–599.
- Lamaze, C., Tardif, N., Dewulf, M., Vassilopoulos, S., and Blouin, C.M. (2017). The caveolae dress code: structure and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 47, 117–125.
- Lattmann, T., Shaw, S., Münter, K., Vetter, W., and Barton, M. (2005). Anatomically distinct activation of endothelin-3 and the L-arginine/nitric oxide pathway in the kidney with advanced aging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327, 234–241.
- Lazzarini, V., Mentz, R.J., Fiuzat, M., Metra, M., and O'Connor, C.M. (2013). Heart failure in elderly patients: distinctive features and unresolved issues. *Eur. J. Heart Fail.* 15, 717–723.
- Leontieva, O.V., and Blagosklonny, M.V. (2010). DNA damaging agents and p53 do not cause senescence in quiescent cells, while consecutive re-activation of mTOR is associated with conversion to senescence. *Aging* 2, 924–935.
- Lesage, F., Lauritzen, I., Duprat, F., Reyes, R., Fink, M., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997). The structure, function and distribution of the mouse TWIK-1 K⁺ channel. *FEBS Lett.* 402, 28–32.
- Lyakhov, I.G., Krishnamachari, A., and Schneider, T.D. (2008). Discovery of novel tumor suppressor p53 response elements using information theory. *Nucleic Acids Res.* 36, 3828–3833.
- Maggiorani, D., Manzella, N., Edmondson, D.E., Mattevi, A., Parini, A., Binda, C., and Mialet-Perez, J. (2017). Monoamine Oxidases, Oxidative Stress, and Altered Mitochondrial Dynamics in Cardiac Ageing.
- Mahmoud, A.I., Kocabas, F., Muralidhar, S.A., Kimura, W., Koura, A.S., Thet, S., Porrello, E.R., and Sadek, H.A. (2013). Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature* 497, 249–253.
- Markandeya, Y.S., Phelan, L.J., Woon, M.T., Keefe, A.M., Reynolds, C.R., August, B.K., Hacker, T.A., Roth, D.M., Patel, H.H., and Balijepalli, R.C. (2015). Caveolin-3 Overexpression Attenuates Cardiac Hypertrophy via Inhibition of T-type Ca²⁺ Current Modulated by Protein Kinase C α in Cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 290, 22085–22100.

- Mitchell, J.J., Trakadis, Y.J., and Scriver, C.R. (2011). Phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet. Med.* 13, 697–707.
- Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., et al. (2013). Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. *Cell* 155, 1104–1118.
- Olmos, G., Martínez-Miguel, P., Alcalde-Estevez, E., Medrano, D., Sosa, P., Rodríguez-Mañas, L., Naves-Díaz, M., Rodríguez-Puyol, D., Ruiz-Torres, M.P., and López-Ongil, S. (2017). Hyperphosphatemia induces senescence in human endothelial cells by increasing endothelin-1 production. *Aging Cell*.
- Osada, M., Park, H.L., Park, M.J., Liu, J.-W., Wu, G., Trink, B., and Sidransky, D. (2007). A p53-type response element in the GDF15 promoter confers high specificity for p53 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 913–918.
- Park, H., Kim, C.-H., Jeong, J.-H., Park, M., and Kim, K.S. (2016). GDF15 contributes to radiation-induced senescence through the ROS-mediated p16 pathway in human endothelial cells. *Oncotarget* 7, 9634–9644.
- Park, S.-K., Kim, K., Page, G.P., Allison, D.B., Weindruch, R., and Prolla, T.A. (2009). Gene expression profiling of aging in multiple mouse strains: identification of aging biomarkers and impact of dietary antioxidants. *Aging Cell* 8, 484–495.
- Parton, R.G., and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 185–194.
- Pasumarthi, K.B.S., and Field, L.J. (2002). Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circ. Res.* 90, 1044–1054.
- Patterson, M., Barske, L., Van Handel, B., Rau, C.D., Gan, P., Sharma, A., Parikh, S., Denholtz, M., Huang, Y., Yamaguchi, Y., et al. (2017). Frequency of mononuclear diploid cardiomyocytes underlies natural variation in heart regeneration. *Nat. Genet.* 49, 1346–1353.
- Puente, B.N., Kimura, W., Muralidhar, S.A., Moon, J., Amatruda, J.F., Phelps, K.L., Grinsfelder, D., Rothermel, B.A., Chen, R., Garcia, J.A., et al. (2014). The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response. *Cell* 157, 565–579.
- Ratajczak, P., Damy, T., Heymes, C., Oliviero, P., Marotte, F., Robidel, E., Sercombe, R., Boczkowski, J., Rappaport, L., and Samuel, J.-L. (2003). Caveolin-1 and -3 dissociations from caveolae to cytosol in the heart during aging and after myocardial infarction in rat. *Cardiovasc. Res.* 57, 358–369.
- Rodríguez-Pascual, F., Busnadiego, O., and González-Santamaría, J. (2014). The profibrotic role of endothelin-1: Is the door still open for the treatment of fibrotic diseases? *Life Sci.* 118, 156–164.
- Sahin, E., Colla, S., Liesa, M., Moslehi, J., Müller, F.L., Guo, M., Cooper, M., Kotton, D., Fabian, A.J., Walkey, C., et al. (2011). Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* 470, 359–365.
- Schultz, J.E.J., Witt, S.A., Glascock, B.J., Nieman, M.L., Reiser, P.J., Nix, S.L., Kimball, T.R., and Doetschman, T. (2002). TGF- β 1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J. Clin. Invest.* 109, 787–796.
- Senyo, S.E., Steinhauser, M.L., Pizzimenti, C.L., Yang, V.K., Cai, L., Wang, M., Wu, T.-D., Guerin-Kern, J.-L., Lechene, C.P., and Lee, R.T. (2013). Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* 493, 433–436.
- Sharpless, N.E., and Sherr, C.J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nat. Rev. Cancer* 15, 397–408.
- Singh, R.D., Schroeder, A.S., Scheffer, L., Holicky, E.L., Wheatley, C.L., Marks, D.L., and Pagano, R.E. (2013). Prominin-2 expression increases protrusions, decreases caveolae and inhibits Cdc42 dependent fluid phase endocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434, 466–472.

- Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M.C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J., et al. (2013). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* 155, 1119–1130.
- Tamamori, M., Ito, H., Adachi, S., Akimoto, H., Marumo, F., and Hiroe, M. (1996). Endothelin-3 induces hypertrophy of cardiomyocytes by the endogenous endothelin-1-mediated mechanism. *J. Clin. Invest.* 97, 366–372.
- Villeneuve, C., Guilbeau-Frugier, C., Sicard, P., Lairez, O., Ordener, C., Duparc, T., De Paulis, D., Couderc, B., Spreux-Varoquaux, O., Tortosa, F., et al. (2013). p53-PGC-1 α pathway mediates oxidative mitochondrial damage and cardiomyocyte necrosis induced by monoamine oxidase-A upregulation: role in chronic left ventricular dysfunction in mice. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 5–18.
- Walker, T.L., Wierick, A., Sykes, A.M., Waldau, B., Corbeil, D., Carmeliet, P., and Kempermann, G. (2013). Prolamin-1 allows prospective isolation of neural stem cells from the adult murine hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 3010–3024.
- Walsh, S., Pontén, A., Fleischmann, B.K., and Jovinge, S. (2010). Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo--an analysis based on cardiomyocyte nuclei. *Cardiovasc. Res.* 86, 365–373.
- Wu, D., Xie, F., Xiao, L., Feng, F., Huang, S., He, L., Liu, M., Zhou, Q., Li, L., and Chen, L. (2017). Caveolin-1-Autophagy Pathway Mediated Cardiomyocyte Hypertrophy Induced by Apelin-13. *DNA Cell Biol.* 36, 611–618.
- Wu, M.-H., Huang, P.-H., Hsieh, M., Tsai, C.-H., Chen, H.-T., and Tang, C.-H. (2016a). Endothelin-1 promotes epithelial–mesenchymal transition in human chondrosarcoma cells by repressing miR-300. *Oncotarget* 7, 70232–70246.
- Wu, Q., Jiang, D., Matsuda, J.L., Ternyak, K., Zhang, B., and Chu, H.W. (2016b). Cigarette Smoke Induces Human Airway Epithelial Senescence via Growth Differentiation Factor 15 Production. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 55, 429–438.
- Xu, J., Kimball, T.R., Lorenz, J.N., Brown, D.A., Bauskin, A.R., Klevitsky, R., Hewett, T.E., Breit, S.N., and Molkentin, J.D. (2006). GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation. *Circ. Res.* 98, 342–350.
- Yu, D.-M., Jung, S.H., An, H.-T., Lee, S., Hong, J., Park, J.S., Lee, H., Lee, H., Bahn, M.-S., Lee, H.C., et al. Caveolin-1 deficiency induces premature senescence with mitochondrial dysfunction. *Aging Cell* n/a-n/a.
- Zhu, F., Li, Y., Zhang, J., Piao, C., Liu, T., Li, H.-H., and Du, J. (2013). Senescent cardiac fibroblast is critical for cardiac fibrosis after myocardial infarction. *PLoS One* 8, e74535.

Figures

Figure 1

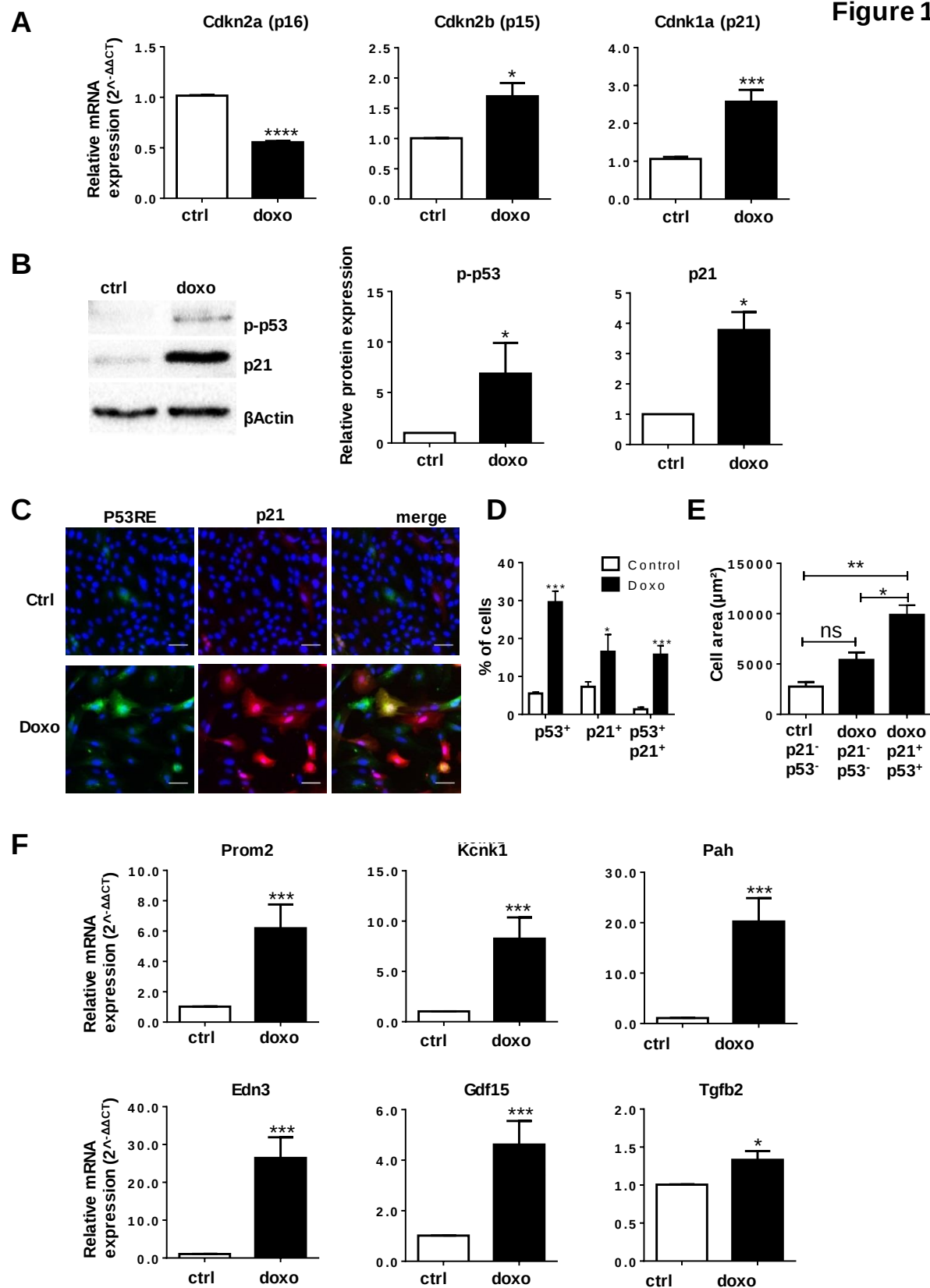


Figure 2

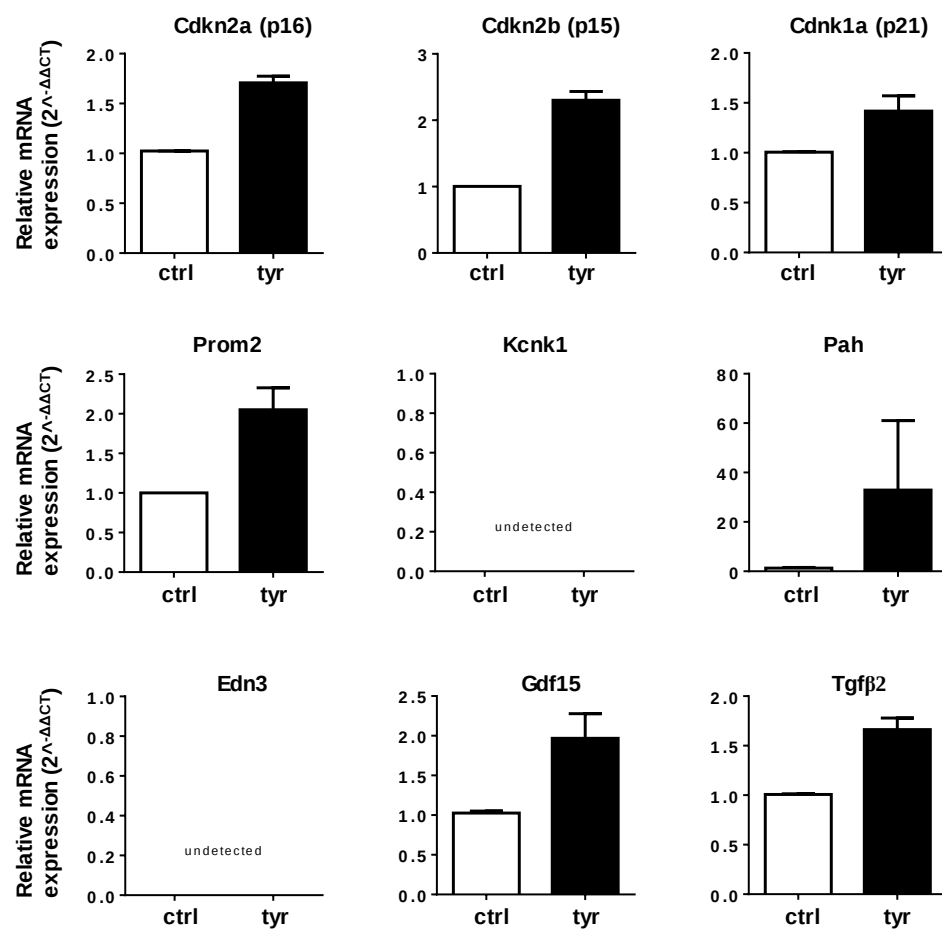


Figure 3

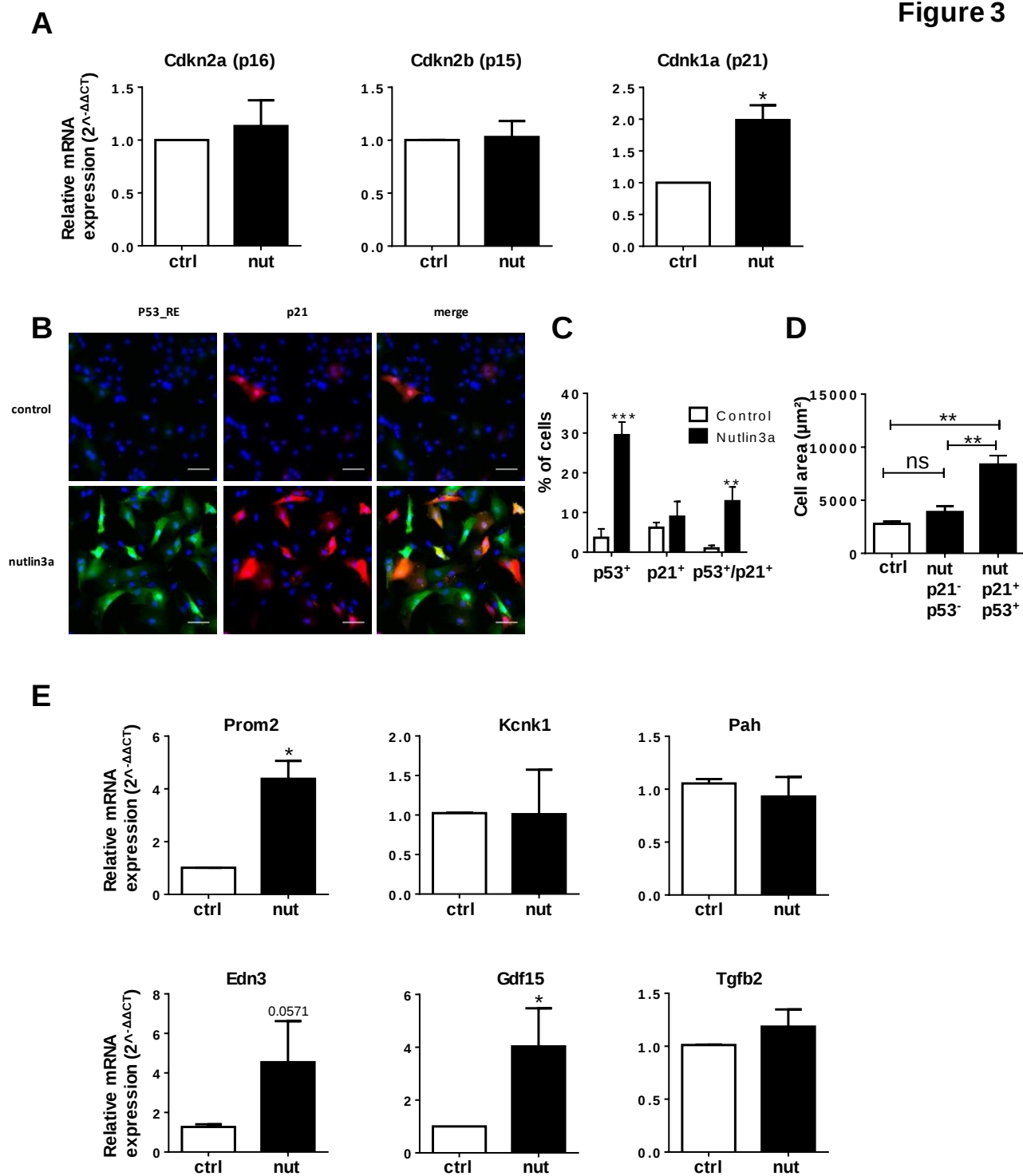
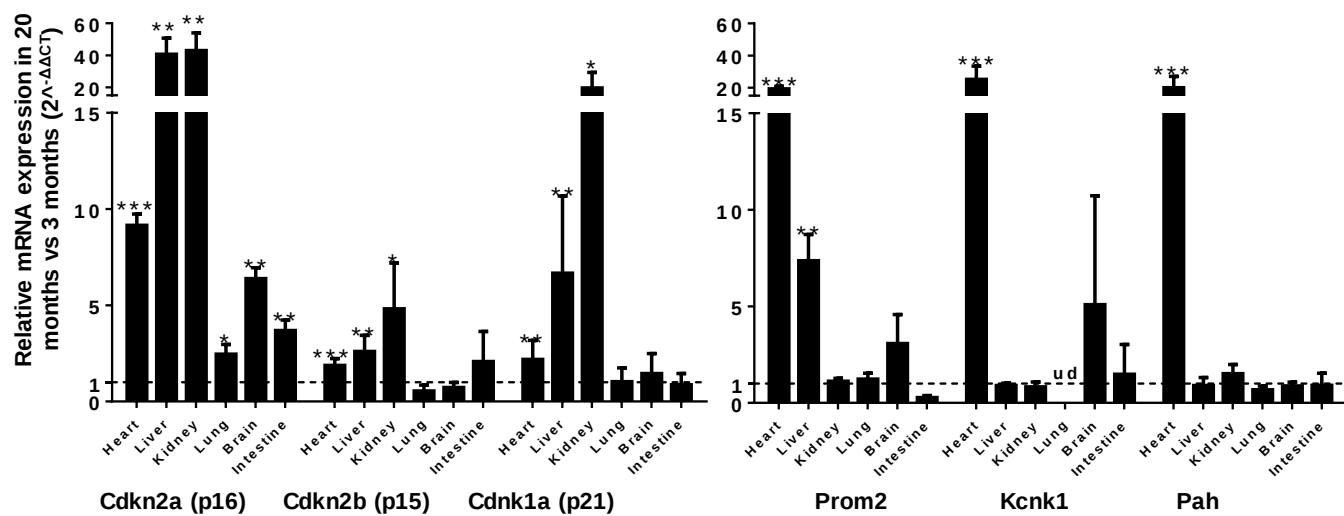
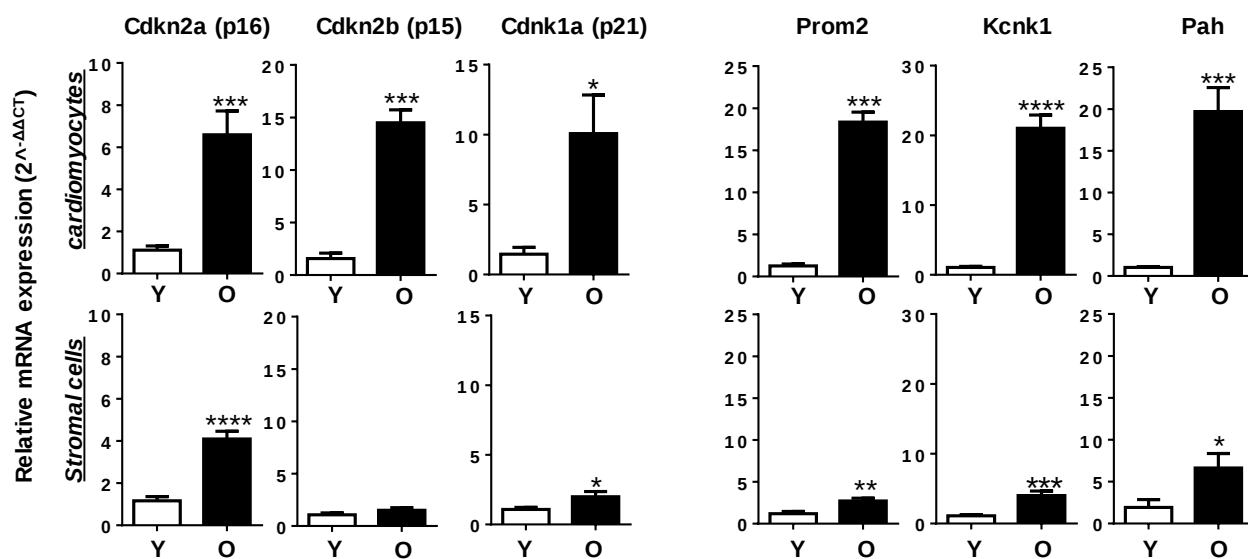


Figure 4

A



B



C

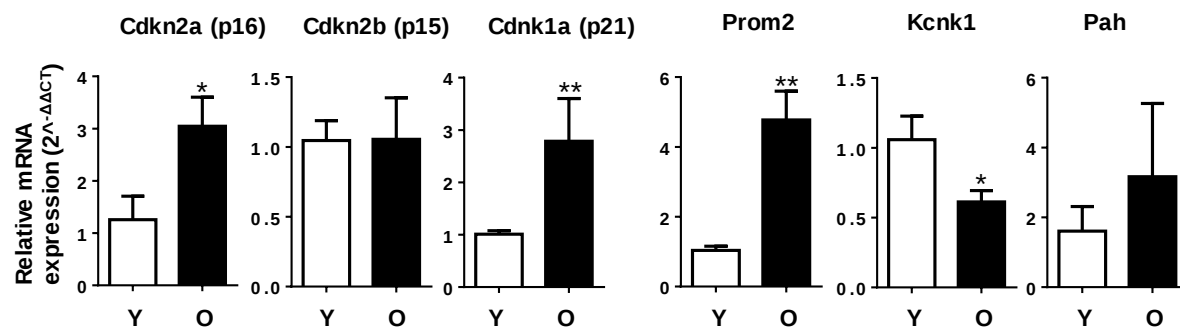
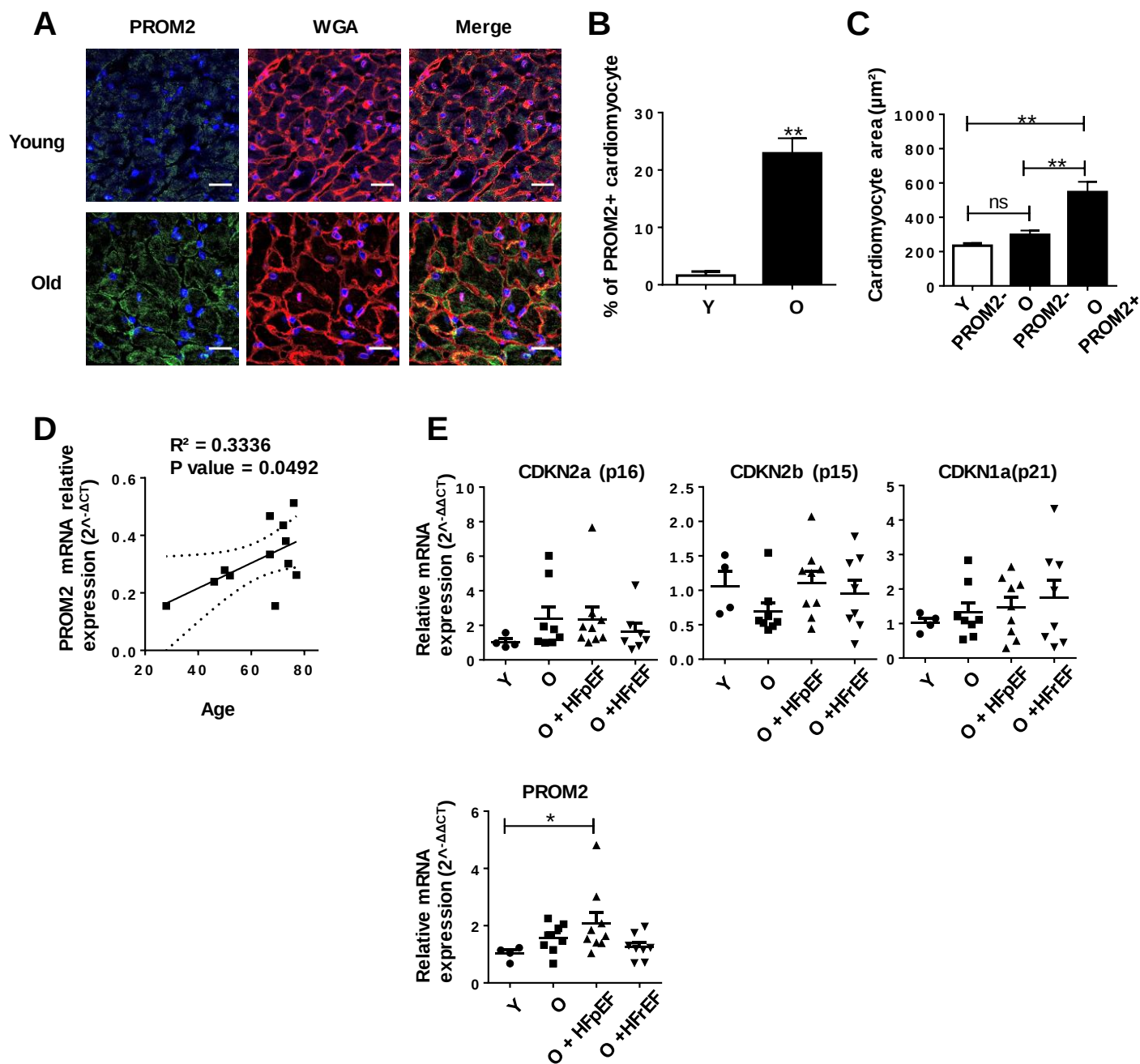
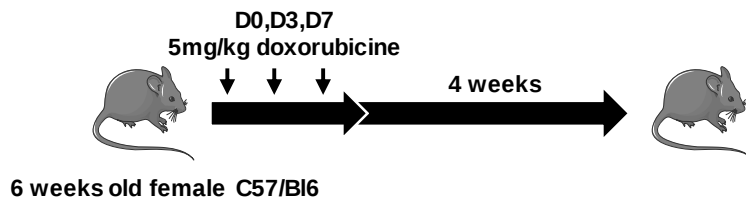


Figure 5

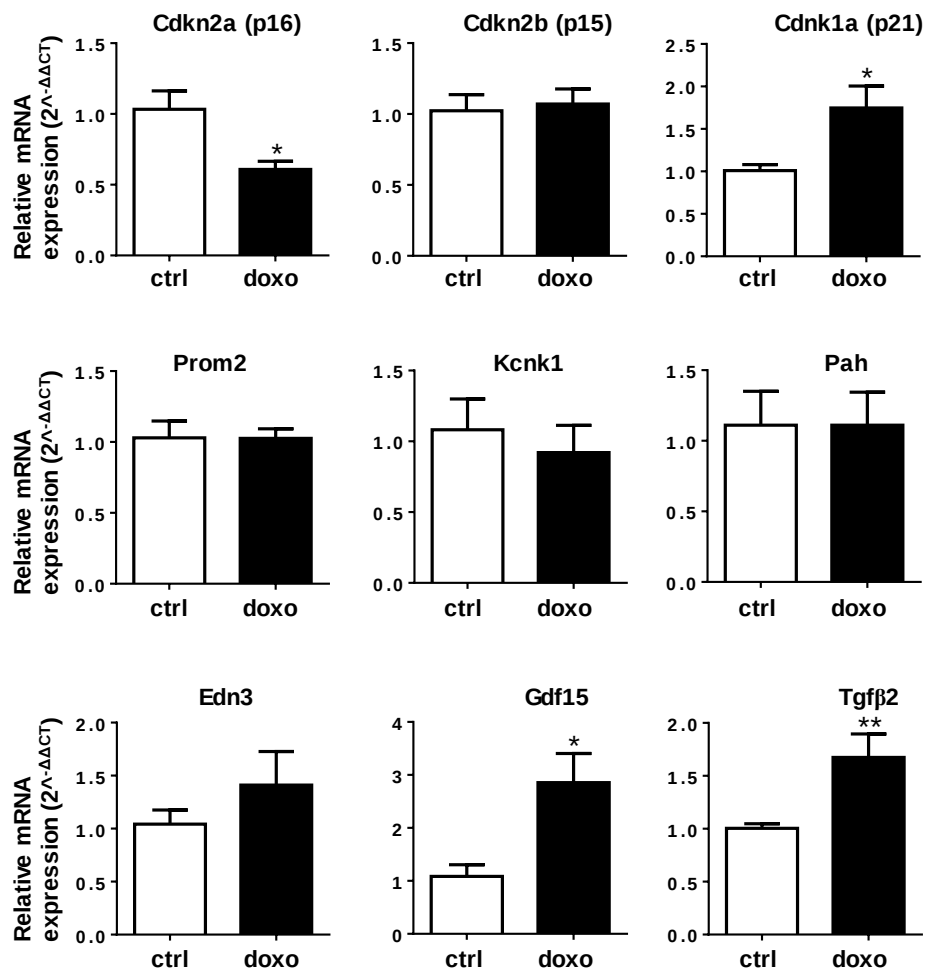


Supplementary Figure 1

A

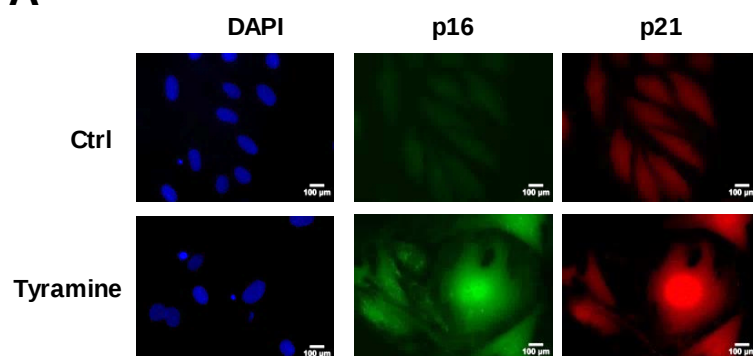


B

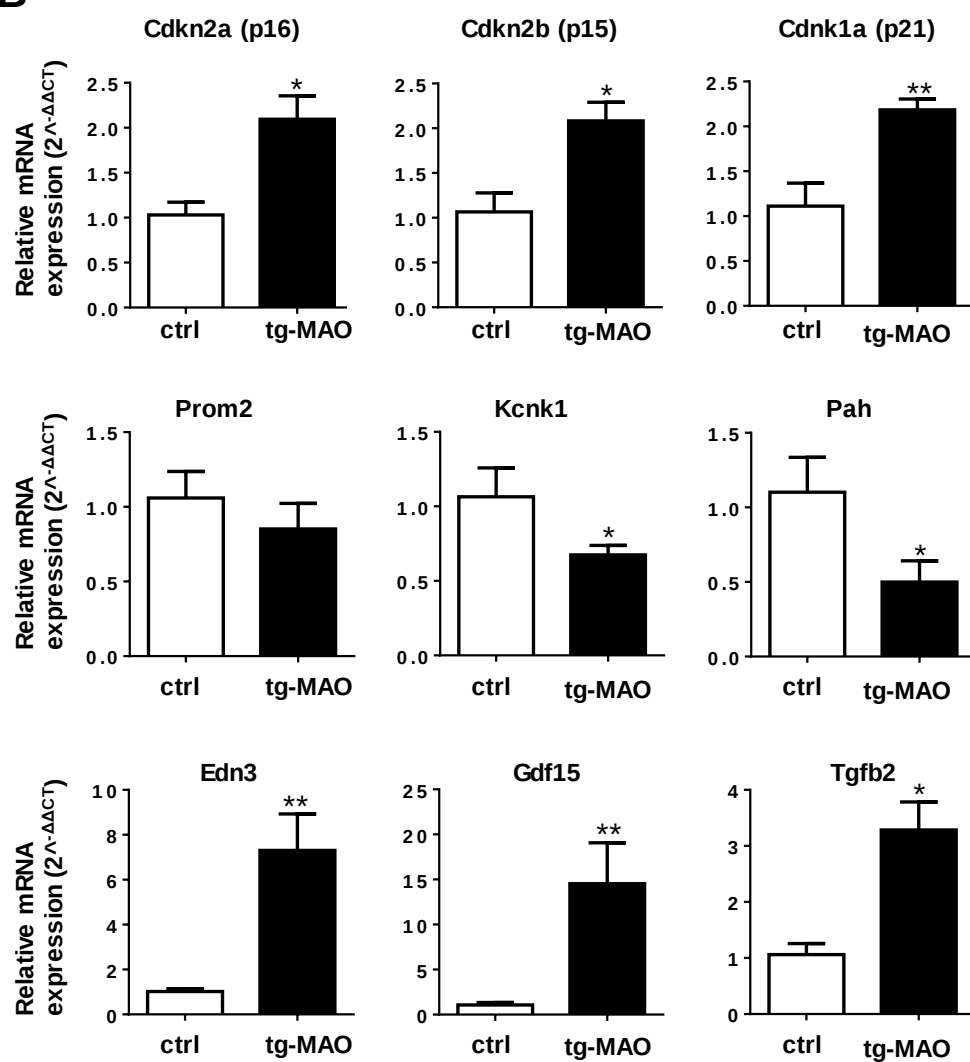


Supplementary Figure 2

A



B



Conclusion de la seconde étude

Dans cette étude nous avons validé trois gènes non sécrétés (Prom2, Kcnk1 et Pah) et trois gènes sécrétés (Edn3, Tgf β 2 et Gdf15) qui signent spécifiquement la sénescence des cardiomyocytes dans un contexte de vieillissement physiologique mais aussi de SIPS. Enfin, chez l'homme nous avons observé une augmentation de l'expression de la Prom2 dans des biopsies cardiaques de sujets âgés présentant une hypertrophie associée à une ICPEP. Ces résultats suggèrent la présence de cardiomyocytes sénescents dans le cœur de ces patients puisque le gène Prom2 est spécifiquement exprimé par les cardiomyocytes et non par les cellules du stroma cardiaque. De plus, il est intéressant d'observer que l'expression de la Prominin-2 diminue chez les patients âgés présentant une ICPEA. Ce résultat suggère un rôle spécifique des cellules sénescents lors de l'ICPEP, une pathologie dont l'incidence augmente considérablement au cours du vieillissement.

Ces données, en plus de nous apporter de nouveaux outils d'identification précis de la sénescence des cardiomyocytes peuvent aussi rendre compte de modifications de fonctions cellulaires associées à l'acquisition du phénotype sénescents. En effet, la Prominin-2 peut être impliquée dans l'hypertrophie, le Kcnk1 dans la contraction et le Pah dans la biogénèse locale des catécholamines. Concernant les gènes sécrétés, ils peuvent constituer un profil sécrétoire unique qui possède des actions autocrines et paracrines dans l'hypertrophie, la fibrose et l'induction de la sénescence.

Conclusions et perspectives générales

Le vieillissement de la population favorise le développement de pathologies chroniques. Parmi les mécanismes impliqués dans la survenue de ces pathologies, la sénescence cellulaire joue un rôle particulier. En effet, la sénescence, un mécanisme qui modifie en profondeur la transcription génique et la biologie des cellules, joue un rôle délétère lors du vieillissement (Baker et al., 2016). Cependant, le rôle de la sénescence dans la survenue de pathologies cardiaques avec le vieillissement demeure mal décrit. Le processus de sénescence dans le cœur, et plus particulièrement au sein des cardiomyocytes post-mitotiques, n'a jamais été profondément étudié et les données actuelles doivent encore être consolidées (Chimenti et al., 2003; Torella et al., 2004). Ceci peut notamment s'expliquer par la difficulté et la controverse associée à l'étude de la sénescence dans un type cellulaire post-mitotique comme le cardiomyocyte. Par le biais de ce projet, nous avons souhaité apporter plusieurs éléments concernant la caractérisation de la sénescence des cardiomyocytes, via l'étude des mécanismes inducteurs mais aussi l'identification de nouveaux marqueurs spécifiques.

Nos travaux démontrent que le processus de sénescence peut avoir lieu au sein de cardiomyocytes lors du vieillissement. Cela se traduit notamment par l'expression de gènes d'arrêt du cycle cellulaire, qui sont des marqueurs classiques de la sénescence, comme p16^{INK4a}, p15^{INK4b} et p21^{CIP1}. De plus, dans une seconde partie, nous avons démontré que les cardiomyocytes acquièrent certaines caractéristiques uniques lorsqu'ils entrent en sénescence. Parmi-elles, l'expression de la Prom2, du Kcnk1 et du Pah. Les cardiomyocytes adoptent aussi un profil sécrétoire original lorsqu'ils sont sénescents puisqu'ils sécrètent de l'EDN3, du TGFβ2 et du GDF15 qui peuvent être dosées dans le plasma et constituer des biomarqueurs de sénescence. Les données obtenues *in vitro* sur les souris H9c2 et *in vivo* démontrent que les gènes Gdf15 et Prom2 sont dépendants de l'activation de la voie p53. L'utilisation de construction siRNA p21/p53 permettra de confirmer cette observation. Ces caractéristiques représentent une signature unique des cardiomyocytes sénescents. Nous avons aussi démontré que la sénescence de cardiomyocytes est induite par la présence de télomères endommagés et de mitochondries altérées favorisant la production de stress oxydant. La biologie mitochondriale joue donc un rôle tout à fait particulier dans l'induction de la sénescence post-mitotique des cardiomyocytes et la caractérisation des mécanismes associés à sa dysfonction est un aspect important qui demeure à ce jour partiellement compris.

De façon intéressante, via plusieurs approches *in vitro* et *in vivo* nous avons démontré que la sénescence des cardiomyocytes est associée à un processus d'hypertrophie avec notamment chez l'homme l'expression de PROM2 en association avec l'hypertrophie cardiaque. Ce phénomène d'hypertrophie, en plus de répondre à une demande compensatoire suite à la perte de cellularité avec le vieillissement, pourrait aussi être directement relié à l'acquisition d'un phénotype sénescents. A ce stade, nous savons que cette hypertrophie est notamment associée à l'expression de certains gènes embryonnaires comme β -Mhc, mais les autres processus favorisant cette modification morphologique restent mal connus. L'ensemble de cette étude démontre que les cardiomyocytes sénescents expriment de façon spécifique des gènes qui pourrait être reliés au processus d'hypertrophie. En effet, la sécrétion d'endothelin3 et Gdf15 sont connues pour leur action hypertrophiante (Heger et al., 2010; Tamamori et al., 1996) sur les cellules cardiaques et la Prominin-2 régule la présence des cavéoles membranaires dont le rôle dans l'hypertrophie (Markandeya et al., 2015; Wu et al., 2017) et la sénescence (Yu et al.) est connu. Afin de mieux comprendre l'implication de ces facteurs dans l'hypertrophie, nous envisageons de traiter des cardiomyocytes avec du GDF15 et de l'EDN3 recombinants afin d'étudier leur implication directe et la potentialisation réciproque de leur effet sur l'hypertrophie. Dans la même optique, l'effet de la Prominin-2 sur l'hypertrophie des cardiomyocytes sera étudié par des approches de surexpression et d'inhibition dans les modèles de SIPS *in vitro* que nous avons validés dans la seconde étude.

L'élimination des cellules sénescents (via la stratégie p16 ATTACK) et par utilisation d'un composé sénolytique (Navitoclax) conduit à une diminution de l'hypertrophie cardiaque et du nombre de cardiomyocytes ayant des dommages aux télomères. De plus, il existe une corrélation entre l'expression de PROM2 et le vieillissement chez l'homme. Cet ensemble de résultat nous permet de conclure quant à la présence de cardiomyocytes sénescents lors du vieillissement. Toutefois, même si nous retrouvons une surexpression de PROM2 dans le cœur des patients âgés en ICPEP le rôle des cellules sénescence dans le développement de cette pathologie reste encore à déterminer. Dans la première étude, nous ne retrouvons pas d'insuffisance cardiaque en association au vieillissement via la mesure de la fonction systolique et il apparait donc difficile d'identifier un rôle délétère de la sénescence dans ce contexte non-pathologique. Cependant, nous n'avons pas évalué la dysfonction diastolique alors qu'elle représente la principale altération associée au vieillissement. Une analyse plus fine et détaillée de la fonction cardiaque avec le vieillissement est donc au préalable nécessaire. Pour cela, nous développons actuellement la mesure par doppler des ondes E et A pour le calcul du ratio E/A ainsi que l'analyse de la déformation myocardique du ventricule gauche (strain) en

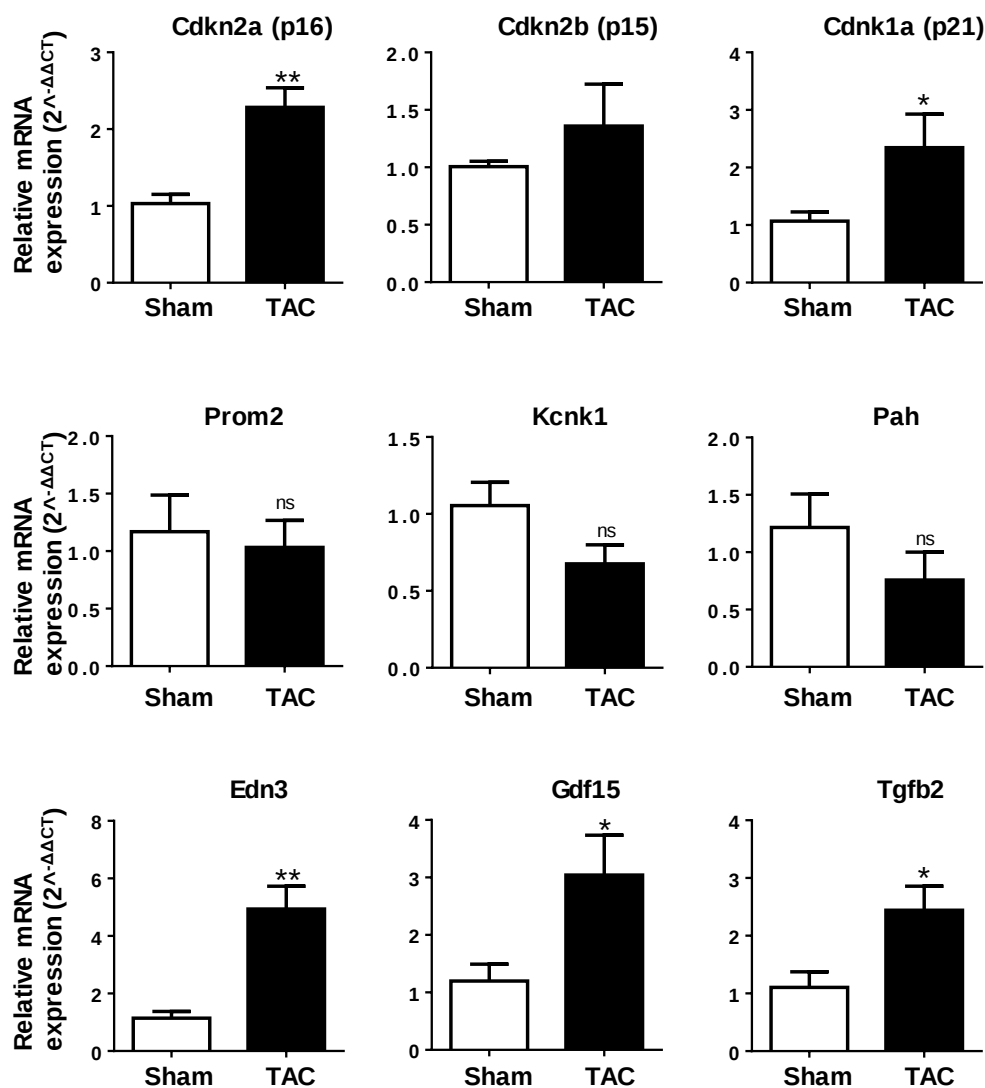
collaboration avec la plateforme d'exploration de Montpellier (Dr P. Sicard; UMR CNRS 9214-Inserm 1046, CHU Arnaud De Villeneuve). Si nous visualisons une dysfonction diastolique avec le vieillissement, l'implication des cellules sénescents dans ce processus pourra être démontrée suite à leur élimination par stratégie de gène suicide ou par traitement au Navitoclax. Il est aussi possible d'envisager éliminer les cellules sénescents dans des contextes de pathologies cardiaques induits après traitement à la doxorubicine et la surexpression de la MAO-A. Nos premiers résultats démontrent, en effet, que dans ces modèles de stress cardiaque il est possible d'observer une augmentation de l'expression des gènes classiques de sénescence (p16^{INK4a}, p15^{INK4b} et p21^{CIP1}) mais aussi des facteurs du SASP des cardiomyocytes. Cependant, l'induction des gènes codant pour les protéines non sécrétées comme Kcnk1, Prom2 et Pah n'est pas retrouvée. Il est ainsi possible de suggérer que le SASP est une signature précoce de sénescence des cardiomyocytes alors que les gènes Prom2, Pah et Kcnk1 sont secondaires et plus tardifs. Par ailleurs, des données préliminaires dans un modèle de stress cardiaque par constriction de l'aorte transverse (TAC) indiquent aussi qu'après une semaine de constriction aortique, des cardiomyocytes sénescents apparaissent (expression de p16, p21 et le SASP) (voir résultats complémentaire 1). Dans l'ensemble de ces modèles le rôle de la sénescence dans l'évolution de la pathologie reste encore à définir. Ainsi il pourrait être intéressant de traiter ces animaux avec un composé sénolytique afin d'évaluer les rôles délétères de la sénescence (fibrose, hypertrophie, fonction) dans la survenue de l'IC.

Par ailleurs, le rôle des nouveaux marqueurs devra être étudié afin de pouvoir mieux comprendre la biologie complexe de la sénescence des cardiomyocytes. Pour cela, il est possible de surexprimer ces derniers dans des cellules cardiaques en culture, ou *in vivo* par utilisation d'un vecteur AAV9 ayant un tropisme cardiaque. Dans ce contexte, nous pourrions évaluer leurs effets sur le devenir sénescents des cardiomyocytes, et dans le développement des caractéristiques pathologiques comme l'hypertrophie, la fibrose et la mort cellulaire. De façon intéressante, concernant la Prominin-2, nous avons d'observé une accumulation de la Prominin-2 à la base du cil primaire dans un modèle *in vitro* de SISF par traitement doxorubicine sur des cellules H9c2 (voir résultat complémentaire 2). Ce résultat préliminaire suggère un rôle de la Prominin-2 en association avec le cil primaire, une protrusion cytoplasmique régulant de nombreuses voies de signalisation comme Wnt, hedgehog (Berbari et al., 2009) et TGFβ (Clement et al., 2013). La littérature au sujet de l'implication du cil dans la sénescence reste peu détaillée et les conclusions divergent sur son rôle dans ce processus (Gallage and Gil, 2014). Toutefois, de récents travaux suggèrent que la longueur du cil module l'activation de la voie mTOR (Carroll et al., 2017). En effet, des chondrocytes rendus sénescents par irradiation

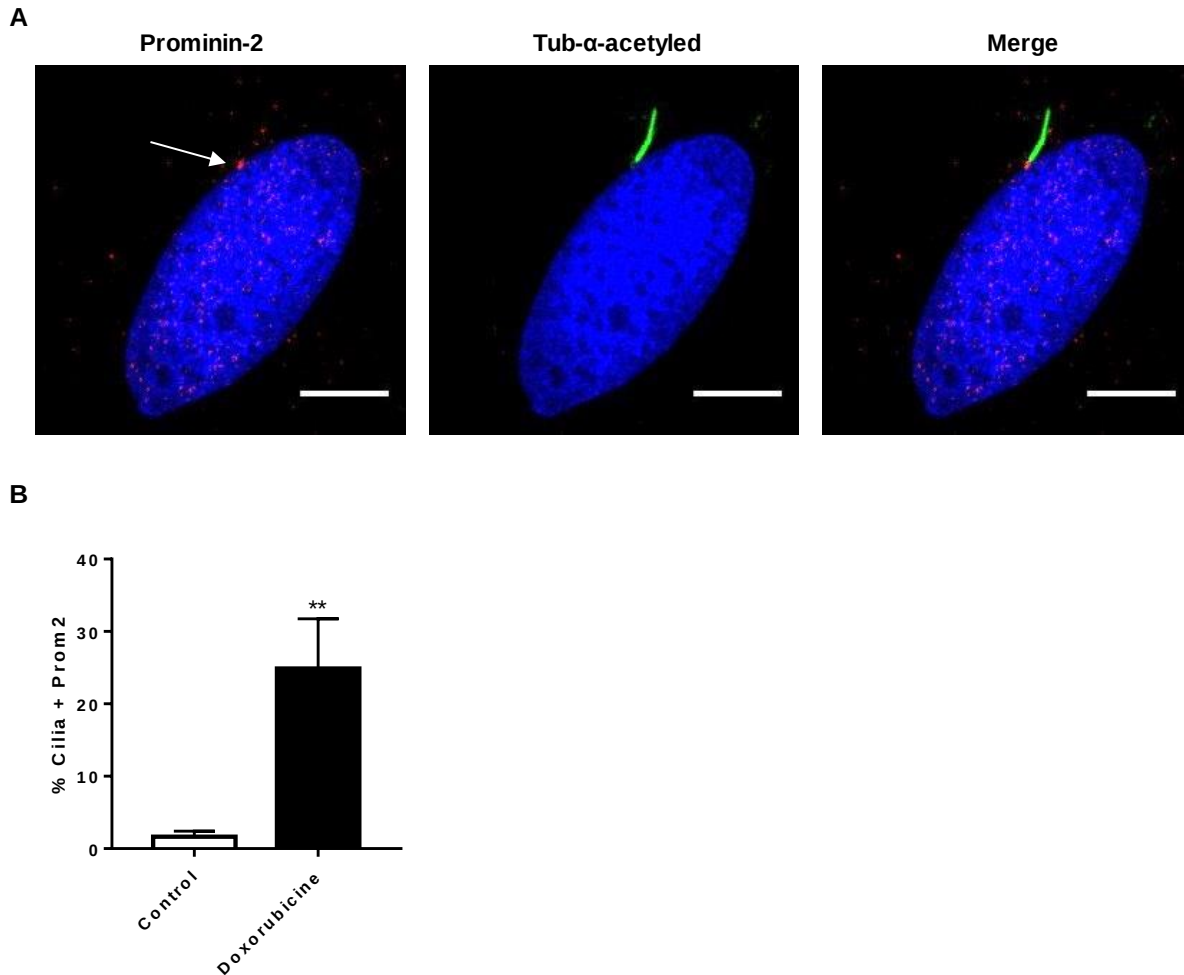
possèdent des cils primaires de taille inférieure aux cellules non sénescents et ce mécanisme conduit à une activation constitutive de la voie mTOR. Ainsi, il pourrait être intéressant de mesurer la taille des cils primaires associés à la Promin-2 afin de savoir si cette association réduit la taille de ces cils primaires et active la voie mTOR dans les modèles de SISP que nous avons décrit (traitement doxorubicine ou tyramine).

L'ensemble de ce projet nous permet aujourd'hui d'apporter de nouveaux éléments de caractérisation concernant le phénotype sénescents des cardiomyocytes. Il reste cependant particulièrement important de pouvoir incriminer leur rôle dans la survenue de pathologies comme l'insuffisance cardiaque. De plus, la caractérisation de l'importance des mitochondries et des télomères dans l'induction de ce mécanisme nous permet d'apporter de nouveaux éléments dans la mise au point d'outils préventifs de cette pathologie. Dans cette optique, l'utilisation de composés sénolytiques pourraient ainsi être d'excellents candidats. Enfin, l'identification des nouvelles voies moléculaires activées au sein des cardiomyocytes sénescents nous permet d'envisager de nouveaux champs d'investigation dans la compréhension de la biologie de ces cellules avec notamment les mécanismes impliqués dans l'hypertrophie en association avec le vieillissement. En conclusion, la sénescence des cardiomyocytes est un processus bien réel, avec des caractéristiques uniques, et dont l'implication au sein des pathologies cardiaques peut s'avérer importante. Cette étude, nous offre de nouvelles perspectives de traitements et de diagnostic de l'insuffisance cardiaque associée au vieillissement.

Résultats complémentaires



Résultat complémentaire 1 : Des souris C57Bl/6 sont soumises pendant 1 semaine à une constriction de l'aorte transverse (TAC). Les souris Sham sont soumises à une thoracotomie sans TAC. Après 1 semaine de TAC, les cardiomyocytes sont isolés et l'expression génique est évaluée par RT-PCR. Les résultats sont exprimés en expression relative moyenne $\pm$ SEM vs le groupe Sham. Test statistique : t-test * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs sham. $n = 6$ souris par groupe.



Résultat complémentaire 2 : (A) Image représentative de la Prominin-2 (rouge, anticorps anti prominin-2 Abcam Ab74997) et du cil primaire (vert, anticorps anti tubuline α -acétylée Sigma T6793) au sein de cellules H9c2 traitées avec de la doxorubicine 100nM (doxorubicine) ou de l'eau distillée (control) pendant 96 heures. Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). La flèche indique la présence de la prominin-2. Acquisition confocale par microscope à fluorescence, barre d'échelle = 10 μ m. **(B)** Quantification du nombre de cellules exprimant la protéine Prom2 à la base des cils primaires. Les résultats sont exprimés en % moyen de cellules $\pm$ SEM. Test statistique : t-test **P<0.05 vs control. n=3 expériences.

Bibliographie

- Acosta, J.C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J.P., Athineos, D., Kang, T.-W., Lasitschka, F., Andrulis, M., et al. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat. Cell Biol.* 15, 978–990.
- Adnot, S., Amsellem, V., Boyer, L., Marcos, E., Saker, M., Houssaini, A., Kebe, K., Dagouassat, M., Lipskaia, L., and Boczkowski, J. (2015). Telomere Dysfunction and Cell Senescence in Chronic Lung Diseases: Therapeutic Potential. *Pharmacol. Ther.* 153, 125–134.
- Ahmad, T., Sundar, I.K., Lerner, C.A., Gerloff, J., Tormos, A.M., Yao, H., and Rahman, I. (2015). Impaired mitophagy leads to cigarette smoke stress-induced cellular senescence: implications for chronic obstructive pulmonary disease. *FASEB J.* 29, 2912–2929.
- Ahmed, N., Mandel, R., and Fain, M.J. (2007). Frailty: An Emerging Geriatric Syndrome. *Am. J. Med.* 120, 748–753.
- Aird, K.M., and Zhang, R. (2013). Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF). *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 965, 185–196.
- Alper, G., Sözmen, E.Y., Kanit, L., Montes, G., Ersöz, B., and Kutay, F.Z. (1998). Age-related alterations in superoxide dismutase and catalase activities in rat brain. *Turk. J. Med. Sci.* 28, 491–494.
- Althubiti, M., Lezina, L., Carrera, S., Jukes-Jones, R., Giblett, S.M., Antonov, A., Barlev, N., Saldanha, G.S., Pritchard, C.A., Cain, K., et al. (2014). Characterization of novel markers of senescence and their prognostic potential in cancer. *Cell Death Dis.* 5, e1528.
- Amaral, J.D., Xavier, J.M., Steer, C.J., and Rodrigues, C.M. (2010). The Role of p53 in Apoptosis. *Discov. Med.* 9, 145–152.
- Andujar, P., Courbon, D., Bizard, E., Marcos, E., Adnot, S., Boyer, L., Demoly, P., Jarvis, D., Neukirch, C., Pin, I., et al. (2017). Smoking, telomere length and lung function decline: a longitudinal population-based study. *Thorax* [thoraxjnl-2017-210294](#).
- Anton, S.D., Karabetian, C., Heekin, K., and Leeuwenburgh, C. (2013). Caloric Restriction to Moderate Senescence: Mechanisms and Clinical Utility. *Curr. Transl. Geriatr. Exp. Gerontol. Rep.* 2, 239–246.
- Anversa, P., Palackal, T., Sonnenblick, E.H., Olivetti, G., Meggs, L.G., and Capasso, J.M. (1990). Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart. *Circ. Res.* 67, 871–885.
- Atadja, P., Wong, H., Garkavtsev, I., Veillette, C., and Riabowol, K. (1995). Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8348–8352.
- Atlas, S.A. (2007). The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J. Manag. Care Pharm. JMCP* 13, 9–20.
- van Attikum, H., and Gasser, S.M. (2009). Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol.* 19, 207–217.
- Avery, S.V. (2011). Molecular targets of oxidative stress. *Biochem. J.* 434, 201–210.
- Baar, M.P., Brandt, R.M.C., Putavet, D.A., Klein, J.D.D., Derks, K.W.J., Bourgeois, B.R.M., Stryeck, S., Rijksen, Y., van Willigenburg, H., Feijtel, D.A., et al. (2017). Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* 169, 132–147.e16.
- Bae, N.S., and Baumann, P. (2007). A RAP1/TRF2 Complex Inhibits Nonhomologous End-Joining at Human Telomeric DNA Ends. *Mol. Cell* 26, 323–334.
- Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonja, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., van de Sluis, B., Kirkland, J.L., and van Deursen, J.M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479, 232–236.

- Baker, D.J., Childs, B.G., Durik, M., Wijers, M.E., Sieben, C.J., Zhong, J., A. Saltness, R., Jeganathan, K.B., Verzosa, G.C., Pezeshki, A., et al. (2016). Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530, 184–189.
- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499–506.
- Baraibar, M.A., and Friguet, B. (2013). Oxidative proteome modifications target specific cellular pathways during oxidative stress, cellular senescence and aging. *Exp. Gerontol.* 48, 620–625.
- Baraibar, M.A., Liu, L., Ahmed, E.K., and Friguet, B. (2012). Protein Oxidative Damage at the Crossroads of Cellular Senescence, Aging, and Age-Related Diseases.
- Baraibar, M.A., Hyzewicz, J., Rogowska-Wrzesinska, A., Bulteau, A.-L., Prip-Buus, C., Butler-Browne, G., and Friguet, B. (2016). Impaired energy metabolism of senescent muscle satellite cells is associated with oxidative modifications of glycolytic enzymes. *Aging* 8, 3375–3389.
- Barascu, A., Chalony, C.L., Pennarun, G., Genet, D., Imam, N., Lopez, B., and Bertrand, P. (2012). Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. *EMBO J.* 31, 1080–1094.
- Barilari, M., Bonfils, G., Treins, C., Koka, V., De Villeneuve, D., Fabrega, S., and Pende, M. (2017). ZRF1 is a novel S6 kinase substrate that drives the senescence programme. *EMBO J.* 36, 736–750.
- Basso, N., Cini, R., Pietrelli, A., Ferder, L., Terragno, N.A., and Inserra, F. (2007). Protective effect of long-term angiotensin II inhibition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H1351-1358.
- Bekker-Jensen, S., Lukas, C., Melander, F., Bartek, J., and Lukas, J. (2005). Dynamic assembly and sustained retention of 53BP1 at the sites of DNA damage are controlled by Mdc1/NFBD1. *J. Cell Biol.* 170, 201–211.
- Beltrami, A.P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., et al. (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114, 763–776.
- Benson, E.K., Lee, S.W., and Aaronson, S.A. (2010). Role of progerin-induced telomere dysfunction in HGPS premature cellular senescence. *J Cell Sci* 123, 2605–2612.
- Berbari, N.F., O'Connor, A.K., Haycraft, C.J., and Yoder, B.K. (2009). The Primary Cilium as a Complex Signaling Center. *Curr. Biol. CB* 19, R526.
- Berger, N.A., Savvides, P., Koroukian, S.M., Kahana, E.F., Deimling, G.T., Rose, J.H., Bowman, K.F., and Miller, R.H. (2006). Cancer in the Elderly. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 117, 147–156.
- Bergmann, O., Bhardwaj, R.D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabé-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B.A., Druid, H., et al. (2009). Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324, 98–102.
- Bernadotte, A., Mikhelson, V.M., and Spivak, I.M. (2016). Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging* 8, 3–11.
- Bernardes de Jesus, B., and Blasco, M.A. (2012). Assessing Cell and Organ Senescence Biomarkers. *Circ. Res.* 111, 97–109.
- Bers, D.M. (2008). Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 23–49.
- Bhatia, R.S., Tu, J.V., Lee, D.S., Austin, P.C., Fang, J., Haouzi, A., Gong, Y., and Liu, P.P. (2006). Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study. *N. Engl. J. Med.* 355, 260–269.
- Bielak-Zmijewska, A., Wnuk, M., Przybylska, D., Grabowska, W., Lewinska, A., Alster, O., Korwek, Z., Cmoch, A., Myszk, A., Pikula, S., et al. (2014). A comparison of replicative senescence and doxorubicin-induced premature senescence of vascular smooth muscle cells isolated from human aorta. *Biogerontology* 15, 47–64.
- Biernacka, A., and Frangogiannis, N.G. (2011). Aging and Cardiac Fibrosis. *Aging Dis.* 2, 158–173.

- Birch, J., Anderson, R.K., Correia-Melo, C., Jurk, D., Hewitt, G., Marques, F.M., Green, N.J., Moisey, E., Birrell, M.A., Belvisi, M.G., et al. (2015). DNA damage response at telomeres contributes to lung aging and chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 309, L1124-1137.
- Bishop, N.A., Lu, T., and Yankner, B.A. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature* 464, 529–535.
- Blackburn, E.H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature* 350, 569–573.
- Bode-Böger, S.M., Scalera, F., and Martens-Lobenhoffer, J. (2005). Asymmetric dimethylarginine (ADMA) accelerates cell senescence. *Vasc. Med. Lond. Engl.* 10 Suppl 1, S65-71.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.-P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., and Wright, W.E. (1998). Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science* 279, 349–352.
- Bracken, A.P., Kleine-Kohlbrecher, D., Dietrich, N., Pasini, D., Gargiulo, G., Beekman, C., Theilgaard-Mönch, K., Minucci, S., Porse, B.T., Marine, J.-C., et al. (2007). The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes Dev.* 21, 525–530.
- Brady, C.A., Jiang, D., Mello, S.S., Johnson, T.M., Jarvis, L.A., Kozak, M.M., Kenzelmann Broz, D., Basak, S., Park, E.J., McLaughlin, M.E., et al. (2011). Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. *Cell* 145, 571–583.
- Bratic, A., and Larsson, N.-G. (2013). The role of mitochondria in aging. *J. Clin. Invest.* 123, 951–957.
- Buist, A.S., McBurnie, M.A., Vollmer, W.M., Gillespie, S., Burney, P., Mannino, D.M., Menezes, A.M., Sullivan, S.D., Lee, T.A., Weiss, K.B., et al. (2007). International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *The Lancet* 370, 741–750.
- Bupha-Intr, T., Haizlip, K.M., and Janssen, P.M.L. (2012). Role of Endothelin in the Induction of Cardiac Hypertrophy In Vitro. *PLOS ONE* 7, e43179.
- Burd, C.E., Sorrentino, J.A., Clark, K.S., Darr, D.B., Krishnamurthy, J., Deal, A.M., Bardeesy, N., Castrillon, D.H., Beach, D.H., and Sharpless, N.E. (2013). Monitoring Tumorigenesis and Senescence In Vivo with a p16INK4a-Luciferase Model. *Cell* 152, 340–351.
- Calado, R.T., and Young, N.S. (2008). Telomere maintenance and human bone marrow failure. *Blood* 111, 4446–4455.
- Caliò, A., Zamò, A., Ponzoni, M., Zanolin, M.E., Ferreri, A.J.M., Pedron, S., Montagna, L., Parolini, C., Fraifeld, V.E., Wolfson, M., et al. (2015). Cellular Senescence Markers p16INK4a and p21CIP1/WAF Are Predictors of Hodgkin Lymphoma Outcome. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 21, 5164–5172.
- Campisi, J., and d’Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 729–740.
- Carnes, C.A., Geisbuhler, T.P., and Reiser, P.J. (2004). Age-dependent changes in contraction and regional myocardial myosin heavy chain isoform expression in rats. *J. Appl. Physiol.* 97, 446–453.
- Carroll, B., Nelson, G., Rabanal-Ruiz, Y., Kucheryavenko, O., Dunhill-Turner, N.A., Chesterman, C.C., Zahari, Q., Zhang, T., Conduit, S.E., Mitchell, C.A., et al. (2017). Persistent mTORC1 signaling in cell senescence results from defects in amino acid and growth factor sensing. *J Cell Biol jcb.201610113*.
- Ceylan-Isik, A.F., Dong, M., Zhang, Y., Dong, F., Turdi, S., Nair, S., Yanagisawa, M., and Ren, J. (2013). Cardiomyocyte-Specific Deletion of Endothelin Receptor A Rescues Ageing-Associated Cardiac Hypertrophy and Contractile Dysfunction: Role of Autophagy. *Basic Res. Cardiol.* 108, 335.
- Chaudhary, K.R., El-Sikhry, H., and Seubert, J.M. (2011). Mitochondria and the aging heart. *J. Geriatr. Cardiol. JGC* 8, 159–167.
- Chen, J.-H., Hales, C.N., and Ozanne, S.E. (2007). DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Res.* 35, 7417–7428.

- Chen, X., Mao, G., and Leng, S.X. (2014). Frailty syndrome: an overview. *Clin. Interv. Aging* 9, 433–441.
- Chen, X., Li, M., Yan, J., Liu, T., Pan, G., Yang, H., Pei, M., and He, F. (2017). Alcohol Induces Cellular Senescence and Impairs Osteogenic Potential in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Alcohol Alcohol. Oxf. Oxf.* 52, 289–297.
- Cheng, T.-H., Shih, N.-L., Chen, C.-H., Lin, H., Liu, J.-C., Chao, H.-H., Liou, J.-Y., Chen, Y.-L., Tsai, H.-W., Chen, Y.-S., et al. (2005). Role of mitogen-activated protein kinase pathway in reactive oxygen species-mediated endothelin-1-induced beta-myosin heavy chain gene expression and cardiomyocyte hypertrophy. *J. Biomed. Sci.* 12, 123–133.
- Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J.E., Premrurit, P., Luo, W., Chicas, A., Lee, C.S., et al. (2011). Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev.* 25, 2125–2136.
- Childs, B.G., Baker, D.J., Kirkland, J.L., Campisi, J., and Deursen, J.M. van (2014). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* 15, 1139–1153.
- Childs, B.G., Durik, M., Baker, D.J., and van Deursen, J.M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat. Med.* 21, 1424–1435.
- Childs, B.G., Gluscevic, M., Baker, D.J., Laberge, R.-M., Marquess, D., Dananberg, J., and van Deursen, J.M. (2017). Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 718–735.
- Chimenti, C., Kajstura, J., Torella, D., Urbanek, K., Heleniak, H., Colussi, C., Meglio, F.D., Nadal-Ginard, B., Frustaci, A., Leri, A., et al. (2003). Senescence and Death of Primitive Cells and Myocytes Lead to Premature Cardiac Aging and Heart Failure. *Circ. Res.* 93, 604–613.
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. (2004). Direct Activation of Bax by p53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis. *Science* 303, 1010–1014.
- Choi, Y.-H., Kurtz, A., and Stamm, C. (2010). Mesenchymal Stem Cells for Cardiac Cell Therapy. *Hum. Gene Ther.* 22, 3–17.
- Chondrogianni, N., Stratford, F.L.L., Trougakos, I.P., Friguet, B., Rivett, A.J., and Gonos, E.S. (2003). Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts: induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *J. Biol. Chem.* 278, 28026–28037.
- Christou, D.D., and Seals, D.R. (2008). Decreased maximal heart rate with aging is related to reduced β -adrenergic responsiveness but is largely explained by a reduction in intrinsic heart rate. *J. Appl. Physiol.* 105, 24–29.
- Cleland, J.G.F., Tendera, M., Adamus, J., Freemantle, N., Polonski, L., Taylor, J., and PEP-CHF Investigators (2006). The perindopril in elderly people with chronic heart failure (PEP-CHF) study. *Eur. Heart J.* 27, 2338–2345.
- Clement, C.A., Ajbrou, K.D., Koefoed, K., Vestergaard, M.L., Veland, I.R., Henriques de Jesus, M.P.R., Pedersen, L.B., Benmerah, A., Andersen, C.Y., Larsen, L.A., et al. (2013). TGF- β Signaling Is Associated with Endocytosis at the Pocket Region of the Primary Cilium. *Cell Rep.* 3, 1806–1814.
- Cocco, T., Pacelli, C., Sgobbo, P., and Villani, G. (2009). Control of OXPHOS efficiency by complex I in brain mitochondria. *Neurobiol. Aging* 30, 622–629.
- Collado, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2007). Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell* 130, 223–233.
- Coppé, J.-P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLOS Biol.* 6, e301.
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu. Rev. Pathol.* 5, 99–118.

- Coppé, J.-P., Rodier, F., Patil, C.K., Freund, A., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2011). Tumor Suppressor and Aging Biomarker p16INK4a Induces Cellular Senescence without the Associated Inflammatory Secretory Phenotype. *J. Biol. Chem.* 286, 36396–36403.
- Correia-Melo, C., and Passos, J.F. (2015). Mitochondria: Are they causal players in cellular senescence? *Biochim. Biophys. Acta* 1847, 1373–1379.
- Correia-Melo, C., Marques, F.D., Anderson, R., Hewitt, G., Hewitt, R., Cole, J., Carroll, B.M., Miwa, S., Birch, J., Merz, A., et al. (2016). Mitochondria are required for pro- ageing features of the senescent phenotype. *EMBO J.* 35, 724–742.
- Cotter, G., Metzkor, E., Kaluski, E., Faigenberg, Z., Miller, R., Simovitz, A., Shaham, O., Marghitay, D., Koren, M., Blatt, A., et al. (1998). Randomised trial of high-dose isosorbide dinitrate plus low-dose furosemide versus high-dose furosemide plus low-dose isosorbide dinitrate in severe pulmonary oedema. *The Lancet* 351, 389–393.
- Cristofalo, V.J. (2005). SA β Gal staining: Biomarker or delusion. *Exp. Gerontol.* 40, 836–838.
- Crowley, S.D., Gurley, S.B., Herrera, M.J., Ruiz, P., Griffiths, R., Kumar, A.P., Kim, H.-S., Smithies, O., Le, T.H., and Coffman, T.M. (2006). Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 17985–17990.
- Cruz-Jentoft, A.J., Baeyens, J.P., Bauer, J.M., Boirie, Y., Cederholm, T., Landi, F., Martin, F.C., Michel, J.-P., Rolland, Y., Schneider, S.M., et al. (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* 39, 412–423.
- Cruz-Jentoft, A.J., Landi, F., Schneider, S.M., Zúñiga, C., Arai, H., Boirie, Y., Chen, L.-K., Fielding, R.A., Martin, F.C., Michel, J.-P., et al. (2014). Prevalence of and interventions for sarcopenia in ageing adults: a systematic review. Report of the International Sarcopenia Initiative (EWGSOP and IWGS). *Age Ageing* 43, 748–759.
- Csepe, T.A., Kalyanasundaram, A., Hansen, B.J., Zhao, J., and Fedorov, V.V. (2015). Fibrosis: a structural modulator of sinoatrial node physiology and dysfunction. *Front. Physiol.* 6.
- Cypen, J., Ahmad, T., Testani, J.M., and DeVore, A.D. (2017). Novel Biomarkers for the Risk Stratification of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Curr. Heart Fail. Rep.* 14, 434–443.
- Dai, D.-F., Santana, L.F., Vermulst, M., Tomazela, D.M., Emond, M.J., MacCoss, M.J., Gollahon, K., Martin, G.M., Loeb, L.A., Ladiges, W.C., et al. (2009). Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging. *Circulation* 119, 2789–2797.
- Dai, D.-F., Chen, T., Wanagat, J., Laflamme, M., Marcinek, D.J., Emond, M.J., Ngo, C.P., Prolla, T.A., and Rabinovitch, P.S. (2010). Age-dependent cardiomyopathy in mitochondrial mutator mice is attenuated by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Aging Cell* 9, 536–544.
- Dai, D.-F., Johnson, S.C., Villarin, J.J., Chin, M.T., Nieves-Cintrón, M., Chen, T., Marcinek, D.J., Dorn, G.W., Kang, Y.J., Prolla, T.A., et al. (2011). Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and Galphaq overexpression-induced heart failure. *Circ. Res.* 108, 837–846.
- Dai, D.-F., Chen, T., Johnson, S.C., Szeto, H., and Rabinovitch, P.S. (2012). Cardiac Aging: From Molecular Mechanisms to Significance in Human Health and Disease. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 1492–1526.
- Dalle Pezze, P., Nelson, G., Otten, E.G., Korolchuk, V.I., Kirkwood, T.B.L., von Zglinicki, T., and Shanley, D.P. (2014). Dynamic modelling of pathways to cellular senescence reveals strategies for targeted interventions. *PLoS Comput. Biol.* 10, e1003728.
- Damy, T., Guellich, A., Vermes, E., Deswarte, G., and Hittinger, L. (2007). Physiologie et physiopathologie du système rénine-angiotensine-aldostérone. *Mt Cardio* 3, 257–262.
- Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A., and D’Arca, D. (2016). ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016.

- Deas, E., Wood, N.W., and Plun-Favreau, H. (2011). Mitophagy and Parkinson's disease: the PINK1-parkin link. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 623–633.
- Dechat, T., Pflieger, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D.K., Solimando, L., and Goldman, R.D. (2008). Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev.* 22, 832–853.
- Dehay, C., and Kennedy, H. (2007). Cell-cycle control and cortical development. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 438–450.
- Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S.A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J.R., Laberge, R.-M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dollé, M.E.T., et al. (2014). An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Dev. Cell* 31, 722–733.
- Demidenko, Z.N., and Blagosklonny, M.V. (2008). Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked. *Cell Cycle* 7, 3355–3361.
- Deng, C., Zhang, P., Wade Harper, J., Elledge, S.J., and Leder, P. (1995). Mice Lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675–684.
- Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K., and Wahl, G.M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 8, 2540–2551.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre', M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638–642.
- Di Mitri, D., and Alimonti, A. (2016). Non-Cell-Autonomous Regulation of Cellular Senescence in Cancer. *Trends Cell Biol.* 26, 215–226.
- Dierick, J.F., Pascal, T., Chainiaux, F., Eliaers, F., Remacle, J., Larsen, P.M., Roepstorff, P., and Toussaint, O. (2000). Transcriptome and proteome analysis in human senescent fibroblasts and fibroblasts undergoing premature senescence induced by repeated sublethal stresses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 908, 302–305.
- Dierick, J.-F., Eliaers, F., Remacle, J., Raes, M., Fey, S.J., Larsen, P.M., and Toussaint, O. (2002). Stress-induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes, proteomic evidence. *Biochem. Pharmacol.* 64, 1011–1017.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9363–9367.
- Dobaczewski, M., Chen, W., and Frangogiannis, N.G. (2011). Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51, 600–606.
- Doherty, T.J. (2003). Invited Review: Aging and sarcopenia. *J. Appl. Physiol.* 95, 1717–1727.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215–221.
- Duan, J., Duan, J., Zhang, Z., and Tong, T. (2005). Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1407–1420.
- Dulic, V. (2013). Senescence regulation by mTOR. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 965, 15–35.
- Edelmann, F., Wachter, R., Schmidt, A.G., Kraigher-Krainer, E., Colantonio, C., Kamke, W., Duvinage, A., Stahrenberg, R., Durstewitz, K., Löffler, M., et al. (2013). Effect of spironolactone on diastolic function and exercise capacity in patients with heart failure with preserved ejection fraction: the Aldo-DHF randomized controlled trial. *JAMA* 309, 781–791.

- Efeyan, A., Ortega-Molina, A., Velasco-Miguel, S., Herranz, D., Vassilev, L.T., and Serrano, M. (2007). Induction of p53-Dependent Senescence by the MDM2 Antagonist Nutlin-3a in Mouse Cells of Fibroblast Origin. *Cancer Res.* 67, 7350–7357.
- Eghbali, M., Eghbali, M., Robinson, T.F., Seifter, S., and Blumenfeld, O.O. (1989). Collagen accumulation in heart ventricles as a function of growth and aging. *Cardiovasc. Res.* 23, 723–729.
- El'darov, C.M., Vays, V.B., Vangeli, I.M., Kolosova, N.G., and Bakeeva, L.E. (2015). Morphometric Examination of Mitochondrial Ultrastructure in Aging Cardiomyocytes. *Biochem. Biokhimiia* 80, 604–609.
- Ellis, R.E., Yuan, J.Y., and Horvitz, H.R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 663–698.
- Elzi, D.J., Lai, Y., Song, M., Hakala, K., Weintraub, S.T., and Shiio, Y. (2012). Plasminogen activator inhibitor 1 - insulin-like growth factor binding protein 3 cascade regulates stress-induced senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 12052–12057.
- Ensrud, K.E., Ewing, S.K., Cawthon, P.M., Fink, H.A., Taylor, B.C., Cauley, J.A., Dam, T.-T., Marshall, L.M., Orwoll, E.S., Cummings, S.R., et al. (2009). A comparison of frailty indexes for the prediction of falls, disability, fractures, and mortality in older men. *J. Am. Geriatr. Soc.* 57, 492–498.
- Esler, M., Kaye, D., Thompson, J., Jennings, G., Cox, H., Turner, A., Lambert, G., and Seals, D. (1995). Effects of aging on epinephrine secretion and regional release of epinephrine from the human heart. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 435–442.
- Evangelou, K., Lougiakis, N., Rizou, S.V., Kotsinas, A., Kletsas, D., Muñoz- Espín, D., Kastrinakis, N.G., Pouli, N., Marakos, P., Townsend, P., et al. (2017). Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens. *Aging Cell* 16, 192–197.
- Fagagna, F. d'Adda di, Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194–198.
- d'Adda di Fagagna, F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer* 8, 512–522.
- Falck, J., Coates, J., and Jackson, S.P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434, 605–611.
- Fearnley, C.J., Roderick, H.L., and Bootman, M.D. (2011). Calcium Signaling in Cardiac Myocytes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.
- Feng, X.H., Lin, X., and Derynck, R. (2000). Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *EMBO J.* 19, 5178–5193.
- Feridooni, H.A., Dibb, K.M., and Howlett, S.E. (2015). How cardiomyocyte excitation, calcium release and contraction become altered with age. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 83, 62–72.
- Ferrara, N., Komici, K., Corbi, G., Pagano, G., Furgi, G., Rengo, C., Femminella, G.D., Leosco, D., and Bonaduce, D. (2014). β -adrenergic receptor responsiveness in aging heart and clinical implications. *Front. Physiol.* 4.
- Ferrucci, L., Giallauria, F., and Guralnik, J.M. (2008). Epidemiology of Aging. *Radiol. Clin. North Am.* 46, 643–v.
- Fielder, E., von Zglinicki, T., and Jurk, D. (2017). The DNA Damage Response in Neurons: Die by Apoptosis or Survive in a Senescence-Like State? *J. Alzheimers Dis. Preprint*, 1–25.
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.* 194, 7–15.
- Flor, A.C., and Kron, S.J. (2016). Lipid-derived reactive aldehydes link oxidative stress to cell senescence. *Cell Death Dis.* 7, e2366.
- Fragoso, C.A.V. (2016). Epidemiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) in Aging Populations. *COPD J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* 13, 125–129.

- Freund, A., Laberge, R.-M., Demaria, M., and Campisi, J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol. Biol. Cell* 23, 2066–2075.
- Fried, L.P., Tangen, C.M., Walston, J., Newman, A.B., Hirsch, C., Gottdiener, J., Seeman, T., Tracy, R., Kop, W.J., Burke, G., et al. (2001). Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 56, M146–M157.
- Fumagalli, M., Rossiello, F., Mondello, C., and d’Adda di Fagagna, F. (2014). Stable Cellular Senescence Is Associated with Persistent DDR Activation. *PLoS ONE* 9.
- Fyhrquist, F., Saijonmaa, O., and Strandberg, T. (2013). The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 10, 274–283.
- Gabay, C., and Kushner, I. (1999). Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *N. Engl. J. Med.* 340, 448–454.
- Gallage, S., and Gil, J. (2014). Primary cilia and senescence: a sensitive issue. *Cell Cycle Georget. Tex* 13, 2653–2654.
- García-Cao, I., García-Cao, M., Martín-Caballero, J., Criado, L.M., Klatt, P., Flores, J.M., Weill, J.-C., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2002). “Super p53” mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J.* 21, 6225–6235.
- García-Prat, L., Martínez-Vicente, M., Perdiguero, E., Ortet, L., Rodríguez-Ubreva, J., Rebollo, E., Ruiz-Bonilla, V., Gutarra, S., Ballestar, E., Serrano, A.L., et al. (2016). Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature* 529, 37–42.
- Gartel, A.L., and Tyner, A.L. (2002). The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* 1, 639–649.
- Gazoti Debessa, C.R., Mesiano Maifrino, L.B., and Rodrigues de Souza, R. (2001). Age related changes of the collagen network of the human heart. *Mech. Ageing Dev.* 122, 1049–1058.
- Georgakopoulou, E., Tsimaratou, K., Evangelou, K., Fernandez, M.-P., Zoumpourlis, V., Trougakos, I., Kletsas, D., Bartek, J., Serrano, M., and Gorgoulis, V. (2012). Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *Aging* 5, 37–50.
- Gershon, A.S., Warner, L., Cascagnette, P., Victor, J.C., and To, T. (2011). Lifetime risk of developing chronic obstructive pulmonary disease: a longitudinal population study. *The Lancet* 378, 991–996.
- Ghosh, A.K., Rai, R., Park, K.E., Eren, M., Miyata, T., Wilsbacher, L.D., Vaughan, D.E., Ghosh, A.K., Rai, R., Park, K.E., et al. (2016). A small molecule inhibitor of PAI-1 protects against doxorubicin-induced cellular senescence. *Oncotarget* 7, 72443–72457.
- Gill, S.E., and Parks, W.C. (2008). Metalloproteinases and Their Inhibitors: Regulators of Wound Healing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1334–1347.
- Glück, S., Guey, B., Gulen, M.F., Wolter, K., Kang, T.-W., Schmacke, N.A., Bridgeman, A., Rehwinkel, J., Zender, L., and Ablasser, A. (2017). Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nat. Cell Biol.* 19, 1061–1070.
- Goldstein, S., Moerman, E.J., Jones, R.A., and Baxter, R.C. (1991). Insulin-like growth factor binding protein 3 accumulates to high levels in culture medium of senescent and quiescent human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 9680–9684.
- Goss, R.J. (1966). Hypertrophy versus hyperplasia. *Science* 153, 1615–1620.
- Gray, M.O., Long, C.S., Kalinyak, J.E., Li, H.T., and Karliner, J.S. (1998). Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* 40, 352–363.
- Green, D.R., and Evan, G.I. (2002). A matter of life and death. *Cancer Cell* 1, 19–30.

- Greider, C.W. (1998). Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 90–92.
- Groenveld, H.F., Januzzi, J.L., Damman, K., van Wijngaarden, J., Hillege, H.L., van Veldhuisen, D.J., and van der Meer, P. (2008). Anemia and mortality in heart failure patients a systematic review and meta-analysis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 52, 818–827.
- Guilbeau-Frugier, C. (2012). Implication de la MAO-A dans l'insuffisance cardiaque et dans la sénescence intrinsèque du myocarde. phd. Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier.
- Hamilton, M.L., Remmen, H.V., Drake, J.A., Yang, H., Guo, Z.M., Kewitt, K., Walter, C.A., and Richardson, A. (2001). Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 10469–10474.
- Hampel, B., Malisan, F., Niederegger, H., Testi, R., and Jansen-Dürr, P. (2004). Differential regulation of apoptotic cell death in senescent human cells. *Exp. Gerontol.* 39, 1713–1721.
- Handschin, C., and Spiegelman, B.M. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr. Rev.* 27, 728–735.
- Hara, H., Araya, J., Ito, S., Kobayashi, K., Takasaka, N., Yoshii, Y., Wakui, H., Kojima, J., Shimizu, K., Numata, T., et al. (2013). Mitochondrial fragmentation in cigarette smoke-induced bronchial epithelial cell senescence. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 305, L737–746.
- Harley, C.B. (1991). Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat. Res.* 256, 271–282.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.
- Hawkins, N.M., Petrie, M.C., Jhund, P.S., Chalmers, G.W., Dunn, F.G., and McMurray, J.J.V. (2009). Heart failure and chronic obstructive pulmonary disease: diagnostic pitfalls and epidemiology. *Eur. J. Heart Fail.* 11, 130–139.
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37, 614–636.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585–621.
- He, S., and Sharpless, N.E. (2017). Senescence in Health and Disease. *Cell* 169, 1000–1011.
- Heger, J., Schiegnitz, E., von Waldthausen, D., Anwar, M.M., Piper, H.M., and Euler, G. (2010). Growth differentiation factor 15 acts anti-apoptotic and pro-hypertrophic in adult cardiomyocytes. *J. Cell. Physiol.* 224, 120–126.
- Heidenreich, P.A., Trogon, J.G., Khavjou, O.A., Butler, J., Dracup, K., Ezekowitz, M.D., Finkelstein, E.A., Hong, Y., Johnston, S.C., Khera, A., et al. (2011). Forecasting the Future of Cardiovascular Disease in the United States: A Policy Statement From the American Heart Association. *Circulation* 123, 933–944.
- Herbert, K.E., Mistry, Y., Hastings, R., Poolman, T., Niklason, L., and Williams, B. (2008). Angiotensin II-mediated oxidative DNA damage accelerates cellular senescence in cultured human vascular smooth muscle cells via telomere-dependent and independent pathways. *Circ. Res.* 102, 201–208.
- Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P.C., Chen, D.J., and Sedivy, J.M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol. Cell* 14, 501–513.
- Hewitt, G., Jurk, D., Marques, F.D.M., Correia-Melo, C., Hardy, T., Gackowska, A., Anderson, R., Taschuk, M., Mann, J., and Passos, J.F. (2012). Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nat. Commun.* 3, 708.
- Heymes, C., Silvestre, J.S., Llorens-Cortes, C., Chevalier, B., Marotte, F., Levy, B.I., Swynghedauw, B., and Samuel, J.L. (1998). Cardiac senescence is associated with enhanced expression of angiotensin II receptor subtypes. *Endocrinology* 139, 2579–2587.
- Hirano, T., Yamaguchi, R., Asami, S., Iwamoto, N., and Kasai, H. (1996). 8-hydroxyguanine levels in nuclear DNA and its repair activity in rat organs associated with age. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 51, B303–307.

- Hirao, A., Kong, Y.Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S.J., and Mak, T.W. (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 287, 1824–1827.
- Hoshino, A., Mita, Y., Okawa, Y., Ariyoshi, M., Iwai-Kanai, E., Ueyama, T., Ikeda, K., Ogata, T., and Matoba, S. (2013). Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial dysfunction in the mouse heart. *Nat. Commun.* 4, 2308.
- Hua, L., Li, C., Xia, D., Qu, P., Li, Z., Zhang, W., and Feng, X. (2000). Relationship between hypertensive left ventricular hypertrophy and levels of endothelin and nitric oxide. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* 23, 377–380.
- Huang, C.-Y., Kuo, W.-W., Chueh, P.J., Tseng, C.-T., Chou, M.-Y., and Yang, J.-J. (2004). Transforming growth factor-beta induces the expression of ANF and hypertrophic growth in cultured cardiomyoblast cells through ZAK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 424–431.
- Huang, K., Rabold, R., Schofield, B., Mitzner, W., and Tankersley, C.G. (2007). Age-dependent changes of airway and lung parenchyma in C57BL/6J mice. *J. Appl. Physiol.* 102, 200–206.
- Hung, C.-W., Chen, Y.-C., Hsieh, W.-L., Chiou, S.-H., and Kao, C.-L. (2010). Ageing and neurodegenerative diseases. *Ageing Res. Rev.* 9 Suppl 1, S36-46.
- Iacovoni, J.S., Caron, P., Lassadi, I., Nicolas, E., Massip, L., Trouche, D., and Legube, G. (2010). High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *EMBO J.* 29, 1446–1457.
- Itahana, K., Zou, Y., Itahana, Y., Martinez, J.-L., Beausejour, C., Jacobs, J.J.L., Van Lohuizen, M., Band, V., Campisi, J., and Dimri, G.P. (2003). Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol. Cell. Biol.* 23, 389–401.
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura, M., Naka, K., Hosokawa, K., Ikeda, Y., et al. (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* 12, 446–451.
- Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078.
- Jacobs, J.J.L., and de Lange, T. (2004). Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr. Biol. CB* 14, 2302–2308.
- Jacobs, J.J.L., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R.A., and van Lohuizen, M. (1999). The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* 397, 164–168.
- Jha, S.R., Ha, H.S.K., Hickman, L.D., Hannu, M., Davidson, P.M., Macdonald, P.S., and Newton, P.J. (2015). Frailty in advanced heart failure: a systematic review. *Heart Fail. Rev.* 20, 553–560.
- Jones, S.A. (2006). Ageing to arrhythmias: conundrums of connections in the ageing heart. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 1571–1576.
- Jun, J.-I., and Lau, L.F. (2010). Cellular senescence controls fibrosis in wound healing. *Aging* 2, 627–631.
- Jurk, D., Wang, C., Miwa, S., Maddick, M., Korolchuk, V., Tzolou, A., Gonos, E.S., Thrasivoulou, C., Jill Saffrey, M., Cameron, K., et al. (2012). Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. *Aging Cell* 11, 996–1004.
- Kajstura, J., Cheng, W., Sarangarajan, R., Li, P., Li, B., Nitahara, J.A., Chapnick, S., Reiss, K., Olivetti, G., and Anversa, P. (1996). Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats. *Am. J. Physiol.* 271, H1215-1228.
- Kaludercic, N., Mialet-Perez, J., Paolocci, N., Parini, A., and Di Lisa, F. (2014). Monoamine oxidases as sources of oxidants in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 0, 34–42.

- Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., et al. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502, 333–339.
- Kang, C., Xu, Q., Martin, T.D., Li, M.Z., Demaria, M., Aron, L., Lu, T., Yankner, B.A., Campisi, J., and Elledge, S.J. (2015). The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science* 349, aaa5612.
- Kannel, W.B., Hjortland, M., and Castelli, W.P. (1974). Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am. J. Cardiol.* 34, 29–34.
- Kattel, S., Memon, S., Saito, K., Narula, J., and Saito, Y. (2016). An effect of left ventricular hypertrophy on mild-to-moderate left ventricular diastolic dysfunction. *Hellenic J. Cardiol.* 57, 92–98.
- Kerkelä, R., Ilves, M., Pikkarainen, S., Tokola, H., Ronkainen, V.-P., Majalahti, T., Leppäluoto, J., Vuolteenaho, O., and Ruskoaho, H. (2011). Key roles of endothelin-1 and p38 MAPK in the regulation of atrial stretch response. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300, R140–149.
- Kim, W.Y., and Sharpless, N.E. (2006). The Regulation of INK4/ARF in Cancer and Aging. *Cell* 127, 265–275.
- Kim, K.S., Seu, Y.B., Baek, S.-H., Kim, M.J., Kim, K.J., Kim, J.H., and Kim, J.-R. (2007a). Induction of Cellular Senescence by Insulin-like Growth Factor Binding Protein-5 through a p53-dependent Mechanism. *Mol. Biol. Cell* 18, 4543.
- Kim, K.S., Kim, M.-S., Seu, Y.B., Chung, H.Y., Kim, J.H., and Kim, J.-R. (2007b). Regulation of replicative senescence by insulin-like growth factor-binding protein 3 in human umbilical vein endothelial cells. *Aging Cell* 6, 535–545.
- Kirkland, J.L., Tchkonja, T., Zhu, Y., Niedernhofer, L.J., and Robbins, P.D. (2017). The Clinical Potential of Senolytic Drugs. *J. Am. Geriatr. Soc.*
- Kitzman, D.W., Sheikh, K.H., Beere, P.A., Philips, J.L., and Higginbotham, M.B. (1991). Age-related alterations of Doppler left ventricular filling indexes in normal subjects are independent of left ventricular mass, heart rate, contractility and loading conditions. *J. Am. Coll. Cardiol.* 18, 1243–1250.
- Knights, C.D., Catania, J., Giovanni, S.D., Muratoglu, S., Perez, R., Swartzbeck, A., Quong, A.A., Zhang, X., Beerman, T., Pestell, R.G., et al. (2006). Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate. *J. Cell Biol.* 173, 533–544.
- Koliada, A.K., Krasnenkov, D.S., and Vaiserman, A.M. (2015). Telomeric aging: mitotic clock or stress indicator? *Front. Genet.* 6.
- Korolchuk, V.I., Miwa, S., Carroll, B., and von Zglinicki, T. (2017). Mitochondria in Cell Senescence: Is Mitophagy the Weakest Link? *EBioMedicine* 21, 7–13.
- Kosar, M., Bartkova, J., Hubackova, S., Hodny, Z., Lukas, J., and Bartek, J. (2011). Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16(ink4a). *Cell Cycle Georget. Tex* 10, 457–468.
- Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M.R., Kovalev, G.I., Al-Regaiey, K., Su, L., and Sharpless, N.E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* 114, 1299–1307.
- Kubiczkova, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., and Sevcikova, S. (2012). TGF- β – an excellent servant but a bad master. *J. Transl. Med.* 10, 183.
- Kuilman, T., and Peeper, D.S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat. Rev. Cancer* 9, 81–94.
- Kukat, C., and Larsson, N.-G. (2013). mtDNA makes a U-turn for the mitochondrial nucleoid. *Trends Cell Biol.* 23, 457–463.

- Kukull, W.A., Higdon, R., Bowen, J.D., McCormick, W.C., Teri, L., Schellenberg, G.D., van Belle, G., Jolley, L., and Larson, E.B. (2002). Dementia and Alzheimer disease incidence: a prospective cohort study. *Arch. Neurol.* 59, 1737–1746.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J.D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J. Cell Sci.* 113, 3613–3622.
- Kyrylenko, S., and Baniahmad, A. (2010). Sirtuin family: a link to metabolic signaling and senescence. *Curr. Med. Chem.* 17, 2921–2932.
- Laberge, R.-M., Sun, Y., Orjalo, A.V., Patil, C.K., Freund, A., Zhou, L., Curran, S.C., Davalos, A.R., Wilson-Edell, K.A., Liu, S., et al. (2015). MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat. Cell Biol.* 17, 1049–1061.
- Lahousse, L., Ziere, G., Verlinden, V.J.A., Zillikens, M.C., Uitterlinden, A.G., Rivadeneira, F., Tiemeier, H., Joos, G.F., Hofman, A., Ikram, M.A., et al. (2016). Risk of Frailty in Elderly With COPD: A Population-Based Study. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 71, 689–695.
- Lakatta, E.G., and Levy, D. (2003). Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises. *Circulation* 107, 346–354.
- de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 19, 2100–2110.
- Larson, E.D., Clair, J.R.S., Sumner, W.A., Bannister, R.A., and Proenza, C. (2013). Depressed pacemaker activity of sinoatrial node myocytes contributes to the age-dependent decline in maximum heart rate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 18011–18016.
- Lawless, C., Wang, C., Jurk, D., Merz, A., Zglinicki, T. von, and Passos, J.F. (2010). Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Exp. Gerontol.* 45, 772–778.
- Lawrence, T. (2009). The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1.
- Lazzarini, V., Mentz, R.J., Fiuzat, M., Metra, M., and O'Connor, C.M. (2013). Heart failure in elderly patients: distinctive features and unresolved issues. *Eur. J. Heart Fail.* 15, 717–723.
- Le Boulch, M., Ahmed, E.K., Rogowska-Wrzesinska, A., Baraibar, M.A., and Friguet, B. (2017). Proteome oxidative carbonylation during oxidative stress-induced premature senescence of WI-38 human fibroblasts. *Mech. Ageing Dev.*
- Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.C., Kleijer, W.J., DiMaio, D., and Hwang, E.S. (2006a). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* 5, 187–195.
- Lee, H.-J., Mayette, J., Rapoport, S.I., and Bazinet, R.P. (2006b). Selective remodeling of cardiolipin fatty acids in the aged rat heart. *Lipids Health Dis.* 5, 2.
- Lee, J.Y., Yu, K.-R., Kim, H.-S., Kang, I., Kim, J.-J., Lee, B.-C., Choi, S.W., Shin, J.-H., Seo, Y., and Kang, K.-S. (2016). BMI1 inhibits senescence and enhances the immunomodulatory properties of human mesenchymal stem cells via the direct suppression of MKP-1/DUSP1. *Aging* 8, 1670–1689.
- Lee, S.-M., Dho, S.H., Ju, S.-K., Maeng, J.-S., Kim, J.-Y., and Kwon, K.-S. (2012). Cytosolic malate dehydrogenase regulates senescence in human fibroblasts. *Biogerontology* 13, 525–536.
- Leite, M.F., Page, E., and Ambler, S.K. (1994). Regulation of ANP secretion by endothelin-1 in cultured atrial myocytes: desensitization and receptor subtype. *Am. J. Physiol.* 267, H2193–2203.
- Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323–331.
- Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J.A., and Robinson, J.P. (2003a). Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *J. Biol. Chem.* 278, 8516–8525.

- Li, P., Li, J., Feng, X., Li, Z., Hou, R., Han, C., and Zhang, Y. (2003b). Gene expression profile of cardiomyocytes in hypertrophic heart induced by continuous norepinephrine infusion in the rats. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 60, 2200–2209.
- Lieber, M.R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 181–211.
- Lijnen, P.J., Petrov, V.V., and Fagard, R.H. (2000). Induction of cardiac fibrosis by angiotensin II. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 22, 709–723.
- Lin, J., Lopez, E.F., Jin, Y., Van Remmen, H., Bauch, T., Han, H.-C., and Lindsey, M.L. (2008). Age-Related Cardiac Muscle Sarcopenia: Combining experimental and mathematical modeling to identify mechanisms. *Exp. Gerontol.* 43, 296–306.
- Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., et al. (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol. Cell* 6, 1389–1399.
- Ling, L.-H., Kistler, P.M., Ellims, A.H., Iles, L.M., Lee, G., Hughes, G.L., Kalman, J.M., Kaye, D.M., and Taylor, A.J. (2012). Diffuse ventricular fibrosis in atrial fibrillation: noninvasive evaluation and relationships with aging and systolic dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 60, 2402–2408.
- Liu, D., and Hornsby, P.J. (2007). Senescent Human Fibroblasts Increase the Early Growth of Xenograft Tumors via Matrix Metalloproteinase Secretion. *Cancer Res.* 67, 3117–3126.
- Liu, G., Parant, J.M., Lang, G., Chau, P., Chavez-Reyes, A., El-Naggar, A.K., Multani, A., Chang, S., and Lozano, G. (2004). Chromosome stability, in the absence of apoptosis, is critical for suppression of tumorigenesis in Trp53 mutant mice. *Nat. Genet.* 36, 63–68.
- Loffredo, F.S., Steinhauser, M.L., Jay, S.M., Gannon, J., Pancoast, J.R., Yalamanchi, P., Sinha, M., Dall’Osso, C., Khong, D., Shadrach, J.L., et al. (2013). Growth Differentiation Factor 11 is a Circulating Factor that Reverses Age-Related Cardiac Hypertrophy. *Cell* 153, 828–839.
- Lohse, M.J., Engelhardt, S., and Eschenhagen, T. (2003). What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ. Res.* 93, 896–906.
- Longo, V.D., Antebi, A., Bartke, A., Barzilai, N., Brown-Borg, H.M., Caruso, C., Curiel, T.J., de Cabo, R., Franceschi, C., Gems, D., et al. (2015). Interventions to Slow Aging in Humans: Are We Ready? *Aging Cell* 14, 497–510.
- Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M.A., Celeste, A., Manis, J.P., van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T.T., et al. (2006). MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol. Cell* 21, 187–200.
- Lowes, B.D., Minobe, W., Abraham, W.T., Rizeq, M.N., Bohlmeier, T.J., Quaife, R.A., Roden, R.L., Dutcher, D.L., Robertson, A.D., Voelkel, N.F., et al. (1997). Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J. Clin. Invest.* 100, 2315–2324.
- Madamanchi, A. (2007). β -Adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. *McGill J. Med. MJM* 10, 99–104.
- Maejima, Y., Adachi, S., Ito, H., Hirao, K., and Isobe, M. (2008). Induction of premature senescence in cardiomyocytes by doxorubicin as a novel mechanism of myocardial damage. *Aging Cell* 7, 125–136.
- Maggiorani, D., Manzella, N., Edmondson, D.E., Mattevi, A., Parini, A., Binda, C., and Mialet-Perez, J. (2017). Monoamine Oxidases, Oxidative Stress, and Altered Mitochondrial Dynamics in Cardiac Ageing.
- Maher, P. (2005). The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res. Rev.* 4, 288–314.
- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuåsen, R.G., Welcker, M., Bartek, J., and Lukas, J. (2000). Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* 288, 1425–1429.

- Mallajosyula, J.K., Kaur, D., Chinta, S.J., Rajagopalan, S., Rane, A., Nicholls, D.G., Di Monte, D.A., Macarthur, H., and Andersen, J.K. (2008). MAO-B Elevation in Mouse Brain Astrocytes Results in Parkinson's Pathology. *PLoS ONE* 3.
- Manfé, V., Biskup, E., Johansen, P., Kamstrup, M.R., Krejsgaard, T.F., Morling, N., Wulf, H.C., and Gniadecki, R. (2012). MDM2 inhibitor nutlin-3a induces apoptosis and senescence in cutaneous T-cell lymphoma: role of p53. *J. Invest. Dermatol.* 132, 1487–1496.
- Mantovani, A., Locati, M., Vecchi, A., Sozzani, S., and Allavena, P. (2001). Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends Immunol.* 22, 328–336.
- Markandeya, Y.S., Phelan, L.J., Woon, M.T., Keefe, A.M., Reynolds, C.R., August, B.K., Hacker, T.A., Roth, D.M., Patel, H.H., and Balijepalli, R.C. (2015). Caveolin-3 Overexpression Attenuates Cardiac Hypertrophy via Inhibition of T-type Ca^{2+} Current Modulated by Protein Kinase α in Cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 290, 22085–22100.
- Martos, R., Baugh, J., Ledwidge, M., O'Loughlin, C., Conlon, C., Patle, A., Donnelly, S.C., and McDonald, K. (2007). Diastolic Heart Failure: Evidence of Increased Myocardial Collagen Turnover Linked to Diastolic Dysfunction. *Circulation* 115, 888–895.
- Massie, B.M., Carson, P.E., McMurray, J.J., Komajda, M., McKelvie, R., Zile, M.R., Anderson, S., Donovan, M., Iverson, E., Staiger, C., et al. (2008). Irbesartan in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *N. Engl. J. Med.* 359, 2456–2467.
- Maurel, A., Hernandez, C., Kunduzova, O., Bompard, G., Cambon, C., Parini, A., and Francés, B. (2003). Age-dependent increase in hydrogen peroxide production by cardiac monoamine oxidase A in rats. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 284, H1460–H1467.
- Mecocci, P., MacGarvey, U., Kaufman, A.E., Koontz, D., Shoffner, J.M., Wallace, D.C., and Beal, M.F. (1993). Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann. Neurol.* 34, 609–616.
- Mendenhall, W.M., and Logan, H.L.C. (2009). Human Papillomavirus and Head and Neck Cancer. *Am. J. Clin. Oncol.* 32, 535–539.
- Mentz, R.J., Kelly, J.P., von Lueder, T.G., Voors, A.A., Lam, C.S.P., Cowie, M.R., Kjeldsen, K., Jankowska, E.A., Atar, D., Butler, J., et al. (2014). Noncardiac comorbidities in heart failure with reduced versus preserved ejection fraction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 64, 2281–2293.
- Merksamer, P.I., Liu, Y., He, W., Hirschey, M.D., Chen, D., and Verdin, E. (2013). The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. *Aging* 5, 144–150.
- Métrich, M., Lucas, A., Gastineau, M., Samuel, J.-L., Heymes, C., Morel, E., and Lezoualc'h, F. (2008). Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ. Res.* 102, 959–965.
- Meyer, K., Hodwin, B., Ramanujam, D., Engelhardt, S., and Sarikas, A. (2016). Essential Role for Premature Senescence of Myofibroblasts in Myocardial Fibrosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 67, 2018–2028.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M.A.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720–724.
- Midwood, K.S., Williams, L.V., and Schwarzbauer, J.E. (2004). Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1031–1037.
- Migdal, C., and Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences* 27, 405–412.
- Minamino, T., Miyauchi, H., Yoshida, T., Ishida, Y., Yoshida, H., and Komuro, I. (2002). Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* 105, 1541–1544.

Minamino, T., Orimo, M., Shimizu, I., Kunieda, T., Yokoyama, M., Ito, T., Nojima, A., Nabetani, A., Oike, Y., Matsubara, H., et al. (2009). A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat. Med.* 15, 1082–1087.

Mistriotis, P., and Andreadis, S.T. (2017). Vascular aging: Molecular mechanisms and potential treatments for vascular rejuvenation. *Ageing Res. Rev.* 37, 94–116.

Mitchell, J.R., Wood, E., and Collins, K. (1999). A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 402, 551–555.

Miwa, S., Jow, H., Baty, K., Johnson, A., Czapiewski, R., Saretzki, G., Treumann, A., and von Zglinicki, T. (2014). Low abundance of the matrix arm of complex I in mitochondria predicts longevity in mice. *Nat. Commun.* 5.

Moiseeva, O., Bourdeau, V., Roux, A., Deschênes-Simard, X., and Ferbeyre, G. (2009). Mitochondrial Dysfunction Contributes to Oncogene-Induced Senescence. *Mol. Cell. Biol.* 29, 4495–4507.

Moll, U.M., and Petrenko, O. (2003). The MDM2-p53 Interaction. *Mol. Cancer Res.* 1, 1001–1008.

Mouraret, N., Marcos, E., Abid, S., Gary-Bobo, G., Saker, M., Houssaini, A., Dubois-Rande, J.-L., Boyer, L., Boczkowski, J., Derumeaux, G., et al. (2013). Activation of lung p53 by Nutlin-3a prevents and reverses experimental pulmonary hypertension. *Circulation* 127, 1664–1676.

Müller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D., and Helin, K. (2001). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev.* 15, 267–285.

Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., et al. (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* 155, 1104–1118.

Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13.

Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A., and Anversa, P. (2003). Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ. Res.* 92, 139–150.

Nag, A.C. (1980). Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios* 28, 41–61.

Nagano, T., Nakano, M., Nakashima, A., Onishi, K., Yamao, S., Enari, M., Kikkawa, U., and Kamada, S. (2016). Identification of cellular senescence-specific genes by comparative transcriptomics. *Sci. Rep.* 6, srep31758.

Najafi, A., Sequeira, V., Kuster, D.W.D., and van der Velden, J. (2016). β -adrenergic receptor signalling and its functional consequences in the diseased heart. *Eur. J. Clin. Invest.* 46, 362–374.

Narita, M., Núñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703–716.

Navarro, C.L. (2006). Molecular bases of progeroid syndromes. *Hum. Mol. Genet.* 15, R151–R161.

Nelson, G., Wordsworth, J., Wang, C., Jurk, D., Lawless, C., Martin-Ruiz, C., and von Zglinicki, T. (2012). A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging Cell* 11, 345–349.

Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., Cohen, R., Cros, J., Faivre, S., Raymond, E., and de Gramont, A. (2015). Targeting the TGF β pathway for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 147, 22–31.

Niccoli, T., and Partridge, L. (2012). Ageing as a risk factor for disease. *Curr. Biol.* CB 22, R741–752.

Nowotny, K., Jung, T., Grune, T., and Höhn, A. (2014). Accumulation of modified proteins and aggregate formation in aging. *Exp. Gerontol.* 57, 122–131.

Nyström, T. (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.* 24, 1311–1317.

- Ogrodnik, M., Miwa, S., Tchkonina, T., Tiniakos, D., Wilson, C.L., Lahat, A., Day, C.P., Burt, A., Palmer, A., Anstee, Q.M., et al. (2017). Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat. Commun.* 8, 15691.
- Olivetti, G., Melissari, M., Capasso, J.M., and Anversa, P. (1991). Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circ. Res.* 68, 1560–1568.
- Onodera, K., Sugiura, H., Yamada, M., Koarai, A., Fujino, N., Yanagisawa, S., Tanaka, R., Numakura, T., Togo, S., Sato, K., et al. (2017). Decrease in an anti-ageing factor, growth differentiation factor 11, in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*.
- Osellame, L.D., Blacker, T.S., and Duchen, M.R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 26, 711–723.
- Palmer, B.M. (2005). Thick filament proteins and performance in human heart failure. *Heart Fail. Rev.* 10, 187–197.
- Paradis, P., Dali-Youcef, N., Paradis, F.W., Thibault, G., and Nemer, M. (2000). Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 931–936.
- Park, H., Kim, C.-H., Jeong, J.-H., Park, M., and Kim, K.S. (2016). GDF15 contributes to radiation-induced senescence through the ROS-mediated p16 pathway in human endothelial cells. *Oncotarget* 7, 9634–9644.
- Park, S.-K., Kim, K., Page, G.P., Allison, D.B., Weindruch, R., and Prolla, T.A. (2009). Gene expression profiling of aging in multiple mouse strains: identification of aging biomarkers and impact of dietary antioxidants. *Aging Cell* 8, 484–495.
- Parrinello, S., Coppe, J.-P., Krtolica, A., and Campisi, J. (2005). Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J. Cell Sci.* 118, 485–496.
- Pascal, T., Debacq-Chainiaux, F., Chrétien, A., Bastin, C., Dabée, A.-F., Bertholet, V., Remacle, J., and Toussaint, O. (2005). Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays. *FEBS Lett.* 579, 3651–3659.
- Passos, J.F., Saretzki, G., Ahmed, S., Nelson, G., Richter, T., Peters, H., Wappler, I., Birket, M.J., Harold, G., Schaeuble, K., et al. (2007). Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol.* 5, e110.
- Passos, J.F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C.J., Miwa, S., Olijslagers, S., Hallinan, J., Wipat, A., et al. (2010). Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol. Syst. Biol.* 6, 347.
- Paulus, W.J., Tschöpe, C., Sanderson, J.E., Rusconi, C., Flachskampf, F.A., Rademakers, F.E., Marino, P., Smiseth, O.A., De Keulenaer, G., Leite-Moreira, A.F., et al. (2007). How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.* 28, 2539–2550.
- Petrova, N.V., Velichko, A.K., Razin, S.V., and Kantidze, O.L. (2016). Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging Cell* 15, 999–1017.
- Piepkorn, M. (2000). The expression of p16INK4a, the product of a tumor suppressor gene for melanoma, is upregulated in human melanocytes by UVB irradiation. *J. Am. Acad. Dermatol.* 42, 741–745.
- Pierce, G.F., Mustoe, T.A., Altmann, B.W., Deuel, T.F., and Thomason, A. (1991). Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J. Cell. Biochem.* 45, 319–326.
- Ponikowski, P., Voors, A.A., Anker, S.D., Bueno, H., Cleland, J.G.F., Coats, A.J.S., Falk, V., González-Juanatey, J.R., Harjola, V.-P., Jankowska, E.A., et al. (2016). 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 18, 891–975.

- Porter, C., Hurren, N.M., Cotter, M.V., Bhattarai, N., Reidy, P.T., Dillon, E.L., Durham, W.J., Tuvdendorj, D., Sheffield-Moore, M., Volpi, E., et al. (2015). Mitochondrial respiratory capacity and coupling control decline with age in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 309, E224-232.
- Rebbaa, A., Zheng, X., Chou, P.M., and Mirkin, B.L. (2003). Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene* 22, 2805–2811.
- Redfield, M.M. (2016). Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *N. Engl. J. Med.* 375, 1868–1877.
- Reed, B.N., and Sueta, C.A. (2015). A Practical Guide for the Treatment of Symptomatic Heart Failure with Reduced Ejection Fraction (HFrEF). *Curr. Cardiol. Rev.* 11, 23–32.
- Reed, S.M., and Quelle, D.E. (2014). p53 Acetylation: Regulation and Consequences. *Cancers* 7, 30–69.
- Reynisdóttir, I., Polyak, K., Iavarone, A., and Massagué, J. (1995). Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev.* 9, 1831–1845.
- Riahi, Y., Kaiser, N., Cohen, G., Abd-Elrahman, I., Blum, G., Shapira, O.M., Koler, T., Simionescu, M., Sima, A.V., Zarkovic, N., et al. (2015). Foam cell-derived 4-hydroxynonenal induces endothelial cell senescence in a TXNIP-dependent manner. *J. Cell. Mol. Med.* 19, 1887–1899.
- Robinson, T.F., Geraci, M.A., Sonnenblick, E.H., and Factor, S.M. (1988). Coiled perimysial fibers of papillary muscle in rat heart: morphology, distribution, and changes in configuration. *Circ. Res.* 63, 577–592.
- Rochette, P.J., and Brash, D.E. (2008). Progressive Apoptosis Resistance Prior to Senescence and Control by the Anti-apoptotic Protein BCL-xL. *Mech. Ageing Dev.* 129, 207–214.
- Rodier, F., and Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* 192, 547–556.
- Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C.K., Hoeijmakers, W.A.M., Muñoz, D.P., Raza, S.R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A.R., and Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* 11, 973–979.
- Rogers, R.K., Stoddard, G.J., Greene, T., Michaels, A.D., Fernandez, G., Freeman, A., Nord, J., and Stehlik, J. (2009). Usefulness of Adjusting for Clinical Covariates to Improve the Ability of B-Type Natriuretic Peptide to Distinguish Cardiac from Noncardiac Dyspnea. *Am. J. Cardiol.* 104, 689–694.
- Rosenkranz, S. (2004). TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc. Res.* 63, 423–432.
- Roussel, M.F. (1999). The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 18, 5311–5317.
- Russell, F.D., and Molenaar, P. (2000). The human heart endothelin system: ET-1 synthesis, storage, release and effect. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 353–359.
- Rutkowski, J.M., Stern, J.H., and Scherer, P.E. (2015). The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol* 208, 501–512.
- Sahin, E., Colla, S., Liesa, M., Moslehi, J., Müller, F.L., Guo, M., Cooper, M., Kotton, D., Fabian, A.J., Walkey, C., et al. (2011). Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* 470, 359–365.
- Sahyoun, N.R., Lentzner, H., Hoyert, D., and Robinson, K.N. (2001). Trends in causes of death among the elderly. *Aging Trends Hyattsville Md* 1–10.
- Salminen, A., Kauppinen, A., and Kaarniranta, K. (2012). Emerging role of NF-κB signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell. Signal.* 24, 835–845.
- Samaraweera, L., Adomako, A., Rodriguez-Gabin, A., and McDaid, H.M. (2017). A Novel Indication for Panobinostat as a Senolytic Drug in NSCLC and HNSCC. *Sci. Rep.* 7, 1900.
- Sarkar, D., Lebedeva, I.V., Emdad, L., Kang, D.-C., Baldwin, A.S., and Fisher, P.B. (2004). Human polynucleotide phosphorylase (hPNPaseold-35): a potential link between aging and inflammation. *Cancer Res.* 64, 7473–7478.
- Savic-Radojevic, A., Pljesa-Ercegovac, M., Matic, M., Simic, D., Radovanovic, S., and Simic, T. (2017). Novel Biomarkers of Heart Failure. In *Advances in Clinical Chemistry*, (Elsevier), pp. 93–152.

Schafer, M.J., Atkinson, E.J., Vanderboom, P.M., Kotajarvi, B., White, T.A., Moore, M.M., Bruce, C.J., Greason, K.L., Suri, R.M., Khosla, S., et al. (2016a). Quantification of GDF11 and Myostatin in Human Aging and Cardiovascular Disease. *Cell Metab.* 23, 1207–1215.

Schafer, M.J., White, T.A., Evans, G., Tonne, J.M., Verzosa, G.C., Stout, M.B., Mazula, D.L., Palmer, A.K., Baker, D.J., Jensen, M.D., et al. (2016b). Exercise Prevents Diet-Induced Cellular Senescence in Adipose Tissue. *Diabetes* 65, 1606–1615.

Schafer, M.J., White, T.A., Iijima, K., Haak, A.J., Ligresti, G., Atkinson, E.J., Oberg, A.L., Birch, J., Salmonowicz, H., Zhu, Y., et al. (2017). Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat. Commun.* 8, 14532.

Schlame, M., and Ren, M. (2009). The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1788, 2080–2083.

Schneider, M.P., Boesen, E.I., and Pollock, D.M. (2007). Contrasting Actions of Endothelin ETA and ETB Receptors in Cardiovascular Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 731–759.

Schriner, S.E., Linford, N.J., Martin, G.M., Treuting, P., Ogburn, C.E., Emond, M., Coskun, P.E., Ladiges, W., Wolf, N., Van Remmen, H., et al. (2005). Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308, 1909–1911.

Schultz, J.E.J., Witt, S.A., Glascock, B.J., Nieman, M.L., Reiser, P.J., Nix, S.L., Kimball, T.R., and Doetschman, T. (2002). TGF- β 1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J. Clin. Invest.* 109, 787–796.

Sedelnikova, O.A., Horikawa, I., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Bonner, W.M., and Barrett, J.C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 6, 168–170.

Seluanov, A., Gorbunova, V., Falcovitz, A., Sigal, A., Milyavsky, M., Zurer, I., Shohat, G., Goldfinger, N., and Rotter, V. (2001). Change of the Death Pathway in Senescent Human Fibroblasts in Response to DNA Damage Is Caused by an Inability To Stabilize p53. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1552–1564.

Senyo, S.E., Steinhauser, M.L., Pizzimenti, C.L., Yang, V.K., Cai, L., Wang, M., Wu, T.-D., Guerquin-Kern, J.-L., Lechene, C.P., and Lee, R.T. (2013). Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* 493, 433–436.

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593–602.

Shah, P.P., Donahue, G., Otte, G.L., Capell, B.C., Nelson, D.M., Cao, K., Aggarwala, V., Cruickshanks, H.A., Rai, T.S., McBryan, T., et al. (2013). Lamin B1 depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape. *Genes Dev.* 27, 1787–1799.

Shapiro, G.I., Edwards, C.D., Kobzik, L., Godleski, J., Richards, W., Sugarbaker, D.J., and Rollins, B.J. (1995). Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res.* 55, 505–509.

Sharpless, N.E., and Sherr, C.J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nat. Rev. Cancer* 15, 397–408.

Sharpless, N.E., Bardeesy, N., Lee, K.H., Carrasco, D., Castrillon, D.H., Aguirre, A.J., Wu, E.A., Horner, J.W., and DePinho, R.A. (2001). Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 413, 86–91.

Shelton, D.N., Chang, E., Whittier, P.S., Choi, D., and Funk, W.D. (1999). Microarray analysis of replicative senescence. *Curr. Biol.* 9, 939–945.

Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 9, 1149–1163.

- Shirakawa, K., Yan, X., Shinmura, K., Endo, J., Kataoka, M., Katsumata, Y., Yamamoto, T., Anzai, A., Isobe, S., Yoshida, N., et al. (2016). Obesity accelerates T cell senescence in murine visceral adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 126, 4626–4639.
- Smith, S.C., Zhang, X., Zhang, X., Gross, P., Starosta, T., Mohsin, S., Franti, M., Gupta, P., Hayes, D., Myzithras, M., et al. (2015). GDF11 Does not Rescue Aging-Related Pathological Hypertrophy. *Circ. Res.* 117, 926–932.
- Song, Y.S., Lee, B.Y., and Hwang, E.S. (2005). Distinct ROS and biochemical profiles in cells undergoing DNA damage-induced senescence and apoptosis. *Mech. Ageing Dev.* 126, 580–590.
- Spallarossa, P., Altieri, P., Aloj, C., Garibaldi, S., Barisione, C., Ghigliotti, G., Fugazza, G., Barsotti, A., and Brunelli, C. (2009). Doxorubicin induces senescence or apoptosis in rat neonatal cardiomyocytes by regulating the expression levels of the telomere binding factors 1 and 2. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 297, H2169–H2181.
- Špinarová, M., Meluzín, J., Podroužková, H., Štěpánová, R., and Špinarová, L. (2017). New echocardiographic parameters in the diagnosis of heart failure with preserved ejection fraction. *Int. J. Cardiovasc. Imaging* 1–7.
- Spindler, S.R. (2005). Rapid and reversible induction of the longevity, anticancer and genomic effects of caloric restriction. *Mech. Ageing Dev.* 126, 960–966.
- Steenman, M., and Lande, G. (2017). Cardiac aging and heart disease in humans. *Biophys. Rev.* 9, 131–137.
- Stein, G.H., Drullinger, L.F., Soulard, A., and Dulić, V. (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, 2109–2117.
- Stern, S., Behar, S., and Gottlieb, S. (2003). Aging and Diseases of the Heart. *Circulation* 108, e99–e101.
- Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M.C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J., et al. (2013). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* 155, 1119–1130.
- Strait, J.B., and Lakatta, E.G. (2012). Aging-associated cardiovascular changes and their relationship to heart failure. *Heart Fail. Clin.* 8, 143–164.
- Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123, 1213–1226.
- Sultana, N., Zhang, L., Yan, J., Chen, J., Cai, W., Razzaque, S., Jeong, D., Sheng, W., Bu, L., Xu, M., et al. (2015). Resident c-kit+ cells in the heart are not cardiac stem cells. *Nat. Commun.* 6, ncomms9701.
- Swanson, E.C., Manning, B., Zhang, H., and Lawrence, J.B. (2013). Higher-order unfolding of satellite heterochromatin is a consistent and early event in cell senescence. *J. Cell Biol.* 203, 929–942.
- Tai, H., Wang, Z., Gong, H., Han, X., Zhou, J., Wang, X., Wei, X., Ding, Y., Huang, N., Qin, J., et al. (2017). Autophagy impairment with lysosomal and mitochondrial dysfunction is an important characteristic of oxidative stress-induced senescence. *Autophagy* 13, 99–113.
- Takayanagi, R., Kitazumi, K., Takasaki, C., Ohnaka, K., Aimoto, S., Tasaka, K., Ohashi, M., and Nawata, H. (1991). Presence of non-selective type of endothelin receptor on vascular endothelium and its linkage to vasodilation. *FEBS Lett.* 282, 103–106.
- Tamamori, M., Ito, H., Adachi, S., Akimoto, H., Marumo, F., and Hiroe, M. (1996). Endothelin-3 induces hypertrophy of cardiomyocytes by the endogenous endothelin-1-mediated mechanism. *J. Clin. Invest.* 97, 366–372.
- Tatarkova, Z., Kuka, S., Racay, P., Lehotský, J., Dobrota, D., Mistuna, D., and Kaplán, P. (2011). Effects of aging on activities of mitochondrial electron transport chain complexes and oxidative damage in rat heart. *Physiol. Res.* 60, 281.

- Tate, E.L., and Herbener, G.H. (1976). A Morphometric Study of the Density of Mitochondrial Cristae in Heart and Liver of Aging Mice. *J. Gerontol.* 31, 129–134.
- Terman, A., and Brunk, U.T. (2004). Lipofuscin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1400–1404.
- Terzi, M.Y., Izmirli, M., and Gogebakan, B. (2016). The cell fate: senescence or quiescence. *Mol. Biol. Rep.* 43, 1213–1220.
- Tocchi, A., Quarles, E.K., Basisty, N., Gitari, L., and Rabinovitch, P.S. (2015). Mitochondrial Dysfunction in Cardiac Ageing. *Biochim. Biophys. Acta* 1847, 1424–1433.
- Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R.A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 349–363.
- Torella, D., Rota, M., Nurzynska, D., Musso, E., Monsen, A., Shiraishi, I., Zias, E., Walsh, K., Rosenzweig, A., Sussman, M.A., et al. (2004). Cardiac Stem Cell and Myocyte Aging, Heart Failure, and Insulin-Like Growth Factor-1 Overexpression. *Circ. Res.* 94, 514–524.
- Toussaint, O., Medrano, E.E., and von Zglinicki, T. (2000). Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp. Gerontol.* 35, 927–945.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly-Y, M., Gidlöf, S., Oldfors, A., Wibom, R., et al. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429, 417–423.
- Tsuji, T., Aoshiba, K., and Nagai, A. (2004). Cigarette Smoke Induces Senescence in Alveolar Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31, 643–649.
- Turenne, G.A., Proma, P., Laflair, L., and Price, B.D. (2001). Activation of p53 transcriptional activity requires ATM's kinase domain and multiple N-terminal serine residues of p53. *Oncogene* 20, 5100.
- Uchmanowicz, I., Kuśnierz, M., Wleklik, M., Jankowska-Polańska, B., Jarocho, J., and Łoboz-Grudzień, K. (2017). Frailty syndrome and rehospitalizations in elderly heart failure patients. *Aging Clin. Exp. Res.*
- Ueyama, T., Kawashima, S., Sakoda, T., Rikitake, Y., Ishida, T., Kawai, M., Namiki, M., and Yokoyama, M. (1999). Endothelin-1 activates p38 mitogen-activated protein kinase via endothelin-A receptor in rat myocardial cells. *Mol. Cell. Biochem.* 199, 119–124.
- Umbarkar, P., Singh, S., Arkat, S., Bodhankar, S.L., Lohidasan, S., and Sitasawad, S.L. (2015). Monoamine oxidase-A is an important source of oxidative stress and promotes cardiac dysfunction, apoptosis, and fibrosis in diabetic cardiomyopathy. *Free Radic. Biol. Med.* 87, 263–273.
- Upadhyay, B., and Kitzman, D.W. (2017). Heart Failure with Preserved Ejection Fraction in Older Adults. *Heart Fail. Clin.* 13, 485–502.
- Uryga, A.K., and Bennett, M.R. (2016). Ageing induced vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis. *J. Physiol.* 594, 2115–2124.
- Uyar, D., Frasure, H.E., Markman, M., and Gruenigen, V.E. von (2005). Treatment patterns by decade of life in elderly women (≥ 70 years of age) with ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 98, 403–408.
- Uygur, A., and Lee, R.T. (2016). Mechanisms of Cardiac Regeneration. *Dev. Cell* 36, 362–374.
- Victorelli, S., and Passos, J.F. (2017). Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not. *EBioMedicine* 21, 14–20.
- Villalonga-Planells, R., Coll-Mulet, L., Martínez-Soler, F., Castaño, E., Acebes, J.-J., Giménez-Bonafé, P., Gil, J., and Tortosa, A. (2011). Activation of p53 by Nutlin-3a Induces Apoptosis and Cellular Senescence in Human Glioblastoma Multiforme. *PLOS ONE* 6, e18588.
- Villeneuve, C., Guilbeau-Frugier, C., Sicard, P., Lairez, O., Ordener, C., Duparc, T., De Paulis, D., Couderc, B., Spreux-Varoquaux, O., Tortosa, F., et al. (2013). p53-PGC-1 α pathway mediates oxidative mitochondrial

- damage and cardiomyocyte necrosis induced by monoamine oxidase-A upregulation: role in chronic left ventricular dysfunction in mice. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 5–18.
- Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Müllauer, F., Böck, G., Ausserlechner, M.J., Adams, J.M., and Strasser, A. (2003). p53- and Drug-Induced Apoptotic Responses Mediated by BH3-Only Proteins Puma and Noxa. *Science* 302, 1036–1038.
- Vuolteenaho, O., Ala-Kopsala, M., and Ruskoaho, H. (2005). BNP as a biomarker in heart disease. *Adv. Clin. Chem.* 40, 1–36.
- Wada, T., Joza, N., Cheng, H.M., Sasaki, T., Kozieradzki, I., Bachmaier, K., Katada, T., Schreiber, M., Wagner, E.F., Nishina, H., et al. (2004). MKK7 couples stress signalling to G2/M cell-cycle progression and cellular senescence. *Nat. Cell Biol.* 6, 215–226.
- Walston, J.D. (2012). Sarcopenia in older adults. *Curr. Opin. Rheumatol.* 24, 623–627.
- Wang, E. (1995). Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res.* 55, 2284–2292.
- Wang, C., Jurk, D., Maddick, M., Nelson, G., Martin-Ruiz, C., and von Zglinicki, T. (2009). DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell* 8, 311–323.
- Wang, Y., Schulte, B.A., LaRue, A.C., Ogawa, M., and Zhou, D. (2006). Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood* 107, 358–366.
- Waspe, L.E., Ordahl, C.P., and Simpson, P.C. (1990). The cardiac beta-myosin heavy chain isogene is induced selectively in alpha 1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy of cultured rat heart myocytes. *J. Clin. Invest.* 85, 1206–1214.
- Weber, K.T. (1989). Cardiac interstitium in health and disease: The fibrillar collagen network. *J. Am. Coll. Cardiol.* 13, 1637–1652.
- Weindruch, R., Chia, D., Barnett, E.V., and Walford, R.L. (1982). Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: Effects on serum immune complex levels. *AGE* 5, 111–112.
- Wen-Sheng, W. (2003). ERK signaling pathway is involved in p15INK4b/p16INK4a expression and HepG2 growth inhibition triggered by TPA and Saikosaponin a. *Oncogene* 22, 955–963.
- White, M.C., Holman, D.M., Boehm, J.E., Peipins, L.A., Grossman, M., and Henley, S.J. (2014). Age and Cancer Risk. *Am. J. Prev. Med.* 46, S7-15.
- Wiley, C.D., Velarde, M.C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E.A., Freund, A., Shirakawa, K., Lim, H.W., Davis, S.S., Ramanathan, A., et al. (2016). Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab.* 23, 303–314.
- Witkiewicz, A.K., Knudsen, K.E., Dicker, A.P., and Knudsen, E.S. (2011). The meaning of p16(ink4a) expression in tumors: functional significance, clinical associations and future developments. *Cell Cycle Georget. Tex* 10, 2497–2503.
- Wu, D., Xie, F., Xiao, L., Feng, F., Huang, S., He, L., Liu, M., Zhou, Q., Li, L., and Chen, L. (2017). Caveolin-1-Autophagy Pathway Mediated Cardiomyocyte Hypertrophy Induced by Apelin-13. *DNA Cell Biol.* 36, 611–618.
- Wu, J., Niu, J., Li, X., Wang, X., Guo, Z., and Zhang, F. (2014). TGF- β 1 induces senescence of bone marrow mesenchymal stem cells via increase of mitochondrial ROS production. *BMC Dev. Biol.* 14, 21.
- Xu, A., and Narayanan, N. (1998). Effects of aging on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-cycling proteins and their phosphorylation in rat myocardium. *Am. J. Physiol.* 275, H2087-2094.
- Xu, D., and Finkel, T. (2002). A role for mitochondria as potential regulators of cellular life span. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 245–248.
- Xu, L., and Brink, M. (2016). mTOR, cardiomyocytes and inflammation in cardiac hypertrophy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1863, 1894–1903.

- Xu, S., Cai, Y., and Wei, Y. (2013). mTOR Signaling from Cellular Senescence to Organismal Aging. *Aging Dis.* 5, 263–273.
- Xu, Y., Li, N., Xiang, R., and Sun, P. (2014). Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence. *Trends Biochem. Sci.* 39, 268–276.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445, 656–660.
- Yamakoshi, K., Takahashi, A., Hirota, F., Nakayama, R., Ishimaru, N., Kubo, Y., Mann, D.J., Ohmura, M., Hirao, A., Saya, H., et al. (2009). Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *J. Cell Biol.* 186, 393–407.
- Yasue, H., Yoshimura, M., Sumida, H., Kikuta, K., Kugiyama, K., Jougasaki, M., Ogawa, H., Okumura, K., Mukoyama, M., and Nakao, K. (1994). Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation* 90, 195–203.
- Yoon, Y.-S., Byun, H.-O., Cho, H., Kim, B.-K., and Yoon, G. (2003). Complex II defect via down-regulation of iron-sulfur subunit induces mitochondrial dysfunction and cell cycle delay in iron chelation-induced senescence-associated growth arrest. *J. Biol. Chem.* 278, 51577–51586.
- Yu, D.-M., Jung, S.H., An, H.-T., Lee, S., Hong, J., Park, J.S., Lee, H., Lee, H., Bahn, M.-S., Lee, H.C., et al. Caveolin-1 deficiency induces premature senescence with mitochondrial dysfunction. *Aging Cell* n/a-n/a.
- Zeisberg, E.M., and Kalluri, R. (2010). Origins of Cardiac Fibroblasts. *Circ. Res.* 107, 1304–1312.
- Zeng, G., and Millis, A.J. (1996). Differential regulation of collagenase and stromelysin mRNA in late passage cultures of human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 222, 150–156.
- Zhu, J., Woods, D., McMahon, M., and Bishop, J.M. (1998). Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev.* 12, 2997–3007.
- Zhu, Y., Tchkonja, T., Pirtskhalava, T., Gower, A.C., Ding, H., Giorgadze, N., Palmer, A.K., Ikeno, Y., Hubbard, G.B., Lenburg, M., et al. (2015). The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 14, 644–658.
- Zhu, Y., Tchkonja, T., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Dai, H.M., Ling, Y.Y., Stout, M.B., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Johnson, K.O., Giles, C.B., et al. (2016). Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell* 15, 428–435.
- Ziegler, D.V., Wiley, C.D., and Velarde, M.C. (2015). Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. *Aging Cell* 14, 1–7.
- Zimmer, H.G., Kolbeck-Ruhmkorff, C., and Zierhut, W. (1995). Cardiac hypertrophy induced by alpha- and beta-adrenergic receptor stimulation. *Cardioscience* 6, 47–57.

Annexes

Review Article

Monoamine Oxidases, Oxidative Stress, and Altered Mitochondrial Dynamics in Cardiac Ageing

Damien Maggiorani,¹ Nicola Manzella,¹ Dale E. Edmondson,² Andrea Mattevi,³ Angelo Parini,¹ Claudia Binda,³ and Jeanne Mialet-Perez¹

¹*Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, INSERM, Université de Toulouse, Toulouse, France*

²*Department of Biochemistry, Emory University School of Medicine, 1510 Clifton Road, Atlanta, GA, USA*

³*Department of Biology and Biotechnology, University of Pavia, Via Ferrata 1, 27100 Pavia, Italy*

Correspondence should be addressed to Jeanne Mialet-Perez; jeanne.perez@inserm.fr

Received 6 January 2017; Revised 22 February 2017; Accepted 22 March 2017; Published 4 May 2017

Academic Editor: Aldrin V. Gomes

Copyright © 2017 Damien Maggiorani et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The advances in healthcare over the past several decades have resulted in populations now living longer. With this increase in longevity, a wider prevalence of cardiovascular diseases is more common and known to be a major factor in rising healthcare costs. A wealth of scientific evidence has implicated cell senescence as an important component in the etiology of these age-dependent pathologies. A number of studies indicate that an excess of reactive oxygen species (ROS) contributes to trigger and accelerate the cardiac senescence processes, and a new role of monoamine oxidases, MAO-A and MAO-B, is emerging in this context. These mitochondrial enzymes regulate the level of catecholamines and serotonin by catalyzing their oxidative deamination in the heart. MAOs' expression substantially increases with ageing (6-fold MAO-A in the heart and 4-fold MAO-B in neuronal tissue), and their involvement in cardiac diseases is supposedly related to the formation of ROS, via the hydrogen peroxide produced during the substrate degradation. Here, we will review the most recent advances in this field and describe why MAOs could be effective targets in order to prevent age-associated cardiovascular disease.

1. Introduction

In 2010, the worldwide population of persons aged >65 years was estimated to be 532 million, a 33 million increase since 2000, and it is projected to represent 16.7% (1550 million) of the worldwide population by year 2050 [World Health Organization, 2013]. Although the increase in longevity represents a progress per se, it can become a burdening social, economical, and medical problem when it is not associated with the maintenance of the quality of life and the prevention of disability. Several age-related conditions potentially promoting the disabling process are now often described as the “frailty syndrome.” “Frailty” is a clinical state in which patients are at risk for events (i.e., falls, ageing-associated chronic diseases, and hospitalization) increasing the incidence of disability and mortality [1]. In particular, age-associated cardiovascular diseases constantly increase after 55 and are known to be one of the major

factors promoting frailty and disability. This notion should be viewed in light of the converging results suggesting that the incidence of heart failure in ageing is related to the acceleration of the intrinsic cardiac senescence program. This phenomenon concerns the cardiomyocytes, the contractile component of the heart [2] as well as the cardiac stroma cells involved in the regulation of cardiac homeostasis [3]. In this review, we will (1) give an update of the most recent developments in cardiac ageing, (2) describe the central role of mitochondrial ROS in cardiac ageing, and (3) discuss the role of monoamine oxidases (MAOs) as potential drivers of cardiac ageing.

2. Cardiac Ageing

For cardiomyocytes, ageing is associated with a nonreplicative or postmitotic senescence, which displays a number of pathological and morphological features such as increased

sensitivity to apoptosis and necrosis, cellular hypertrophy, alterations in contraction and relaxation, and depressed bioenergetics [4]. The molecular pathways involved in postmitotic senescence of cardiomyocytes are far from being understood and seem to be distinct from replicative senescence, although some key molecular actors are shared. During replicative senescence, the loss of telomeric DNA during erosion of chromosome ends is sensed as a persistent DNA damage signal, which in turn activates the DNA damage response pathway resulting in enhanced expression of cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKi) p16^{INK4a} and p53. In the heart, telomere attrition and expression of p16^{INK4a} have been observed in senescent cardiomyocytes and have been linked to hypertrophy in both rodents and humans [5, 6]. However, based on the poor replicative potential of the heart, only a small proportion of cardiomyocytes displays telomeres shortening (about 16%) in aged rat hearts which contrasts with the high percentage of senescent cardiomyocytes positive for p16^{INK4a} [6]. This suggests an alternative mechanism of senescence in the heart which will warrant further investigations. Interestingly, as recently demonstrated by Baker et al., removing the p16^{INK4a}-positive senescent cells in adult mice not only increases life span but also protects the heart from cardiac hypertrophy and isoproterenol stress [7]. This study demonstrates for the first time the deleterious role of senescent cells during cardiac ageing. In addition, mice deficient for telomerase display telomeres shortening after four generations (G4) and develop cardiomyopathy characterized by enhanced cardiomyocyte death and cellular hypertrophy [8]. In this study, the authors describe a new link between telomere dysfunction and p53 activation, leading to mitochondrial and metabolic impairment through the repression of the master regulator of mitochondrial biogenesis, PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 α) [8]. Thus, telomere DNA damage and metabolic pathways may trigger intracellular events leading to mitochondrial dysfunction, altered energy maintenance, and finally the ageing process. Age-related mitochondrial alterations consist of increased reactive oxygen species (ROS), impaired oxidative phosphorylation, reduced ATP generation, impaired fatty acid oxidation, and increased mutations in mitochondrial DNA [2]. Interestingly, accelerated ageing associated with a cardiomyopathy was also observed in mice with a defective mitochondrial polymerase γ , an enzyme involved in mtDNA replication [9]. Thus, mitochondrial damage and dysfunction appear central in the process of ageing.

In order to prevent the deleterious accumulation of damaged mitochondria, a recycling system allows elimination of mitochondria through the autophagy-lysosome process. However, the efficiency of this pathway declines during ageing contributing to cell death or senescence [10]. In experimental models, the disruption of the autophagy-lysosome pathway through Atg5 (autophagy-related 5) knock-down leads to cardiac dilatation and premature ageing [11]. On the other hand, stimulation of autophagy with pharmacological agents such as resveratrol has gained interest in recent years since it has been demonstrated to protect

from cardiac failure [12]. Autophagic degradation of mitochondria involves several specific proteins. One of them, Parkin, is an E3 ubiquitin ligase that rapidly moves from cytosol to the outer membrane of dysfunctional mitochondria where it promotes mitophagy. Interestingly, parkin deficiency in mice led to the progressive accumulation of dysfunctional mitochondria whereas parkin overexpression maintained mitochondrial integrity in the ageing heart [13]. During normal ageing, the authors demonstrated that cytosolic p53 was responsible for impaired parkin translocation to the mitochondria and thus impaired mitophagy. In conclusion, compromised recycling of cytoplasmic materials and mitochondria might constitute another fundamental parameter in the ageing process, especially in long-lived postmitotic cardiac cells with limited regenerative capacities [10].

2.1. ROS and Ageing. It is now well understood that different stressor factors including oxidative stress, genotoxic agents, and metabolic dysfunction accelerate cardiomyocyte senescence (SIPS: stress-induced premature senescence), which may predispose individuals to premature ageing and heart failure [14].

Reactive oxygen species play a pivotal role in triggering and accelerating cardiac senescence [15]. It is now generally accepted that the ageing process is to a large extent related to macromolecular damage by ROS, mostly affecting long-lived postmitotic cells such as neurons and cardiac myocytes. Because of the inherent chemical properties of oxygen, both respiratory and nonrespiratory O₂-involving biological processes inevitably generate by-products, the ROS. These include superoxide (O₂^{•-}), hydrogen peroxide (H₂O₂), and hydroxyl radicals (OH[•]). The past years have witnessed a tremendous growth in the interest and research activities on this topic. The characteristic feature of ROS is their ability to target multiple cell components, therefore exerting deleterious effects on cell functions. Specific to the cardiomyocytes and chronic heart failure, ROS can directly oxidize proteins involved in contractile activity and consequently impair ventricular function [16–18]. They have been shown to interfere with quality control mechanisms by blocking autophagy in the heart, thus promoting senescence and apoptosis [19]. Moreover, ROS activate signal transduction pathways involved in cardiac hypertrophy and trigger a proapoptotic cascade [20]. They also mediate extracellular matrix accumulation through activation of cardiac fibroblasts, leading to ventricular fibrosis [21, 22]. All these effects are associated with the adverse cardiac remodeling and failure. Consistently, ROS sources are intensively pursued targets for effective pharmacological treatments of these pathological conditions [23–25]. Although different sources contribute to global oxidative stress, the vast majority of cellular ROS (90%) originate from the mitochondrial compartment [26]. According to the mitochondrial variant of the free radical theory of ageing, ROS produced in these organelles attack their constituents, causing mitochondrial dysfunction and DNA damage, leading to further increase in ROS, oxidative damage to lipids and proteins, and decline in cellular and organ function [27]. This central role of mitochondrial ROS has been demonstrated in mice

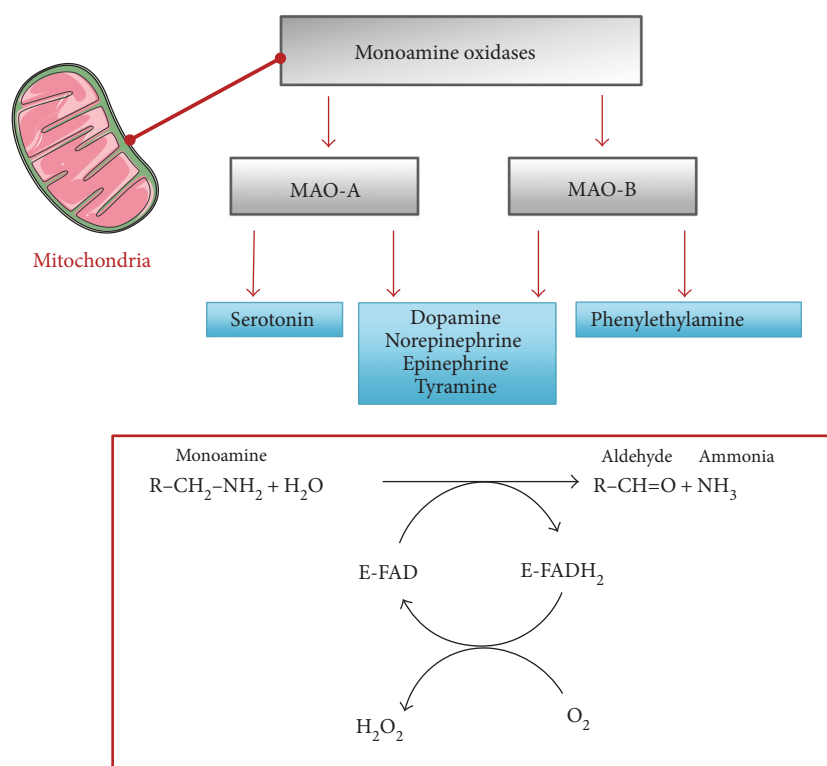


FIGURE 1: MAO-A and MAO-B share 73% sequence identity and exhibit overlapping but nonidentical specificities in the oxidation of primary amines. Oxidative deamination of monoamines by the flavoenzyme MAO-A proceeds in two steps: in the first step, binding of the monoamine to the enzyme (E) yields an aldehyde and ammonia by reduction of FAD cofactor; in the second step, the oxidized form of the prosthetic group is restored by the binding of oxygen and the concomitant production of hydrogen peroxide (H₂O₂). FAD, Flavin adenine dinucleotide.

with overexpression of the antioxidant enzyme catalase targeted to mitochondria, which display protection from cardiac ageing [28]. Recently, we identified the mitochondrial enzymes MAOs as a prominent source of ROS.

3. MAOs in the Ageing Heart

3.1. MAO Isoforms. Besides the respiratory chain, which is considered a major source of mitochondrial ROS in the heart, there is a class of enzymes termed monoamine oxidases, which reside in the outer mitochondrial membrane [29]. Monoamine oxidases A and B (MAO-A and MAO-B) are enzymes of paramount importance in the regulation of catecholamines and other biogenic amines in mammals. They are both expressed at equivalent levels in the human heart but differ significantly in rodents, with MAO-A being the major isoforms in the rat heart whereas MAO-B being expressed predominantly in the mouse heart [30, 31]. Comparison of amino acid sequences show that A and B isoforms have 73% identity in humans. There is also high similarity among species since rodent and human MAO-A display 88% identity. MAOs employ a FAD cofactor to catalyze the oxidative deamination of several monoamines, including not only neurotransmitters (e.g., serotonin, norepinephrine, and dopamine) but also exogenous amines ingested with normal diets (tyramine), generating H₂O₂ and the corresponding

aldehydes as by-products (Figure 1). MAO-A and MAO-B feature nonidentical but partly overlapping substrate specificities and inhibitor sensitivities. In particular, serotonin is a preferential substrate of MAO-A while catecholamines can be oxidized by both isoforms (Figure 1) [32]. Some substrate overlapping can occur and might become especially relevant in conditions of high substrate concentrations such as heart failure, raising the question of the contribution of each MAO isoform to pathogenesis.

3.2. Serotonin and Norepinephrine in Heart Failure. Norepinephrine and serotonin powerfully elicit a variety of biological responses, beyond their roles as neurotransmitters in the central nervous system. In the heart, norepinephrine is released by sympathetic nerve endings whereas serotonin is mainly produced by intestinal enterochromaffin cells and endothelial cells. This so-called peripheral serotonin is stored in the platelets and is released upon platelet-activating processes (i.e., hemostasis or pathological thrombosis). Alternatively, serotonin can also be produced by coronary endothelial cells and therefore may regulate cardiac function independently of platelet activation [33]. The increase in sympathetic nervous system (SNS) activity is typical of chronic heart failure (HF) and is characterized by norepinephrine spillover and decreased neuronal uptake [34]. Physiological ageing is also characterized by SNS dysfunction

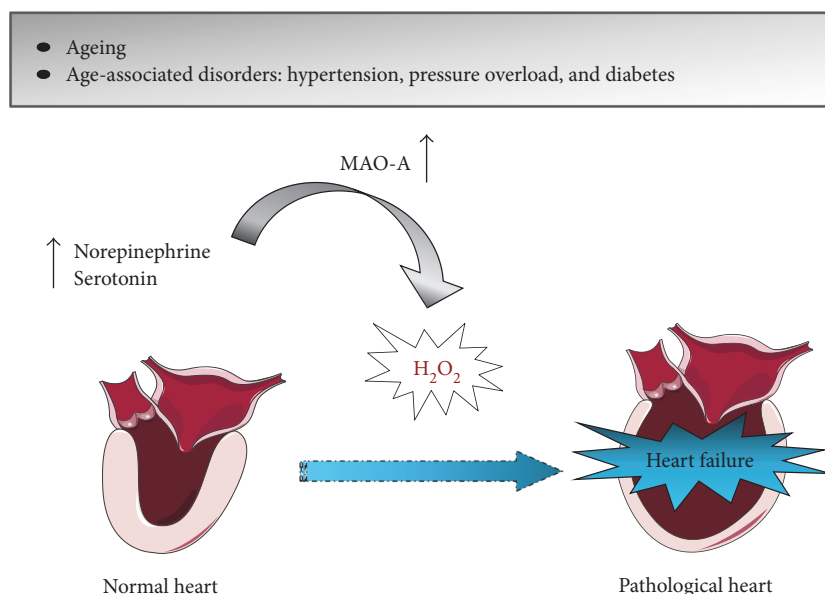


FIGURE 2: Putative role of MAO-A in heart failure. Ageing- and age-associated disorders show increased MAO-A expression and enhanced release of norepinephrine and serotonin. As a consequence, MAO-A activity is elevated and produces more H₂O₂ that in turn, contributes to oxidative stress and heart failure.

as shown by the increase in circulating catecholamine levels in old compared to adult individuals [35]. Concerning serotonin, a correlation was found between plasmatic serotonin and the degree of hypertrophy in aortic stenosis patients [36]. In another study, higher serotonin levels were associated with worse HF symptoms and systolic dysfunction [37, 38]. Therefore, the increase in norepinephrine and serotonin levels could participate in cardiovascular dysfunction and may explain the age-associated increase in cardiovascular morbidity and mortality [39]. Indeed, it is now well established that both of these biogenic amines are involved in adverse cardiac remodeling through cardiomyocyte hypertrophy, apoptosis, and necrosis [40–42], ultimately leading to heart failure. The hypertrophic and profibrotic activities of noradrenaline and serotonin may also be particularly relevant in a recently described form of ventricular dysfunction associated with ageing (heart failure with preserved ejection fraction, HFpEF) [43, 44].

3.3. MAOs as Relevant Sources of ROS in Age-Associated Cardiac Diseases. Recently, MAO-A and MAO-B were identified as major sources of H₂O₂ in the heart that participate in the onset and progression of cardiac injury [30]. Although the role of each isozyme remains to be investigated, it is well known that MAOs' expression and their abilities to produce ROS increase with age [45] and are pronounced in age-associated chronic diseases (i.e., hypertension, pressure overload, and diabetes) [42, 46, 47] (Figure 2).

In light of the established roles of ROS in heart diseases and the pharmacological effects elicited by MAO-inhibitor drugs, these mitochondrial enzymes are now becoming actively investigated as potential targets for the treatment of cardiac dysfunction and ageing. The fundamental discovery is that MAO-A overactivity elicits mitochondrial damage and myocardial degeneration in rodent models of pressure

overload or diabetes, which can be effectively prevented by using MAO-inhibiting drugs [42, 48, 49]. This concept becomes even more relevant in light of the well-documented tissue-specific increases in MAO-A and MAO-B levels with age. MAO-B increases 3–4-fold in neuronal tissue (including the brain) which has been shown in animal models to lead to Parkinson-type syndromes [50]. Most significant, MAO-A levels have been shown to increase 6-fold in the ageing heart, a phenomenon proposed to specifically enhance the effects exerted by factors and conditions that trigger cardiac damage [45]. Moreover, a very recent clinical study showed a correlation between MAO levels and postoperative atrial fibrillation, a cardiac arrhythmia often associated with ageing [51]. These findings and observations provide the framework for the mostly unexplored functions of MAOs in the biology of the ageing heart and associated pathological conditions.

3.4. Mechanisms of Action of MAOs in the Heart. As mentioned above, MAO-A activities are enhanced in several models of heart failure as well as in the ageing rat heart. In order to investigate the consequences of increased MAO-A activity in heart failure and ageing, Villeneuve and colleagues recently developed in vitro and in vivo models of MAO-A overexpression [42]. In vivo, cardiac-specific overexpression of MAO-A in young mice led to decreased levels of bioamines (norepinephrine and serotonin) together with increased concentrations of the aldehyde metabolites generated by the MAO-catalyzed amine oxidation [42]. At the same moment, mice with cardiac-selective MAO-A overexpression (Tg-MAOA) displayed enhanced levels of H₂O₂ in the heart and oxidation of mitochondrial DNA, together with mitochondrial ultrastructural defects. Gene expression analysis by microarray emphasized depressed energy metabolism in Tg-MAOA hearts accompanied by downregulation of the PGC-1 α pathway involved in mitochondrial

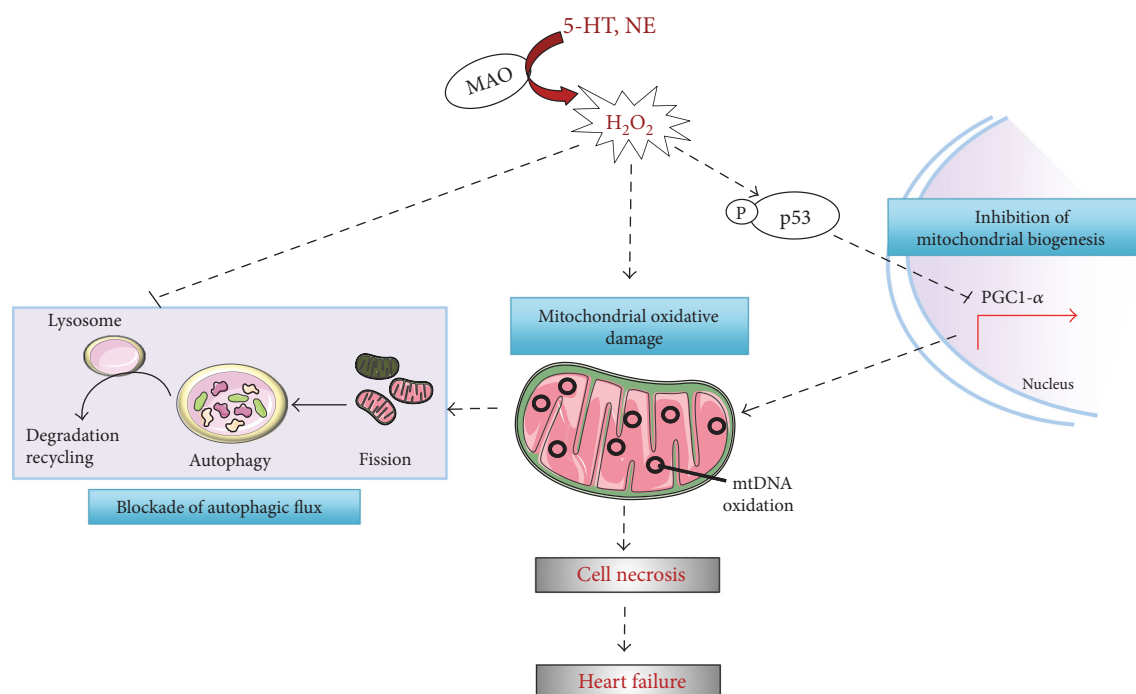


FIGURE 3: Deleterious effect of MAO-A on mitochondrial damage, cardiomyocyte death, and heart failure. MAO-A-generated oxidative stress triggers p53 activation leading to the downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 α (PGC-1 α), a master regulator of mitochondrial biogenesis. On the other hand, MAO-A-generated oxidative stress impairs lysosome function and acidification leading to autophagic flux blockade and altered mitochondrial quality control.

biogenesis [42]. Consequently, Tg-MAOA displayed progressive cardiomyocyte necrosis leading to premature death by heart failure at about 9 months of age. In vitro, transduction of cardiomyocytes with a MAO-A adenovirus in the presence of tyramine reproduced mitochondrial damage, diminished ATP production, and decreased PGC-1 α expression and necrosis through ROS generation. Most interestingly, the activation of p53 by MAO-A was responsible for mitochondrial damage, PGC1 α downregulation, and cardiomyocyte necrosis (Figure 3).

The autophagy-lysosome pathway is an important mechanism of quality control in the heart for damaged proteins and organelles (mitochondria), but its efficiency decreases during ageing or heart failure [52, 53]. The role of ROS in the regulation of autophagy has been extensively shown. However, the signalling mechanisms through which ROS modulate autophagy in a regulated manner have only been minimally clarified. A recent study demonstrated for the first time that MAO-A activation, through ROS generation, acted as a negative regulator of the autophagy-lysosome pathway [54]. Santin and colleagues found that persistent activation of MAO-A led to the progressive accumulation of LC3-positive autophagosomes, p62, ubiquitinated proteins, and damaged mitochondria. Blockade of autophagic flux was due to impaired lysosomal acidification and function and impaired lysosomal biogenesis through inhibition of the transcription factor EB (TFEB), a master regulator of autophagy-lysosome pathway. Interestingly, gene therapy with cardiomyocyte-driven TFEB adeno-associated vector rescued autophagic dysfunction, cardiac remodeling, and

heart failure in MAO-A-overexpressing mice [54] (Figure 3). In conclusion, ROS derived from MAO-A could alter lysosomal function causing a defect in quality control mechanisms. Although most of the changes associated with MAO-A activation, such as mitochondrial damage, p53 activation, PGC-1 α downregulation, and autophagy blockade mimic accelerated cardiac ageing, additional confirmations will be needed to correlate MAO-A with cardiomyocyte senescence. It is noteworthy that MAO-A-dependent intracellular cascade and mitochondria dysfunction described above are similar to those observed in mouse models with telomeric shortening described by Sahin et al. [8]. Therefore, MAO-A seems to be an important intracellular source of ROS triggering premature cardiomyocyte senescence.

Evidence exists also for a role of MAO-B in age-related heart disease. For instance, it was recently shown that genetic deletion of MAO-B protected against oxidative stress, apoptosis, and ventricular dysfunction in a model of pressure overload [55]. Interestingly, the authors demonstrated a direct link between MAO activation and ROS formation inside the mitochondria, which was responsible for the loss of mitochondrial potential in vitro. They analyzed ROS accumulation in a spatiotemporal manner using a redox fluorescent probe targeted specifically to the mitochondrial or cytosolic compartment, and they observed that following MAO-B activation, H_2O_2 levels increased much earlier at the mitochondrial level (10 min) than in the cytosol (30 min). Interestingly, this observation demonstrates that H_2O_2 , which is generated at the outer mitochondrial membrane, can rapidly accumulate inside the matrix and act

locally on mitochondrial targets. Indeed, a loss of mitochondrial membrane potential has been described after MAO activation, but also an oxidation of mtDNA, an alteration of mitochondrial ultrastructure and an impairment of respiratory chain [30].

Besides ROS, aldehydes produced during the metabolism of dopamine by MAO-B were recently shown to participate in mitochondrial dysfunction in cardiac cells [55]. In the heart, aldehydes are cleared by aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2), which is the most abundant isoform in this tissue. In vitro, genetic inactivation of ALDH2 with siRNA promoted dopamine-induced accumulation of aldehydes through MAO-B and alteration of mitochondrial membrane potential [55]. In vivo, a recent study demonstrated that ALDH2 deficiency in mice precipitated cardiac ageing with aldehyde overload, accelerated senescence, and impaired autophagic flux [56]. Altogether, those studies support a role for aldehydes in cardiac ageing. However, whether MAO-A activation also produces toxic aldehydes targeting mitochondrial function is still under consideration.

4. Conclusion

In the past years, a number of studies have uncovered that MAOs' activation and ROS generation can drive mitochondrial damage and myocardial degeneration. Since altered mitochondria dynamic and function are now considered as major determinants of onset and acceleration of cardiac senescence, the importance of MAOs in these processes and heart failure becomes particularly relevant. Especially with reference to MAO-A, since the p53/PGC1 α mitochondrial dysfunction axis has been identified as a major pathway involved in postmitotic senescence, this enzyme may constitute an important factor during cardiac ageing that can be a target for drugs exerting cardioprotective actions. Future studies will be needed to provide a more clear understanding of the roles of MAO-A and MAO-B in the cellular and molecular mechanisms linking biogenic amine metabolism and ROS generation to accelerated cardiovascular disease progression in ageing. Interestingly, MAOs could constitute effective drug targets for the treatment of cardiac degeneration and disease.

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

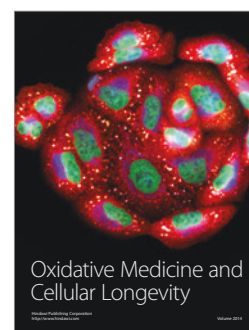
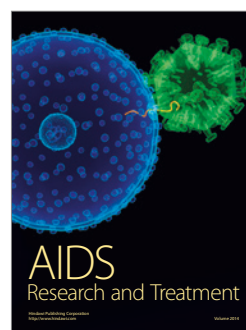
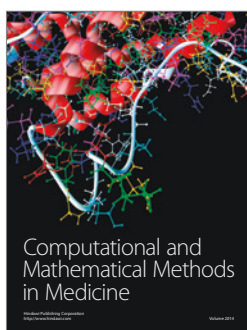
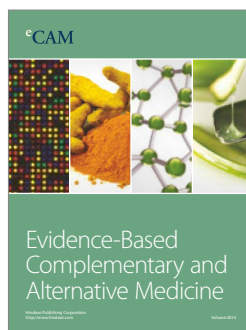
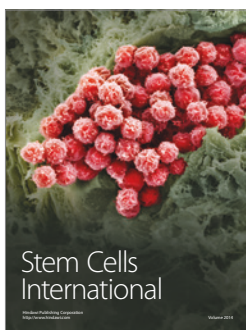
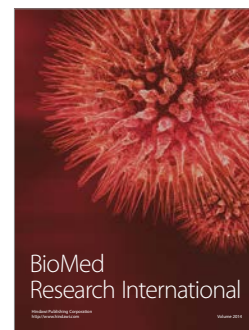
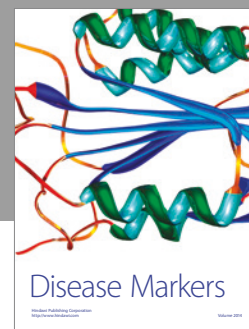
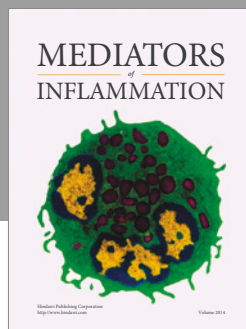
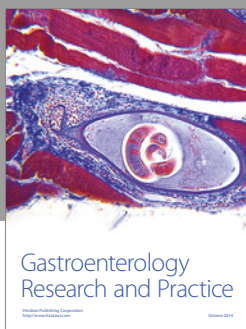
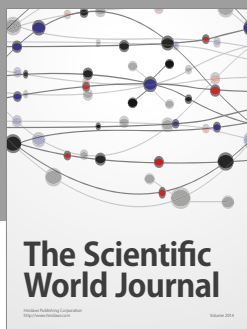
The research on monoamine oxidases in the authors' laboratories is supported by Fondazione Cariplo (Grant 2014-0672), by the French INSERM (Institut pour la Santé Et la Recherche Médicale) and by a grant from the "Région Midi-Pyrénées."

References

- [1] N. Ahmed, R. Mandel, and M. J. Fain, "Frailty: an emerging geriatric syndrome," *The American Journal of Medicine*, vol. 120, no. 9, pp. 748–753, 2007.
- [2] J. Moslehi, R. A. DePinho, and E. Sahin, "Telomeres and mitochondria in the aging heart," *Circulation Research*, vol. 110, no. 9, pp. 1226–1237, 2012.
- [3] D. Cesselli, A. P. Beltrami, F. D'Aurizio et al., "Effects of age and heart failure on human cardiac stem cell function," *The American Journal of Pathology*, vol. 179, no. 1, pp. 349–366, 2011.
- [4] A. Sheydina, D. R. Riordon, and K. R. Boheler, "Molecular mechanisms of cardiomyocyte aging," *Clinical Science (London, England)*, vol. 121, no. 8, pp. 315–329, 2011.
- [5] C. Chimenti, J. Kajstura, D. Torella et al., "Senescence and death of primitive cells and myocytes lead to premature cardiac aging and heart failure," *Circulation Research*, vol. 93, no. 7, pp. 604–613, 2003.
- [6] J. Kajstura, B. Pertoldi, A. Leri et al., "Telomere shortening is an in vivo marker of myocyte replication and aging," *The American Journal of Pathology*, vol. 156, no. 3, pp. 813–819, 2000.
- [7] D. J. Baker, B. G. Childs, M. Durik et al., "Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan," *Nature*, vol. 530, no. 7589, pp. 184–189, 2016.
- [8] E. Sahin, S. Colla, M. Liesa et al., "Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise," *Nature*, vol. 470, no. 7334, pp. 359–365, 2011.
- [9] A. Trifunovic, A. Wredenberg, M. Falkenberg et al., "Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase," *Nature*, vol. 429, no. 6990, pp. 417–423, 2004.
- [10] P. J. Linton, M. Gurney, D. Sengstock, R. M. Mentzer Jr., and R. A. Gottlieb, "This old heart: cardiac aging and autophagy," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 83, pp. 44–54, 2014.
- [11] M. Taneike, O. Yamaguchi, A. Nakai et al., "Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy," *Autophagy*, vol. 6, no. 5, pp. 600–606, 2010.
- [12] H. Kanamori, G. Takemura, K. Goto et al., "Resveratrol reverses remodeling in hearts with large, old myocardial infarctions through enhanced autophagy-activating AMP kinase pathway," *The American Journal of Pathology*, vol. 182, no. 3, pp. 701–713, 2013.
- [13] A. Hoshino, Y. Mita, Y. Okawa et al., "Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial dysfunction in the mouse heart," *Nature Communications*, vol. 4, p. 2308, 2013.
- [14] M. Serrano and M. A. Blasco, "Putting the stress on senescence," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 13, no. 6, pp. 748–753, 2001.
- [15] P. Davalli, T. Mitic, A. Caporali, A. Lauriola, and D. D'Arca, "ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2016, Article ID 3565127, p. 18, 2016.
- [16] S. F. Steinberg, "Oxidative stress and sarcomeric proteins," *Circulation Research*, vol. 112, no. 2, pp. 393–405, 2013.
- [17] Q. Li, D. Su, B. O'Rourke, S. M. Pogwizd, and L. Zhou, "Mitochondria-derived ROS bursts disturb calcium cycling and induce abnormal automaticity in guinea pig cardiomyocyte: a theoretical study," *American Journal of Physiology*.

- Heart and Circulatory Physiology*, vol. 308, no. 6, pp. H623–H636, 2014.
- [18] S. Kurokawa, S. Niwano, H. Niwano et al., “Cardiomyocyte-derived mitochondrial superoxide causes myocardial electrical remodeling by downregulating potassium channels and related molecules,” *Circulation Journal*, vol. 78, no. 8, pp. 1950–1959, 2014.
 - [19] A. Terman, T. Kurz, M. Navratil, E. A. Arriaga, and U. T. Brunk, “Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging,” *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 12, no. 4, pp. 503–535, 2010.
 - [20] P. H. Sugden and A. Clerk, “Oxidative stress and growth-regulating intracellular signaling pathways in cardiac myocytes,” *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 8, no. 11–12, pp. 2111–2124, 2006.
 - [21] A. Nabeebaccus, M. Zhang, and A. M. Shah, “NADPH oxidases and cardiac remodelling,” *Heart Failure Reviews*, vol. 16, no. 1, pp. 5–12, 2011.
 - [22] P. J. Lijnen, J. F. van Pelt, and R. H. Fagard, “Stimulation of reactive oxygen species and collagen synthesis by angiotensin II in cardiac fibroblasts,” *Cardiovascular Therapeutics*, vol. 30, no. 1, pp. e1–e8, 2012.
 - [23] X. Y. Wu, A. Y. Luo, Y. R. Zhou, and J. H. Ren, “N-acetylcysteine reduces oxidative stress, nuclear factor- κ B activity and cardiomyocyte apoptosis in heart failure,” *Molecular Medicine Reports*, vol. 10, no. 2, pp. 615–624, 2014.
 - [24] M. Schwarzer, M. Osterholt, A. Lunkenbein, A. Schrepper, P. Amorim, and T. Doenst, “Mitochondrial reactive oxygen species production and respiratory complex activity in rats with pressure overload-induced heart failure,” *The Journal of Physiology*, vol. 592, no. 17, pp. 3767–3782, 2014.
 - [25] S. Rautiainen, E. B. Levitan, M. A. Mittleman, and A. Wolk, “Total antioxidant capacity of diet and risk of heart failure: a population-based prospective cohort of women,” *The American Journal of Medicine*, vol. 126, no. 6, pp. 494–500, 2013.
 - [26] Z. Tatarkova, S. Kuka, P. Racay et al., “Effects of aging on activities of mitochondrial electron transport chain complexes and oxidative damage in rat heart,” *Physiological Research*, vol. 60, no. 2, pp. 281–289, 2011.
 - [27] D. V. Ziegler, C. D. Wiley, and M. C. Velarde, “Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging,” *Aging Cell*, vol. 14, no. 1, pp. 1–7, 2015.
 - [28] D. F. Dai, L. F. Santana, M. Vermulst et al., “Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging,” *Circulation*, vol. 119, no. 21, pp. 2789–2797, 2009.
 - [29] D. E. Edmondson, C. Binda, J. Wang, A. K. Upadhyay, and A. Mattevi, “Molecular and mechanistic properties of the membrane-bound mitochondrial monoamine oxidases,” *Biochemistry*, vol. 48, no. 20, pp. 4220–4230, 2009.
 - [30] N. Kaludercic, J. Mialet-Perez, N. Paolocci, A. Parini, and F. Di Lisa, “Monoamine oxidases as sources of oxidants in the heart,” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 73, pp. 34–42, 2014.
 - [31] S. D. Sivasubramaniam, C. C. Finch, M. J. Rodriguez, N. Mahy, and E. E. Billett, “A comparative study of the expression of monoamine oxidase-A and -B mRNA and protein in non-CNS human tissues,” *Cell and Tissue Research*, vol. 313, no. 3, pp. 291–300, 2003.
 - [32] M. B. Youdim, D. Edmondson, and K. F. Tipton, “The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors,” *Nature Reviews. Neuroscience*, vol. 7, no. 4, pp. 295–309, 2006.
 - [33] C. Rouzaud-Laborde, N. Hanoun, I. Baysal et al., “Role of endothelial AADC in cardiac synthesis of serotonin and nitrates accumulation,” *PloS One*, vol. 7, no. 7, article e34893, 2012.
 - [34] J. S. Floras, “Sympathetic nervous system activation in human heart failure: clinical implications of an updated model,” *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 54, no. 5, pp. 375–385, 2009.
 - [35] M. D. Esler, A. G. Turner, D. M. Kaye et al., “Aging effects on human sympathetic neuronal function,” *The American Journal of Physiology*, vol. 268, no. 1, pp. R278–R285, 1995.
 - [36] C. Rouzaud-Laborde, C. Delmas, N. Pizzinat et al., “Platelet activation and arterial peripheral serotonin turnover in cardiac remodeling associated to aortic stenosis,” *American Journal of Hematology*, vol. 90, no. 1, pp. 15–19, 2015.
 - [37] R. R. Nigmatullina, V. V. Kirillova, R. K. Jourjikiya et al., “Disrupted serotonergic and sympathoadrenal systems in patients with chronic heart failure may serve as new therapeutic targets and novel biomarkers to assess severity, progression and response to treatment,” *Cardiology*, vol. 113, no. 4, pp. 277–286, 2009.
 - [38] A. M. Selim, N. Sarawat, I. Kelesidis, M. Iqbal, R. Chandra, and R. Zolty, “Plasma serotonin in heart failure: possible marker and potential treatment target,” *Heart, Lung & Circulation*, vol. 26, no. 5, pp. 442–449, 2016.
 - [39] M. W. Rich, “Heart failure in the 21st century: a cardiogeriatric syndrome,” *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, vol. 56, no. 2, pp. M88–M96, 2001.
 - [40] J. Mialet-Perez, R. D’Angelo, C. Villeneuve et al., “Serotonin 5-HT_{2A} receptor-mediated hypertrophy is negatively regulated by caveolin-3 in cardiomyoblasts and neonatal cardiomyocytes,” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 52, no. 2, pp. 502–510, 2012.
 - [41] Y. C. Fu, C. S. Chi, S. C. Yin, B. Hwang, Y. T. Chiu, and S. L. Hsu, “Norepinephrine induces apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes through a reactive oxygen species-TNF α -caspase signaling pathway,” *Cardiovascular Research*, vol. 62, no. 3, pp. 558–567, 2004.
 - [42] C. Villeneuve, C. Guilbeau-Frugier, P. Sicard et al., “p53-PGC-1 α pathway mediates oxidative mitochondrial damage and cardiomyocyte necrosis induced by monoamine oxidase-A upregulation: role in chronic left ventricular dysfunction in mice,” *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 18, no. 1, pp. 5–18, 2013.
 - [43] G. W. De Keulenaer and D. L. Brutsaert, “Systolic and diastolic heart failure are overlapping phenotypes within the heart failure spectrum,” *Circulation*, vol. 123, no. 18, pp. 1996–2004, 2011, discussion 2005.
 - [44] F. S. Loffredo, A. P. Nikolova, J. R. Pancoast, and R. T. Lee, “Heart failure with preserved ejection fraction: molecular pathways of the aging myocardium,” *Circulation Research*, vol. 115, no. 1, pp. 97–107, 2014.
 - [45] A. Maurel, C. Hernandez, O. Kunduzova et al., “Age-dependent increase in hydrogen peroxide production by cardiac monoamine oxidase A in rats,” *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, vol. 284, no. 4, pp. H1460–H1467, 2003.

- [46] R. Pino, P. Failli, L. Mazzetti, and F. Buffoni, "Monoamine oxidase and semicarbazide-sensitive amine oxidase activities in isolated cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats," *Biochemical and Molecular Medicine*, vol. 62, no. 2, pp. 188–196, 1997.
- [47] O. M. Duicu, R. Lighezan, A. Sturza et al., "Assessment of mitochondrial dysfunction and monoamine oxidase contribution to oxidative stress in human diabetic hearts," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2016, Article ID 8470394, p. 12, 2016.
- [48] N. Kaludercic, E. Takimoto, T. Nagayama et al., "Monoamine oxidase A-mediated enhanced catabolism of norepinephrine contributes to adverse remodeling and pump failure in hearts with pressure overload," *Circulation Research*, vol. 106, no. 1, pp. 193–202, 2010.
- [49] P. Umbarkar, S. Singh, S. Arkat, S. L. Bodhankar, S. Lohidasan, and S. L. Sitasawad, "Monoamine oxidase-A is an important source of oxidative stress and promotes cardiac dysfunction, apoptosis, and fibrosis in diabetic cardiomyopathy," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 87, pp. 263–273, 2015.
- [50] J. K. Mallajosyula, D. Kaur, S. J. Chinta et al., "MAO-B elevation in mouse brain astrocytes results in Parkinson's pathology," *PloS One*, vol. 3, no. 2, article e1616, 2008.
- [51] E. J. Anderson, J. T. Efird, S. W. Davies et al., "Monoamine oxidase is a major determinant of redox balance in human atrial myocardium and is associated with postoperative atrial fibrillation," *Journal of the American Heart Association*, vol. 3, no. 1, article e000713, 2014.
- [52] E. Marzetti, A. Csiszar, D. Dutta, G. Balagopal, R. Calvani, and C. Leeuwenburgh, "Role of mitochondrial dysfunction and altered autophagy in cardiovascular aging and disease: from mechanisms to therapeutics," *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, vol. 305, no. 4, pp. H459–H476, 2013.
- [53] A. M. Orogo and A. B. Gustafsson, "Therapeutic targeting of autophagy: potential and concerns in treating cardiovascular disease," *Circulation Research*, vol. 116, no. 3, pp. 489–503, 2015.
- [54] Y. Santin, P. Sicard, F. Vigneron et al., "Oxidative stress by monoamine oxidase-A impairs transcription factor EB activation and autophagosome clearance, leading to cardiomyocyte necrosis and heart failure," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 25, no. 1, pp. 10–27, 2016.
- [55] N. Kaludercic, A. Carpi, T. Nagayama et al., "Monoamine oxidase B prompts mitochondrial and cardiac dysfunction in pressure overloaded hearts," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 20, no. 2, pp. 267–280, 2014.
- [56] B. Wu, L. Yu, Y. Wang et al., "Aldehyde dehydrogenase 2 activation in aged heart improves the autophagy by reducing the carbonyl modification on SIRT1," *Oncotarget*, vol. 7, no. 3, pp. 2175–2188, 2016.



RESEARCH ARTICLE

Shear Stress-Induced Alteration of Epithelial Organization in Human Renal Tubular Cells

Damien Maggiorani^{1,2}✉, Romain Dissard^{1,2}✉, Marcy Belloy^{1,2}, Jean-Sébastien Saulnier-Blache^{1,2}, Audrey Casemayou^{1,2}, Laure Ducasse^{1,2}, Sandra Grès^{1,2}, Julie Bellière^{1,2}, Cécile Caubet^{1,2}, Jean-Loup Bascands^{1,2}, Joost P. Schanstra^{1,2}, Bénédicte Buffin-Meyer^{1,2}*

1 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1048, Toulouse, France,
2 Université Toulouse III Paul Sabatier, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases - I2MC, Toulouse, France

✉ These authors contributed equally to this work.

* benedicte.buffin-meyer@inserm.fr



Abstract

Tubular epithelial cells in the kidney are continuously exposed to urinary fluid shear stress (FSS) generated by urine movement and recent *in vitro* studies suggest that changes of FSS could contribute to kidney injury. However it is unclear whether FSS alters the epithelial characteristics of the renal tubule. Here, we evaluated *in vitro* and *in vivo* the influence of FSS on epithelial characteristics of renal proximal tubular cells taking the organization of junctional complexes and the presence of the primary cilium as markers of epithelial phenotype. Human tubular cells (HK-2) were subjected to FSS (0.5 Pa) for 48h. Control cells were maintained under static conditions. Markers of tight junctions (Claudin-2, ZO-1), Par polarity complex (Pard6), adherens junctions (E-Cadherin, β -Catenin) and the primary cilium (α -acetylated Tubulin) were analysed by quantitative PCR, Western blot or immunocytochemistry. In response to FSS, Claudin-2 disappeared and ZO-1 displayed punctuated and discontinuous staining in the plasma membrane. Expression of Pard6 was also decreased. Moreover, E-Cadherin abundance was decreased, while its major repressors Snail1 and Snail2 were overexpressed, and β -Catenin staining was disrupted along the cell periphery. Finally, FSS subjected-cells exhibited disappeared primary cilium. Results were confirmed *in vivo* in a uninephrectomy (8 months) mouse model where increased FSS induced by adaptive hyperfiltration in remnant kidney was accompanied by both decreased epithelial gene expression including ZO-1, E-cadherin and β -Catenin and disappearance of tubular cilia. In conclusion, these results show that proximal tubular cells lose an important number of their epithelial characteristics after long term exposure to FSS both *in vitro* and *in vivo*. Thus, the changes in urinary FSS associated with nephropathies should be considered as potential insults for tubular cells leading to disorganization of the tubular epithelium.

OPEN ACCESS

Citation: Maggiorani D, Dissard R, Belloy M, Saulnier-Blache J-S, Casemayou A, Ducasse L, et al. (2015) Shear Stress-Induced Alteration of Epithelial Organization in Human Renal Tubular Cells. PLoS ONE 10(7): e0131416. doi:10.1371/journal.pone.0131416

Editor: Shree Ram Singh, National Cancer Institute, UNITED STATES

Received: January 5, 2015

Accepted: June 2, 2015

Published: July 6, 2015

Copyright: © 2015 Maggiorani et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors thank the association 111 des Arts (France) for funding. This funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Urinary fluid shear stress (FSS) is the friction force resulting from movement of urine on the surface of renal tubular cells. It depends on the urine flow rate and viscosity as well as on the diameter of the renal tubule.

Urinary FSS controls tubular exchanges (reabsorption and secretion) by modifying the activity and abundance of transport proteins [1–5]. Interestingly, there is a growing body of evidence showing that modified urinary FSS contributes to the progression of chronic kidney disease (CKD). First, urinary FSS is presumably changed in most of nephropathies, mainly because of variations of urinary flow and/or viscosity (after renal mass reduction or in obstructive, diabetic or hypertensive nephropathies) [6–9], and the detection of urinary FSS is abolished or aberrant in polycystic kidneys resulting from mutations in genes encoding polycystins [10, 11]. Secondly, *in vitro* experiments on renal tubular cells showed that FSS targets a number of molecules involved in the development of CKD. For example, FSS inhibits the activity of plasminogen activators in proximal tubular cells [7, 12]. FSS also induces externalization of angiotensin II receptors from apical recycling endosomes to the apical plasma membrane in tubular cells [13]. A recent study from our laboratory showed that changes in FSS on proximal tubular cells induced upregulation of tubular damage markers such as Kidney injury molecule 1 and Neutrophil gelatinase-associated lipocalin [14]. FSS-injured cells also secrete mediators that stimulate adhesion of monocytes to endothelial cells and their differentiation into inflammatory macrophages [14, 15] suggesting that FSS acts *in vivo* as a promoter of renal inflammation. This combined body of evidence suggests that changes in urinary FSS potentially represent an early aggression for renal tubule cells, thereby playing a role in the progression of CKD [6].

Tubular function is determined by organization of renal tubule in a highly structured monolayer epithelium composed of polarized cells linked together by intercellular junctional complexes. The cell polarity results in the division of the plasma membrane into two distinct areas that differ by composition in proteins and lipids and by the presence of a primary cilium at the apical pole where it acts as a sensory organelle [16]. Tight junctions are formed of transmembrane proteins, including claudins, which interact with homolog proteins in the neighboring cells and with many cytoplasmic proteins such as zonula occludens proteins [17–19]. They provide the apicobasal polarity of tubular cells and regulate the paracellular flux of molecules between urine and interstitium. Adherens junctions are composed of transmembrane proteins, cadherins, which mediate ligation with cadherins on adjacent cells and interact with intracellular anchor proteins including catenins [20, 21]. Their role is to connect the adjacent cell cytoskeleton to form a cohesive epithelium. The renal tubule is recognized as a major target of both acute kidney injury and CKD [18, 19] and tubular lesions were observed in many pathophysiological states where modification of urinary FSS is suspected. For example, after reduction of renal mass (during nephrectomy in animal models or following cancers or trauma in human), chronic, compensatory, increased glomerular filtration rate (GFR) in residual nephrons [22–24] and epithelial tubular structural changes were observed [25, 26]. In early and poorly controlled diabetes, renal hyperfiltration may constitute a risk factor for the development of diabetic nephropathy [27–29]. In addition, in this context, early alterations in epithelial characteristics of the tubular wall were detected [30]. Given that increased GFR can lead to elevated urinary FSS and that previous data suggest the involvement of FSS in tubular aggression in nephropathies, we hypothesized that long term increase in FSS can contribute to the disorganization of the epithelial architecture of the renal tubule in CKD.

Here, we evaluated *in vitro* and *in vivo* the influence of FSS on epithelial characteristics of renal proximal tubular cells taking the organization of tight and adherens junctions and the presence of the primary cilium as markers of the epithelial phenotype. We also investigated the

consequences of FSS-induced loss of epithelial phenotype on tubular cell death and acquisition of mesenchymal characteristics.

Materials and Methods

Cells

The human proximal tubule epithelial cell-line HK-2 [31] was purchased from American Type Tissue Culture. HK-2 cells were cultured at 37°C in 5% CO₂ atmosphere in epithelial medium containing a 1/1 mix of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 11966 Gibco) and Ham's F-12 Nutrient Mix (F-12, 21765 Gibco), Penicillin 100 U/mL, Streptomycin 100 µg/mL, Hydrocortisone 36 ng/mL, Epidermal growth factor 10 ng/mL, Triiodothyronine 4 pg/mL, Insulin 5 µg/mL and supplemented with fetal bovine serum 10% (FBS, 10270 Gibco).

Animals

Twelve male C57BL/6 mice were purchased at Charles River Laboratory. Mice were housed 4 per cage and maintained on a 12h light/12h dark cycle in a pathogen-free environment with free access to water and fed ad libitum a regular diet (D12450B Research Diet) for the duration of the protocol. At the age of 6 weeks, six mice underwent uninephrectomy (UNx) or were sham-operated (sham). Briefly, mice were anesthetized under a flux of oxygen/isoflurane (3%) mix. A dorsal incision was practiced to expose the right kidney and the lower renal artery branch was ligatured and sectioned. Muscle and cutaneous layers were sutured with 2 pints each and isoflurane flux was stopped. An injection of buprenorphine (100 µg/kg, sc) is performed to minimize pain on awakening. Sham-operated mice underwent only dorsal incision and sutures. Sham- and UNx-mice were housed for 8 months before sacrifice and collection of the kidney and blood for further analysis. All experiments were conducted in accordance with the NIH guide for the care and use of laboratory animals and were approved by the animal care and use committee from UMS US006/INSERM, Toulouse, France (protocol agreement #CEEA-122 2014–13).

HK-2 Cell Exposure to Shear Stress

HK-2 cells were grown until confluence on plastic slides coated with collagen IV (20µg/mL, C5533 Sigma). Then slides were assembled into a home-made parallel plate flow chamber. A flask containing 20 mL epithelial medium supplemented with FBS 5% was connected to the input of the chamber. A peristaltic pump was connected on the side to the flask and on the other side to the output of the chamber. Flow of medium culture was controlled by peristaltic pump for 48h as indicated in results. The flow system was kept at 37°C in CO₂ 5%. FSS was based on the formula $6 \mu Q/h^2 l$ where μ is the fluid dynamic viscosity (0.7×10^{-3} Pa.s), Q is the flow rate (3 mL/min), h and l are respectively the flow channel thickness (0.205 mm) and width (10 mm). Estimations based on micropuncture studies in rat proximal tubules [32] have concluded that physiological FSS is about 0.1 Pa in the initial portion of the proximal tubule [5, 14, 15, 33]. In this study, a higher intensity (0.5 Pa) was used, as it is considered to mimic pathologic glomerular hyperfiltration [22, 23]. For the control condition (FSS 0), HK-2 cells were handled similarly but maintained in static conditions with 20mL of epithelial medium-FBS 5% for 48h, as HK-2 cells exposed to FSS.

Analysis of mRNA Expression

Total RNAs were isolated from HK-2 cells or mice kidneys using the RNeasy plus Mini kit (Qiagen). RNA content and purity was quantified by a NanoDrop instrument (ND-1000

spectrophotometer, Thermo Fischer Scientific). cDNA was synthesized from 500ng of RNA using the SuperScript II Reverse Transcriptase kit (Invitrogen). Real-time PCR was performed with 12.5 ng of cDNA, 300 nM of forward and reverse primers (Integrated DNA Technologies, [Table 1](#)) using the SsoFast EvaGreen Supermix kit (Bio-Rad) and a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Relative mRNA expression was calculated by the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) using GAPDH as reference gene. Primers used for PCR were the following: Cdc42 (F) GCATGCTTGTGGATGACTCTGT (R) TGGAACCAGGGAGCAGCTT; Collagen I (F) CCCCTGGAAAGAATGGAGATG (R) TCCAAACCACTGAAACCTCTG; E-Cadherin (F) CCCTCGACACCCGATTCA (R) CCAGGCGTAGACCAAGAAATG; N-Cadherin (F) AGGGGACCTTTTCCTCAAGA (R) CCGAGATGGGGTTGATAATG; GAPDH (F) CATGAGAAGTATGACAACAG (R) AGTCCTTCCACGATACCAAAGT; Fibronectin (F) TAGGCTTTGGAAGTGGTCATTTT (R) CAGCTCATCATCTGCCCATTT; Pard3 (F) AATCC CACACGCTGGTCAAC (R) TAGGACTCCCAGCAGTGTTCTG; Pard6 (F) GCGCAGTCCCGA TAGCAT (R) TCGGAACCTCGGCGTCAA; aPKC (F) CGTGGACACGCCTGATTG (R) CAGCCTGGCATGCATATGC; α SMA (F) CCGGGAGAAAATGACTCAAA (R) GCGTCCA GAGGCATAGAGAG; Snail1 (F) AGGTGGGCGCTGGTCGTAG (R) CCAATCGGAAGCC TAATTA; Snail2 (F) ACGCCCAGCTACCCAATG (R) TCACTCGCCCCAAAGATGAG; Vimentin (F) CCAGAGGGAGTGAATCCAGA (R) AGATGGCCCTTGACATTGAG.

Western Blot Analysis

For protein extraction, HK-2 cells were lysed on ice in lysis buffer (Tris 10mM à pH 7.5, NaCl 150mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, SDS 0.1%, NP40 1% and deoxycholate 1%) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Complete, Mini, Roche). Proteins were separated in a 4–15% SDS-PAGE and blotted on a nitrocellulose membrane (Amersham). Membranes were blocked with TBS-Tween 0.1% supplemented with milk 5% for 30 min. Then, membranes were incubated with primary antibodies (Anti E-Cadherin [1:200, Sc-7870 Santa Cruz], anti Fibronectin [1:500, F3648 Sigma], anti α SMA [1:500, Ab5964 AbCam], anti Vimentin [1:1000, MS-129-P Neomarkers], anti β -Actin (1:5000, A5441 Sigma)) overnight at 4°C followed by incubation with the peroxidase-conjugated secondary antibody (anti rabbit or anti mouse [1:10000, Bethyl]) for 1h. Specific bands were detected using SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) and the ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad). Protein bands were quantified by densitometry using Image Lab software (version 4.0.1, Bio-Rad) and results are expressed as ratio between target protein and β -Actin.

Immunocytochemistry

HK-2 cells were fixed with PBS-paraformaldehyde 4% for 15min, permeabilized with PBS-Triton X100 0.3% for 5 min and blocked with PBS-BSA 5% for 1h. Then cells were labeled with primary antibodies (anti β -Catenin [1:100 Sc-7963 Santacruz], Anti Claudin-2 [1:100 51–6100 Invitrogen], anti α -acetylated Tubulin [1:8000, T7451 Sigma] or anti ZO-1 [1:100 339100 Invitrogen]) for 1 h followed by a 1-h incubation with anti-mouse or anti-rabbit Alexa Fluor 488 or 548 secondary antibody (1:200, Invitrogen). To visualize actin filaments, Phalloidin-FluoP-robes 547H (1:40, Interchim) was added instead antibodies. The slides were then covered with Vectashield mounting medium containing DAPI (Vector Laboratories). Fluorescence images were acquired with an Axio Observer Z.1m inverted microscope (Carl Zeiss) equipped with apotome system to image optical sections. In order to optimize the detection of immunostaining, exposure times are adapted to each photograph. The labeling intensities are thus not comparable from one image to another.

Table 1. *In vitro* studies assessing the effects of FSS on epithelial characteristics of renal cells.

Cell	Culture cell substrate	FSS intensity	FSS duration	Cell characteristics in response of FSS	Ref
Mouse primary proximal cells	glass slide	0.01–0.07 Pa	24h	↓ cytosolic actin stress fibers ↑ lateral actin network	[7]
LLC-PK1 cell line	glass slide	0.01 Pa	24h	↑ lateral actin network	[7]
Mouse podocyte cell line	collagen IV coated glass slide	0.001–0.05 Pa	20h	↓ cytosolic actin stress fibers ↑ lateral α-Actinin (AJ) staining ≠ lateral ZO-1 (TJ) staining morphology: from continuous to discontinuous/punctuated	[46]
Mouse proximal tubular cell line	collagen coated glass slide	0.1 Pa	5h	↓ cytosolic actin stress fibers ↑ lateral actin network ≠ E-Cadherin (AJ) staining: from intracellular to lateral position ↑ lateral ZO-1 staining	[33]
Rat primary inner medullary collecting duct cells	porous fibronectin coated membrane	0.1 Pa	5h	↓ cytosolic actin stress fibers ↑ lateral actin network ≠ E-Cadherin staining: from intracellular to lateral position ↓ intracellular punctuated and ↑ lateral continuous β-Catenin (AJ) staining	[44]
Rat primary inner medullary collecting duct cells	glass slide	0.1 Pa	5h	↓ cytosolic actin stress fibers ↑ lateral actin network ↓ intracellular punctuated and ↑ lateral continuous β-Catenin staining	[44]
Human primary tubular cells ¹	supramolecular polymer mesh ²	? ⁴	19 days	↑ lateral ZO-1 staining	[42]
Human primary tubular cells ¹	bioactive supramolecular polymer mesh ³	? ⁴	19 days	≠ lateral ZO-1 staining morphology: from “straight” to “zig zag”/jagged	[42]
Rat primary inner medullary collecting duct cells	porous polyester membrane	0.1 Pa	3h	↓ cytosolic actin stress fibers ↑ lateral actin network	[2]
MDCK cell line	Thermanox slides	0.2 Pa	6h	↓ cytosolic actin stress fibers ≠ lateral actin network: clustering around cell edges ≠ lateral ZO-1 staining morphology: from “zig zag”/jagged to “straight”	[41]
HK-2 cell line	blank substrat ⁵	0.002–0.1 Pa	2h	→ lateral ZO-1 staining (discontinuous/punctuated)	[45]
HK-2 cell line	topographical substrat ⁶	0.002–0.1 Pa	2h	↑ lateral ZO-1 staining and ≠ staining morphology: more continuous/less punctuated	[45]
Human primary proximal tubular cells	porous ECM coated membrane	0.02 Pa	18h	↓ cytosolic actin stress fibers ≠ lateral ZO-1 staining morphology: from slight punctuated to continuous ↑ primary cilia formation	[43]
Murine immortalized cortical collecting duct cells	glass slide	0.02 Pa	30 min	↑ cytosolic actin stress fibers → lateral actin network → lateral Occludin (TJ) staining → lateral ZO-1 staining	[52]

FSS was tested on renal cells and changes in organization of actin cytoskeleton, adherens junctions (AJ), tight junctions (TJ) or primary cilium were determined by comparison with no FSS condition, where cells remained in static media during the same time than flow tests.

Lateral, at the periphery of the cells; ECM, extracellular matrix; ↑, increase in; ↓, decrease in; ≠, change in; → no change in.

¹The population of tubular cells is heterogeneous because composed of cells derived from all tubular segments.

^{2,3}The supramolecular polymers used were self-assembled into nano-meter scale fibers by electro-spinning to mimic basement membrane; bioactivity was introduced into these nano-fibers by intercalation of different ECM peptides, in order to ameliorate synthetic basement membrane.

⁴FSS induction was performed through flow of medium culture at a rate of 1 mL/h. However, without knowing the size of perfusion chamber, it is impossible to give the intensity of FSS.

^{5,6}Topographically patterned substrate mimics micro- and nano-scale topographic structures contained in the basement membrane of the kidney tubule; blank substrates lacked of geometric structures.

doi:10.1371/journal.pone.0131416.t001

Detection of Apoptosis and Necrosis

HK-2 cells were assessed for apoptosis and necrosis using Cell Meter Annexin V Binding Apoptosis Assay Kit (AAT Bioquest), according to the manufacturer's instructions. For this, cells were detached from slides using trypsin and then trypsin was inactivated with epithelial medium supplemented with FBS 10%. After gently centrifugation and washing with PBS, Annexin V-iFluor 488 (1:400) and Iodure propidium (1:400) were added to the cell suspension for incubation in the dark for 15 min at 37°C. Then, 0.3 ml of ice-cold 1× annexin-binding buffer was added, and induction analysis was conducted by flow cytometry (BD FACSVerse, BD Biosciences) with BD FACS Suite software (BD Biosciences) using FL1 and FL2 ranges for Annexin V-iFluor 488 and Iodure propidium, respectively. In each of the graphs, the bottom left quadrant represents live cells, the bottom right quadrant represents cells in early apoptosis and the top right quadrant represents cells in necrosis (primary or secondary).

Evaluation of Renal Function

Glomerular filtration rate (GFR) was evaluated by measurement of FITC-inulin clearance, as previously described [34, 35]. Briefly, mice were anesthetized under a flux of oxygen/isoflurane (97/3%) before injecting retroorbitally 2 µl/g of a 5% solution of FITC-inulin (F3272 Sigma). Caudal blood (25–30 µl) was collected in heparinized tubes (Microvette 16.443 Sarstedt Nümbrecht) at 3, 7, 10, 15, 35, 55, 75 minutes post-injection of FITC-inulin. Isoflurane flux was then removed and the mice were replaced in their cage with free access to water and food. After blood centrifugation, FITC-inulin concentration was determined by spectrofluorimetry (485 nm excitation/538 nm emission) against a standard curve of FITC-inulin (0–100 µg/ml). GFR (µl/min) was calculated using a two-compartment clearance model (<http://curvefit.com/id205.htm>) as previously described [35]. The single kidney GFR (skGFR) value in sham mice was further estimated by urinary GFR/2 ratio.

Renal Histology and Immunohistochemistry

Kidneys were collected from each mouse included in the renal function study. Tissues were fixed in Carnoy's solution for 24 h, embedded in paraffin and micrometer sections were cut. For histological analysis, renal sections were subjected to periodic acid-Schiff staining (PAS), scanned using a Nanozoomer 2.0 RS (Hamamatsu Photonics SARL) and treated with the Morpho-expert image-analysis software (version 1.00, Explora Nova) for renal corpuscle surface quantification. For immunohistochemistry analysis of primary cilia, renal sections were deparaffinized in toluene and rehydrated from xylene through a series of graded ethanol washes. After treatment with sodium borohydride 1% (71321 Sigma, 20 min at 4°C) and washes in PBS—Tween 0.01%, sections were permeabilized in PBS—Triton X-100 0.2% for 20 min and blocked with PBS—BSA 3% for 30 min. Sections were then labeled with specific anti- α -acetylated Tubulin antibody [1:200, T7451 Sigma] overnight at 4°C followed by a 1-h incubation with anti-mouse Alexa Fluor 568 secondary antibody (1:200, Invitrogen) supplemented with OG488-conjugated wheat germ agglutinin (WGA, Invitrogen). After covering of the slides with Vectashield mounting medium containing DAPI (Vector Laboratories), sections were scanned with a Nanozoomer 2.0 RS. For assessment of disappearance of cilia, the number of primary cilia in cortex renal tubules was manually counted using the NDP.view software and expressed as the number of tubular primary cilia per mm² of renal area.

Urine Analysis

Mice were placed in metabolic cages and urine was collected on a 24-h period. Urinary albumin concentration was determined with a mouse antigen specific ELISA (Mouse Albumin Quantitation Albuwell Kit, Exocell). Urinary creatinine concentration was determined using enzymatic colorimetric assay (Quantichrom Creatinine Assay Kit, BioAssay Systems).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software Inc) and a Mann-Whitney's test was performed to compare two groups (FSS 0.5 Pa *versus* FSS 0 [4–7 experiments] or UNx *versus* sham [6 mice per group]). All data are expressed as mean $\pm$ SEM. $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results

In Vitro Effect of Chronic High FSS on Intercellular Junctions of Renal Tubular Cells

First, we examined the effect of FSS on tight and adherens junctions in tubular cells. For this, HK-2 tubular proximal cells were exposed to chronic and high FSS (0.5 Pa for 48h, see [materials and methods](#)) and were compared to cells maintained under static conditions. The organization of the tight junctions was evaluated by immunocytochemical analysis of the cellular distribution of two major proteins, Claudin-2 and ZO-1 (Zonula occludens-1). In static conditions (FSS 0), Claudin-2 was detected in both plasma membrane and cytoplasm (as dot-like structures) while ZO-1 was only localized at the plasma membrane majorly as a continuous belt ([Fig 1A](#)). FSS caused the disappearance of Claudin-2 and changes the staining of ZO-1, which remained at the plasma membrane but becomes punctuated and discontinuous ([Fig 1A](#)). These modifications were concomitant with downregulation of protein expression, as revealed by Western blot analysis ([S1 Fig](#)). These results indicate that FSS induces disruption of tight junctions in tubular cells. The integrity of Par complex, that plays a critical role in tight junction formation and epithelial polarization [36, 37], was also investigated by measuring expression of Pard6 (Partitioning defective-6), Pard3 (Partitioning defective-3), aPKC (atypical protein kinase C) and Cdc42 (cell division cycle 42). When HK-2 cells were subjected to FSS, no change in mRNA levels of Pard3, aPKC and Cdc42 was detected ([Fig 1B](#)). However Pard6 mRNA expression was strongly reduced ([Fig 1B](#)), suggesting that FSS induces disruption of the Par complex thereby strengthening the demonstration that FSS leads to tight junction alteration.

The effect of FSS on adherens complexes was studied by analyzing by immunocytochemistry the localization of β -Catenin and by quantifying the expression of E-Cadherin as well as two of its repressor transcription factors, Snail1 and Snail2. In response to FSS, although staining is still seen predominantly in the periphery of the cell, β -catenin distribution was disrupted, with a more jagged and discontinuous pattern ([Fig 2A](#)). This effect was not accompanied with significant change in β -Catenin protein expression ([S1 Fig](#)). In parallel, mRNA and protein E-Cadherin expression was significantly reduced ([Fig 2B](#)) whereas the level of mRNA encoding Snail1 and Snail2 was significantly increased ([Fig 2C](#)). These results indicate that FSS disturbs adherens junctions of tubular cells.

To test the influence of FSS intensity, HK-2 cells were subjected to FSS 0 (static control), 0.01, 0.1 or 0.5 Pa for 48h and a number of epithelial cell specific markers were investigated as described previously ([S2 Fig](#)). In response to FSS 0.01 Pa, staining of Claudin-2, ZO-1 and β -Catenin was not modified. Claudin-2 expression strongly decreased with increasing FSS and staining of ZO-1 was found with a punctuated pattern in the plasma membrane under FSS 0.1

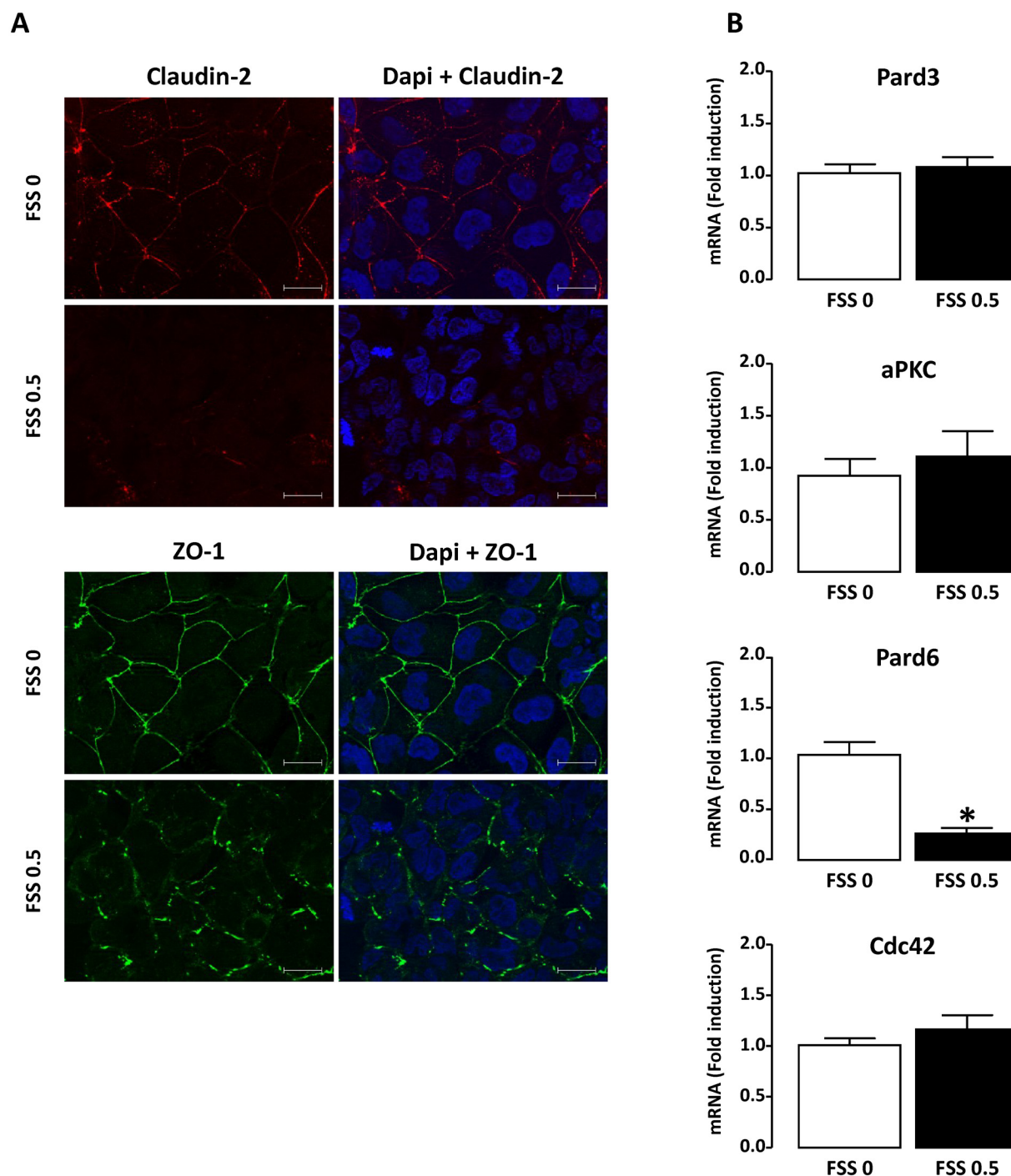


Fig 1. FSS induces disruption of tight junctions in renal tubular cells. Confluent monolayers of HK-2 cells were submitted to FSS 0 (static) or FSS 0.5 Pa (FSS 0.5) for 48h. **A/** The localization of Claudin-2 or ZO-1 was analyzed by immunofluorescence. Cells were counterstained with DAPI. Pictures display representative areas of staining from three independent experiments. Red, Claudin-2; green, ZO-1; blue, DAPI-nuclei. Bars indicate 20 μ m. **B/** The level of mRNA encoding for Pard3, Pard6, aPKC and Cdc42 was quantified by real-time PCR and results are expressed as the fold induction compared to static condition. Data represent mean $\pm$ SEM of 4–6 experiments. * $p < 0.01$ versus FSS 0.

doi:10.1371/journal.pone.0131416.g001

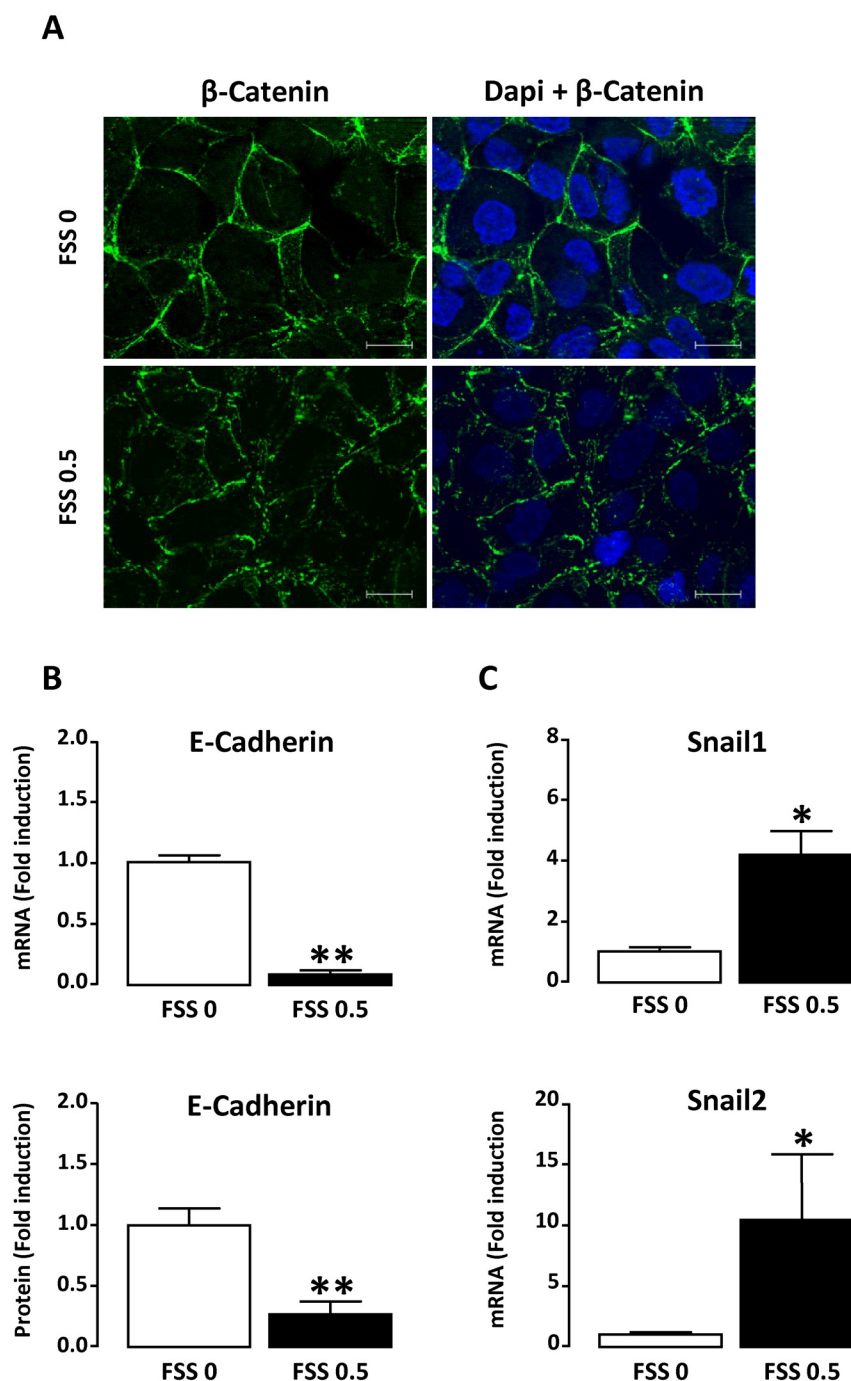


Fig 2. Alteration of adherens junctions in response to FSS. Confluent monolayers of HK-2 cells were submitted to FSS 0 (static) or FSS 0.5 Pa (FSS 0.5) for 48h. **A/** Immunofluorescence detection of β -Catenin. Cells were counterstained with DAPI. Pictures display representative areas of staining from three independent experiments. Green, β -Catenin; blue, DAPI-nuclei. Bar indicates 20 μ m. **B/** Real-time PCR and Western blot analysis of E-Cadherin mRNA and protein, respectively. **C/** Real-time PCR was used for evaluation of mRNA levels encoding Snail1 or Snail2. In B and C, results are expressed as the fold induction compared to static condition and data represent mean $\pm$ SEM of 4–7 experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus FSS 0.

doi:10.1371/journal.pone.0131416.g002

Pa and exacerbated at a FSS of 0.5 Pa. Finally, FSS 0.5 Pa induced disorganization of β -Catenin. The response of tubular cells to FSS appears thus to be dependent on the intensity of FSS applied.

In Vitro Effect of FSS on Primary Cilia and Actin Cytoskeleton

Next, we examined whether FSS (0.5 Pa, 48h) induces loss of the primary cilium in tubular cells. Cilia were visualized by immunostaining with anti α -acetylated Tubulin antibody. As shown in [Fig 3A](#), cilia were observed in HK-2 cells in static conditions and FSS induced disappearance of cilia, accompanied by relocation of α -acetylated Tubulin into the cytoplasm. Since intercellular junctions and the cilium basis interact with actin cytoskeleton, we also studied the effect of FSS on the organization of the actin cytoskeleton in HK-2 cells. For this, we used Phalloidin staining, which detects filamentous (F) actin, and Apotome-imaging microscopy, to sequentially analyze basal and apical sides. In static conditions, actin was found as numerous long and thick cytosolic stress fibers spanning the entire cross sectional area of the cells at the basal side while actin microfilaments are organized as a thin circumferential network at cell-cell contacts at the subapical side ([Fig 3B](#)). Under FSS 0.5 Pa (48h), no marked change in actin microfilament organization was observed ([Fig 3B](#)), suggesting that FSS-treated cells did not display marked F-actin rearrangement. These results indicate that the perturbation of intercellular junctions and the deciliation of tubular cells generated by FSS are independent from F-actin rearrangement.

In Vitro Effect of FSS on Cell Death and EMT

Tubular apoptosis and necrosis are exacerbated in CKD, thereby contributing to tubular atrophy [38]. In addition, our laboratory has previously shown that exposure of HK-2 cells to FSS causes hyper-secretion of TNF- α [15], known to induce apoptosis in these cells [39]. To test whether FSS-induced dedifferentiation was associated to tubular cell death, HK-2 cells exposed or not to FSS 0.5 Pa for 48h were double-labeled with annexin V and propidium iodide. Analysis was performed by flow cytometry to separate live cells (non-labeled), cells in early phase of apoptosis (annexin V-positive, negative for propidium iodide) and necrotic cells (post-apoptotic or not, double positive). As shown in [Fig 4](#), no change in the proportions of the different cell populations was observed between FSS 0 and FSS 0.5 Pa, thereby indicating that chronic FSS does not cause apoptosis or necrosis of the tubular cells.

Even if the real contribution of EMT (epithelial mesenchymal transition) in renal fibrogenesis remains controversial, many studies showed that injured tubular cells lose epithelial features and acquire mesenchymal characteristics in CKD [38, 40]. To verify whether the above observed FSS-induced changes on epithelial cells were accompanied by an EMT, the expression of Vimentin, α SMA, Fibronectin, Collagen I and N-Cadherin as mesenchymal markers was measured in FSS subjected HK-2 cells. As shown in [Fig 5A](#), FSS did not significantly change the level of mRNA encoding Vimentin, Fibronectin, Collagen I and N-Cadherin. Results were confirmed at protein level, as demonstrated for Vimentin and Fibronectin ([Fig 5B](#)). In addition, FSS induced a downregulation of α SMA mRNA ([Fig 5A](#)) but this was not confirmed at the protein level ([Fig 5B](#)). These results indicated that FSS does not lead to EMT.

In Vivo Effect of Increased Urinary FSS

Finally, we evaluated *in vivo* the effect of increased urinary FSS. We used an animal model where increased FSS was induced in proximal tubule by increased urinary flow following hyperfiltration. For this, C57BL/6 mice were uninephrectomized (UNx) by removing the right kidney. The left kidney was harvested 8 months later to analyse tubular epithelial markers. As expected [22–24], total GFR was maintained within the normal range in UNx subjected animals through adaptive increased single kidney (sk) GFR ([Fig 6A](#)), thereby leading to increased urinary FSS in

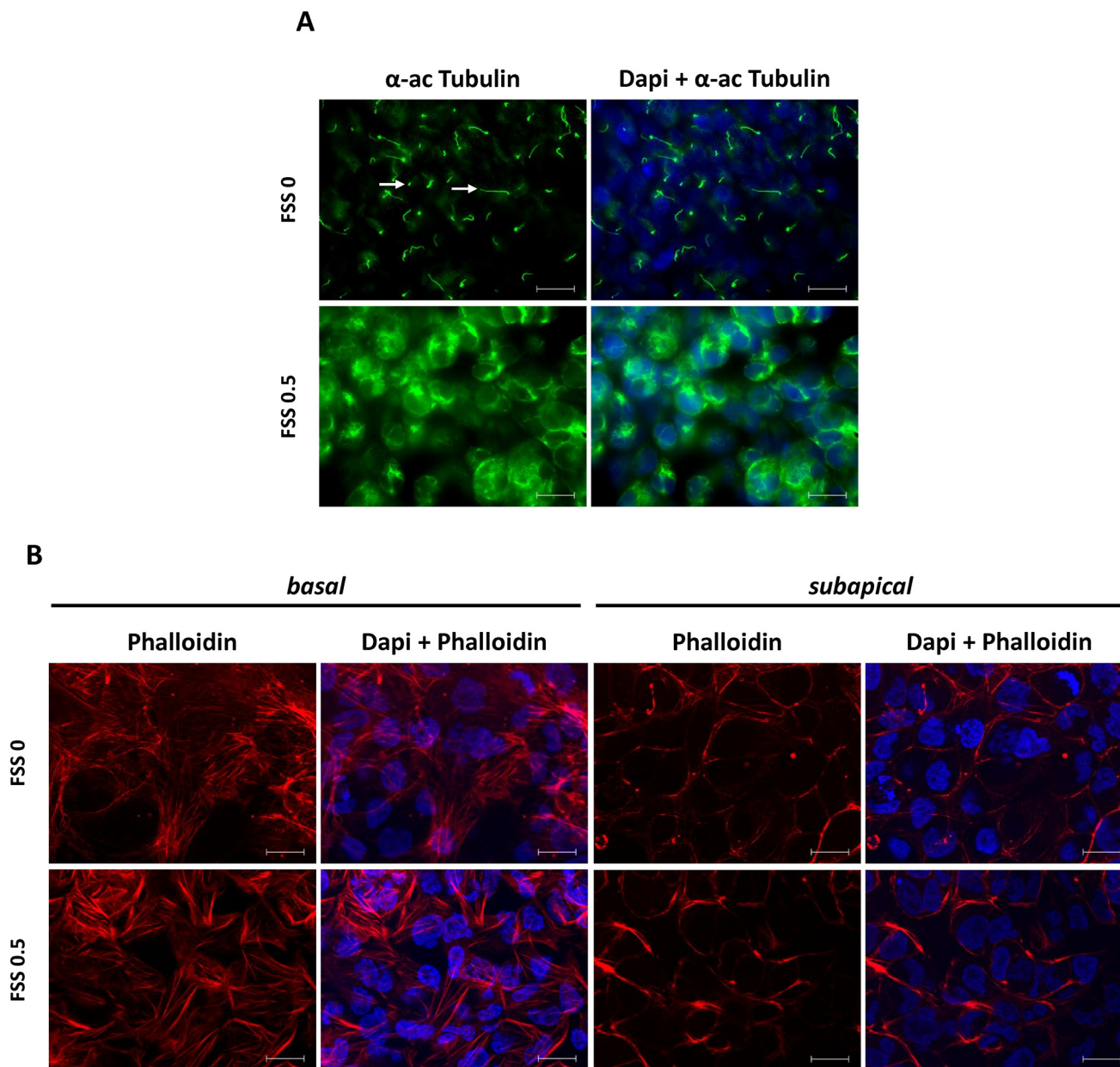


Fig 3. FSS-exposed cells exhibit loss of the primary cilium without marked change in actin cytoskeleton organization. Confluent monolayers of HK-2 cells were submitted to FSS 0 (static) or FSS 0.5 Pa (FSS 0.5) for 48h. **A/** α -acetylated Tubulin was analyzed by immunofluorescence to visualize the primary cilium. White arrows show primary cilia. **B/** Phalloidin was used to stain the actin cytoskeleton (basal [left] and subapical [right]). Cells were counterstained with DAPI. Pictures display representative areas of staining from 5 independent experiments. Green, α -acetylated Tubulin; red, Phalloidin; blue, DAPI-nuclei. Bars indicate 20 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0131416.g003

remnant nephrons. In addition, elevated skGFR was accompanied by a significant glomerular hypertrophy, as indicated by increase of the renal corpuscle area (Fig 6B), thereby confirming the compensatory hyperfiltration. Urine albumin excretion was not significantly modified (Fig 6A) and tubular dilatation was not detected (Fig 6B). However the mRNA level of epithelial makers ZO-1, E-Cadherin and β -Catenin was significantly decreased in UNx animals compared to sham (Fig 7A). In addition, a decreased number of primary cilia in tubular cells was detected

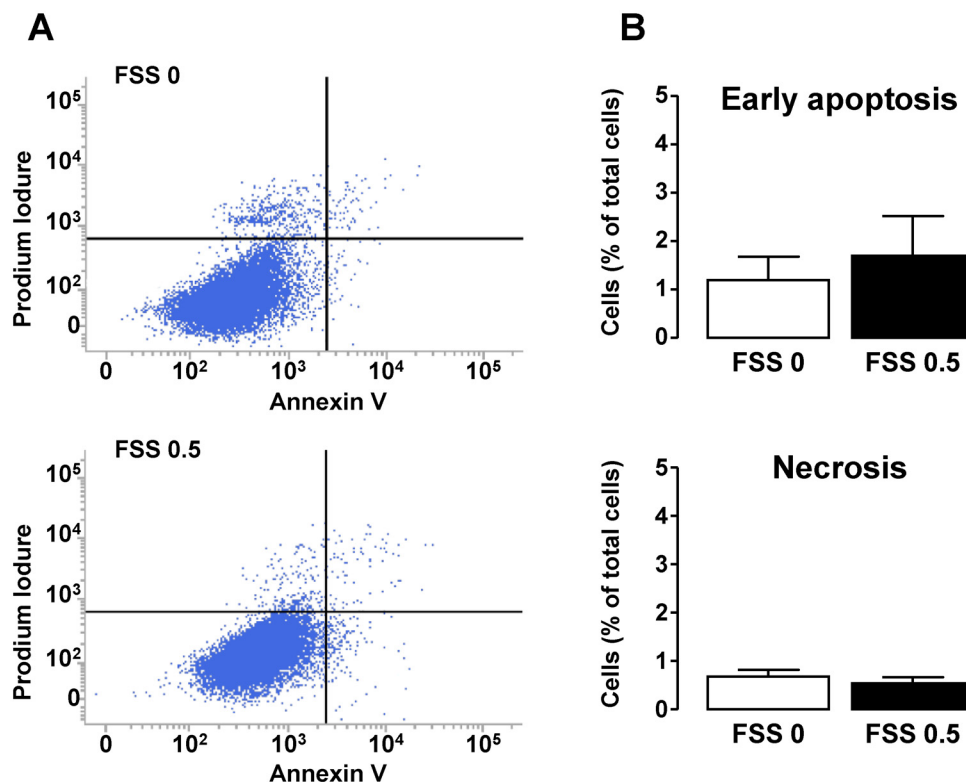


Fig 4. Effect of FSS on apoptosis and necrosis in tubular cells. Confluent monolayers of HK-2 cells were submitted to FSS 0 (static) or FSS 0.5 Pa (FSS 0.5) for 48h. **A/** Cells were stained with Annexin-V and then immediately subjected to analysis of phosphatidylserine externalization (Annexin-V fluorescence, X-axis) and Propidium Iodide (PI) uptake (PI fluorescence, Y-axis) using flow cytometry. Living, early apoptotic or necrotic (primary or secondary) cells were distinguished by the criteria of Annexin-V⁻/PI⁻ (bottom left quadrant), Annexin-V⁺/PI⁻ (bottom right quadrant) and Annexin-V⁺/PI⁺ (upper right quadrant), respectively. **B/** Proportions of early apoptosis and necrosis cells were quantified and results are expressed as a percentage of the total population of cells. Data represent mean $\pm$ SEM of 7 experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0131416.g004

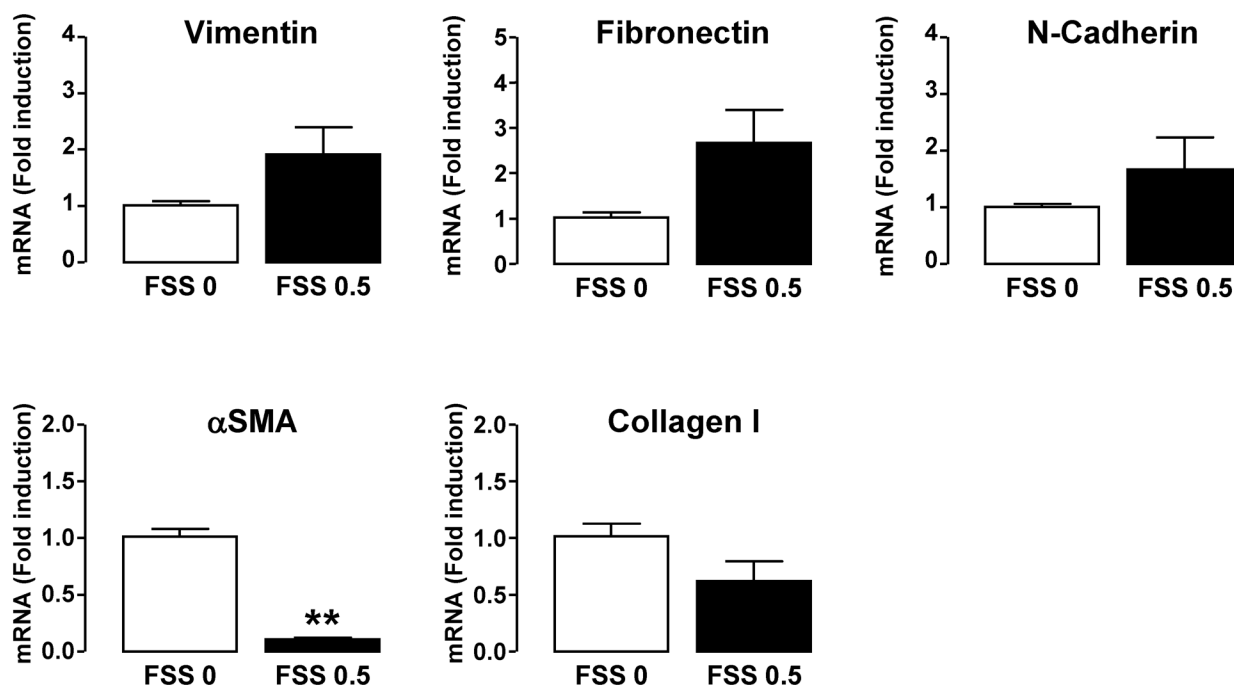
(Fig 7B). Taking into account the observations *in vitro*, these data suggest that increased FSS *in vivo* is associated, as well, with a reduction of expression of epithelial markers.

Discussion

Pathologic FSS Leads to Structural Changes in Renal Tubular Cells

The present study demonstrates that *in vitro* exposure of proximal tubular cells to high and chronic FSS (0.5 Pa, 48h) leads to significant structural cell changes. Firstly, Claudin-2, ZO-1 and Pard6, which account for tight junction organization, were lost. Secondly, β -Catenin localisation and E-Cadherin abundance, as markers of adherens junctions, were disrupted and decreased, respectively. The latter was due to a strong FSS induced-stimulation of Snail1 and Snail2, two transcription factors well known to repress E-Cadherin expression. Thirdly, the primary cilium disappeared under FSS. Since tight junctions, adherens junctions and cilium are hallmarks of epithelial cells, our data indicate that tubular cells lose characteristics of differentiated epithelial cells in response to pathologic FSS. The deciliation is likely the consequence rather than the cause of tubular dedifferentiation, since removal of primary cilium by treatment with hydrate chloral failed to mimic the FSS effects in static-renal cells (data not shown).

A



B

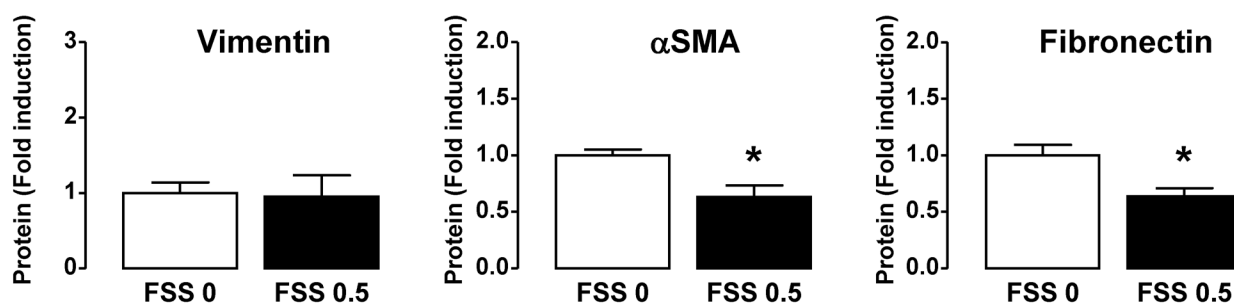


Fig 5. FSS does not induce a mesenchymal phenotype in tubular cells. Confluent monolayers of HK-2 cells were submitted to FSS 0 (static) or FSS 0.5 Pa (FSS 0.5) for 48h. **A/** Transcript level of mesenchymal markers such as Vimentin and αSMA (cytoskeleton), Fibronectin and Collagen I (ECM), N-Cadherin (intercellular junction) was quantified by real-time PCR. Results are expressed as the fold induction compared to static condition. **B/** Protein level of Vimentin, αSMA and Fibronectin was measured by Western blot. Results are expressed as the fold induction compared to static condition and data represent mean ± SEM of 4 experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus FSS 0.

doi:10.1371/journal.pone.0131416.g005

Although FSS is known to influence renal function [1–5], its precise impact on epithelial organization of renal cells remains poorly understood. Some reports propose that FSS favors the differentiation of tubular cells by promoting actin cytoskeleton rearrangement and formation of intercellular junctions [2, 7, 33, 41–45]. Another study suggests that FSS causes disruption of tight junctions in tubular cells [46]. Our results are in agreement with this last study.

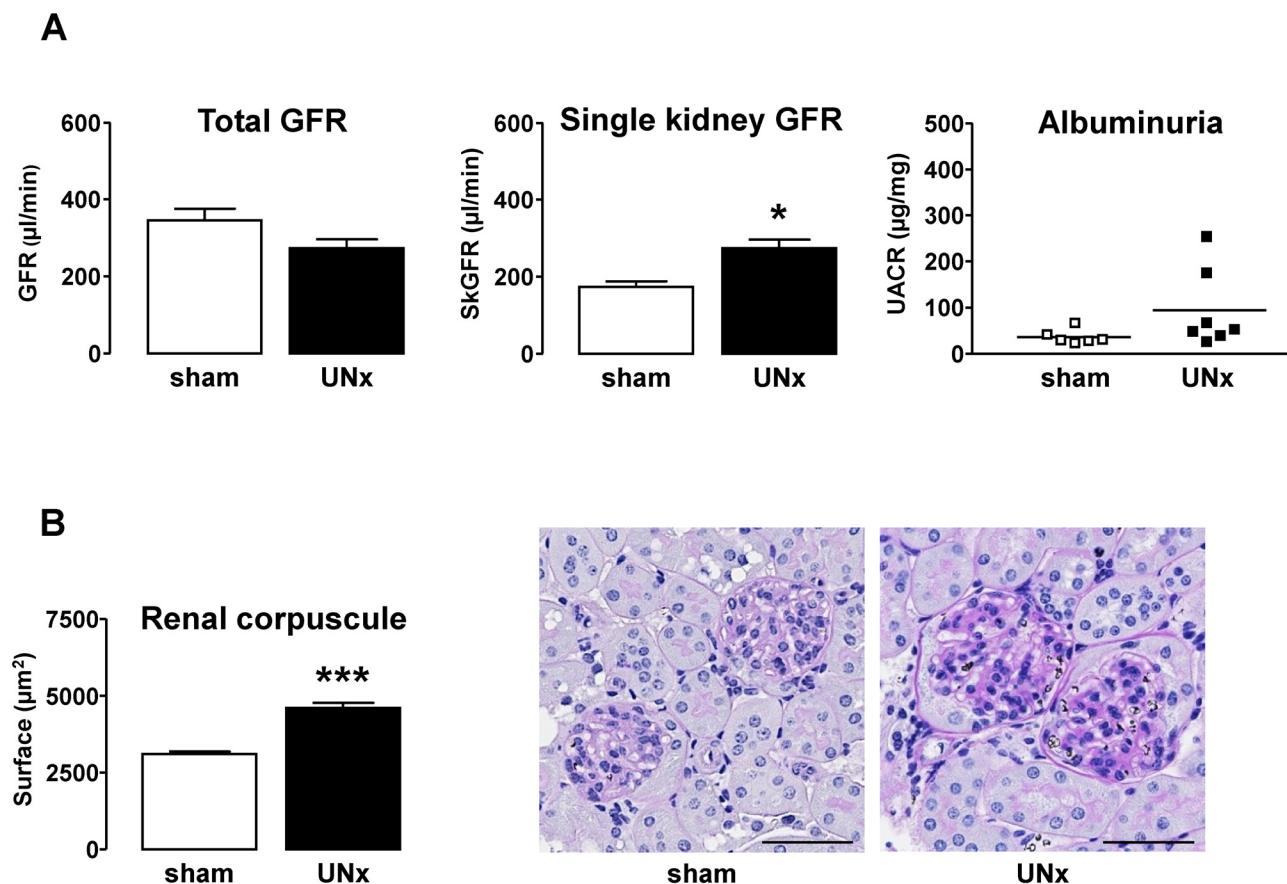


Fig 6. Uninephrectomy as an animal model of increased urinary FSS. Sham- and UNx-mice were analyzed 8 months after surgery. **A/** Renal function was evaluated by measuring glomerular filtration rate (GFR), single kidney GFR (skGFR) and urinary albumin/creatinine ratio (UACR). **B/** Renal corpuscle surface was measured on PAS-stained kidney slices. Pictures display representative areas of staining and bars indicate 200 µm. Data represent mean ± SEM from 6 animals per group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ versus sham.

doi:10.1371/journal.pone.0131416.g006

Several reasons might account for the discrepancies between reports. i) The impact of FSS on tubular cells might be different according to its intensity, as demonstrated in [S1 Fig](#). In our study, the intensity of FSS was higher (0.5 Pa) compared to those applied in the other reports (0.002–0.1 Pa) [[2](#), [7](#), [33](#), [41](#), [43–45](#)], all lower or equal to physiological FSS ([Table 1](#)). Although under the physiological cutoff of FSS, Friedrich et al study [[46](#)] have shown that FSS-induced loss of epithelial phenotype is dependent on FSS level. In addition, other effects have been reported to be dependent on the intensity of FSS, such as e.g. the inhibition of the fibrinolytic system in LLC-PK1 cells [[7](#)] or the reduction in motility of HK-2 cells [[47](#)]. ii) The effect of FSS might also depend on its duration. We used chronic FSS exposure (48h) whereas shorter exposure were used in the other reports (2h–24h) [[2](#), [7](#), [33](#), [41](#), [43–45](#)] ([Table 1](#)). Moreover, it has been already demonstrated that tubular cells can respond to a same stimulus in a biphasic manner, with a long term effect which is the opposite of that in short term [[48](#), [49](#)]. Interestingly a strong temporal and oscillatory regulation of key Erk pathway molecules, Snail1 and Occludin (a marker of tight junctions) has been identified in HK-2 cell exposed to FSS [[47](#)]. iii) The impact of FSS on tubular cells might also be different according to the species (human in our study vs mouse [[7](#), [33](#), [43](#)], rat [[2](#), [44](#)], dog [[41](#)] or pig [[7](#)]) and/or the type of renal cells (proximal tubule in our study vs collecting duct [[2](#), [41](#), [44](#)] or heterogeneous tubular cells [[50](#)])

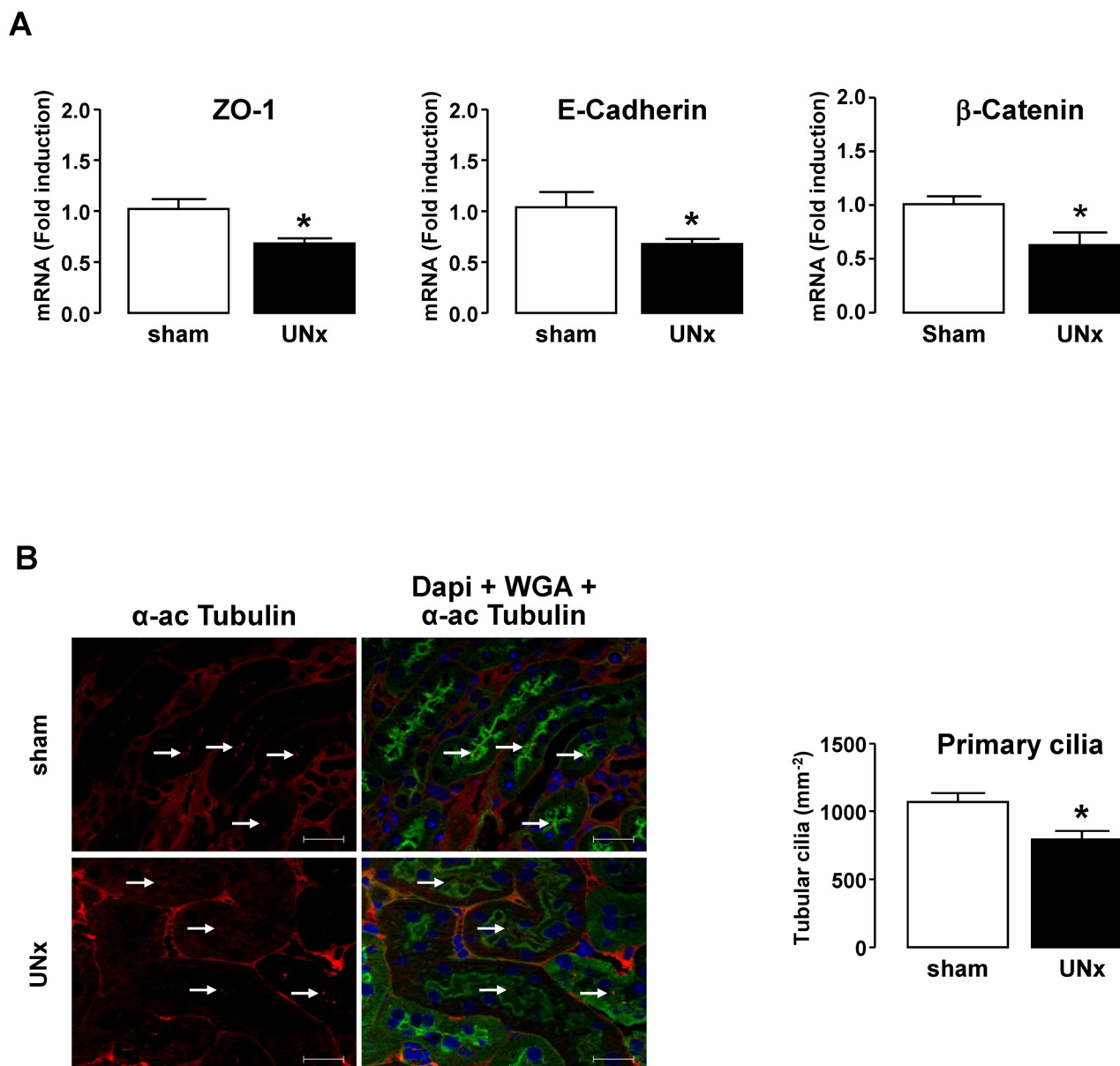


Fig 7. Effect of uninephrectomy-mediated FSS on epithelial gene expression and the density of primary cilia. Sham- and UNx-mice were analyzed 8 months after surgery. **A/** The expression of ZO-1, E-cadherin and β-Catenin mRNA was quantified by real-time PCR from total RNA extracted from kidney cortex. Results are expressed as the fold induction compared to sham. **B/** Immunofluorescence detection of α-acetylated Tubulin for quantification of the primary cilium. Kidney sections were counterstained with WGA and DAPI. Pictures in the left panel display representative areas of staining. Red, α-acetylated Tubulin; green, WGA-cell membranes; blue, DAPI-nuclei. Bar indicates 20 μm and white arrows show primary cilia. Graph in the right panel displays quantification of primary cilia by cortex tubular section. Data represent mean ± SEM from 6 animals per group. *p<0.05 versus sham.

doi:10.1371/journal.pone.0131416.g007

(Table 1) since it is known that cells respond to FSS in a cell type-specific fashion [7, 33, 51]. iv) The type of culture cell substrate (material and ECM coating) (Table 1) appeared to be critical for the response to FSS [42, 45]. v) Finally, the probably most important difference between reports concerned the state of differentiation of renal cells before exposure to FSS. Cells that sense and respond to extracellular fluid flow have special sensory organelles such as primary cilium, glycocalyx layer, brush border microvilli [51] which are uniquely present in

differentiated cells. Studies in [33, 41, 43–45, 50] were conducted on cells exhibiting no tight or adherens junctions nor primary cilium under static conditions, showing their low level of differentiation. In contrast, we and works in [46, 52] used more differentiated renal cells with already formed intercellular junctions in static conditions and it is known that the sensitivity of many cells to insults strongly depends on their differentiation state [53–55].

Pathologic FSS Does Not Lead to Tubular Cell Death or EMT

Our data show that although FSS leads to structural changes of tubular cells, it is neither associated to cell death nor to EMT. Another mechanism that might lead to loss of functional epithelial cells is cell senescence. Cell senescence is a general stress-response program, characterized by an irreversible growth arrest and set of functional and morphological changes, especially including disrupted cell-cell junctions [56, 57]. Acceleration of senescence represents a relevant mechanism by which tubular cells are injured in diabetic nephropathy [58, 59] and FSS was proposed to contribute to senescence of chondrocytes and endothelial cells [60, 61]. Further investigations could therefore be conducted to test whether renal tubular cells adopt a senescence-like phenotype in response to FSS.

Downstream Signals of FSS in Tubular Cells

We have previously observed that FSS exposure alters the secretion of a number of chemokines/cytokines in proximal tubular cells [14] that could account for the observed tubular changes. For example, FSS stimulated HK-2 cells release epidermal growth factor, a molecule that is known to induce disruption of tight and adherens junctions in renal tubular cells [62–64]. Nevertheless, several other scenarios downstream of FSS can be proposed. Wnt signaling, strongly associated with cell dedifferentiation, is activated by FSS in osteoblasts [65]. After stimulation, this pathway leads to nuclear translocation of β -Catenin, which in turn acts as a transcription factor. Our result show that FSS led to disorganization of β -Catenin staining at the periphery of the cells. However, there is no evidence to support migration of this protein into the nucleus, indicating that the Wnt pathway is probably not activated by FSS in renal tubular cells. Further experiments should be performed to definitively exclude a role of this signaling pathway. The hedgehog pathway is also associated with cell dedifferentiation because its inhibition in stomach epithelial cells causes disruption of intercellular junctions [66]. However, we found that blocking the hedgehog pathway in static HK-2 cells with cyclopamine did not mimic the FSS effects (data not shown), suggesting that hedgehog pathway is not responsible for the dedifferentiation under FSS.

In Vivo Relevance of FSS Effects

Many pathological states directly affect intercellular junctional complexes [18, 19, 67–69]. In addition, significant shortening of cilia on proximal tubule cells, associated with cell dedifferentiation, was also observed in renal injury induced by ischemia-reperfusion [70] and in proximal tubular cells treated *in vitro* with transforming growth factor-beta (a key player in tubular aggression during CKD) [71]. Thus our *in vitro* results suggest that chronic non physiological FSS can be considered as an insult for proximal tubular cells, leading to significant structural changes of these cells. We obtained evidence for the role of FSS in the structural epithelial changes *in vivo*. The loss of nephron mass with resultant increased single nephron GFR has been recognized as a principal mediator that contributes to CKD progression [23, 24]. In our study, an UNx for 8 months induced hyperfiltration in the remnant kidney, thereby leading to increased rate of urine flow in the lumen of proximal tubule. FSS depends on the fluid flow rate and viscosity as well as on the diameter of the tube. Since there was no notable change in

tubular diameter, the increased skGFR most likely induced increased urinary FSS in the proximal tubule in this model. A decrease in epithelial gene expression such as ZO-1 and E-cadherin was observed concomitantly with elevated skGFR. As this was observed in absence of other mediators of tubular aggression (such as albuminuria, dilatation-induced stretch or hyperglycemia (data not shown)), our result strongly supports an *in vivo* role of pathologic FSS in tubular lesions after reduction in nephron number. Glomerular hyperfiltration has been incriminated as a common pathogenic mechanism leading to CKD progression in other conditions including diabetes mellitus, hypertension, obesity, polycystic kidney disease, sickle cell anemia, or the nephrotic syndrome [72, 73]. It is therefore tempting to propose that tubular lesions induced by hyperfiltration in these situations may be caused, at least in part, by increased urinary FSS and its ability to trigger structural changes of renal tubular cells.

In conclusion, the present study demonstrates that proximal tubular cells lose an important number of their epithelial characteristics, such as tight junctions, adherens junctions and primary cilium, after long term exposure to FSS both *in vitro* and *in vivo*. Thus, the changes in FSS induced by variations of urinary fluid flow and urine composition should be considered as potential insults for tubular cells leading to disorganization of the tubular epithelium. Since modified urinary FSS occurs in early phases of most nephropathies, increased FSS can thus contribute to the (primary) induction of the tubular lesions. Further studies on the mechanisms associated to FSS-induced alterations would be of great interest to propose new targets to slow-down progression of CKD.

Supporting Information

S1 Fig. Effect of FSS on epithelial junction proteins. Confluent monolayers of HK-2 cells were submitted to FSS 0 (static) or FSS 0.5 Pa (FSS 0.5) for 48h. The expression of Claudin-2, ZO-1 and β -Catenin protein was quantified by Western blot. Results are expressed as the fold induction compared to static condition and data represent mean $\pm$ SEM of 3–5 experiments.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus FSS 0.

(TIF)

S2 Fig. Effect of FSS intensity. Confluent monolayers of HK-2 cells were maintained to FSS 0 (static) or subjected to FSS 0.01 Pa (FSS 0.01), 0.1 Pa (FSS 0.1) or 0.5 Pa (FSS 0.5) for 48h. The localization of Claudin-2, ZO-1 or β -Catenin was analyzed by immunofluorescence. Pictures display representative areas of staining from three independent experiments. Bars indicate 20 μ m.

(TIF)

Acknowledgments

The authors thank Eric Panader and Andre Roques for technical help in development of the shear stress flow device (Atelier Mécanique, Université Paul Sabatier, Toulouse France), Christiane Pecher and Alexia Zakaroff-Girard for technical assistance and expertise in flow cytometry (Cytométrie et Tri cellulaire, Plateforme Imagerie—TRI Genotoul, Toulouse France), Frédéric Martins and Jean-José Maoret for technical assistance and expertise in qPCR (GeT-TQ, Plateforme Génome et Transcriptome (GeT) Genotoul, Toulouse France), Christine Delage and Denis Calise for technical facilities in animal experimentation (Experimental Microsurgery on rodents, Plateforme Anexplo Genotoul, Toulouse France) and Stéphanie Gayral and Céline Mias (INSERM U1048—I2MC, Toulouse France) for help with the immunostainings. They also thank the association 111 des Arts (France) for funding. This funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DM RD JLB JPS BBM. Performed the experiments: DM RD MB LD SG BBM. Analyzed the data: DM RD MB JSSB BBM. Contributed reagents/materials/analysis tools: AC JB CC. Wrote the paper: JSSB JLB JPS BBM.

References

1. Duan Y, Weinstein AM, Weinbaum S and Wang T. Shear stress-induced changes of membrane transporter localization and expression in mouse proximal tubule cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107: 21860–21865. doi: [10.1073/pnas.1015751107](https://doi.org/10.1073/pnas.1015751107) PMID: [21106755](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21106755/)
2. Jang KJ, Cho HS, Kang do H, Bae WG, Kwon TH and Suh KY. Fluid-shear-stress-induced translocation of aquaporin-2 and reorganization of actin cytoskeleton in renal tubular epithelial cells. *Integr Biol (Camb)* 2011, 3: 134–141.
3. Carattino MD, Sheng S and Kleymann TR. Epithelial Na⁺ channels are activated by laminar shear stress. *J Biol Chem* 2004, 279: 4120–4126. PMID: [14625286](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14625286/)
4. Holtzclaw JD, Liu L, Grimm PR and Sansom SC. Shear stress-induced volume decrease in C11-MDCK cells by BK-alpha/beta4. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010, 299: F507–516. doi: [10.1152/ajprenal.00222.2010](https://doi.org/10.1152/ajprenal.00222.2010) PMID: [20576683](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20576683/)
5. Raghavan V, Rbaibi Y, Pastor-Soler NM, Carattino MD and Weisz OA. Shear stress-dependent regulation of apical endocytosis in renal proximal tubule cells mediated by primary cilia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, 111: 8506–8511. doi: [10.1073/pnas.1402195111](https://doi.org/10.1073/pnas.1402195111) PMID: [24912170](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24912170/)
6. Gonzalez J, Essig M, Klein J, Caubet C, Dissard R, Bascands JL et al. [Renal urinary shear stress: a novel actor in nephropathies]. *Med Sci (Paris)* 2013, 29: 279–285.
7. Essig M, Terzi F, Burtin M and Friedlander G. Mechanical strains induced by tubular flow affect the phenotype of proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001, 281: F751–762. PMID: [11553522](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11553522/)
8. Grabias BM and Konstantopoulos K. The physical basis of renal fibrosis: effects of altered hydrodynamic forces on kidney homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014, 306: F473–485. doi: [10.1152/ajprenal.00503.2013](https://doi.org/10.1152/ajprenal.00503.2013) PMID: [24352503](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24352503/)
9. Rohatgi R and Flores D. Intratubular hydrodynamic forces influence tubulointerstitial fibrosis in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010, 19: 65–71. doi: [10.1097/MNH.0b013e3283327f3](https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e3283327f3) PMID: [19851105](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19851105/)
10. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X et al. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* 2003, 33: 129–137. PMID: [12514735](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12514735/)
11. Nauli SM, Rossetti S, Kolb RJ, Alenghat FJ, Consugar MB, Harris PC et al. Loss of polycystin-1 in human cyst-lining epithelia leads to ciliary dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2006, 17: 1015–1025. PMID: [16565258](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16565258/)
12. Eddy AA. Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002, 283: F209–220. PMID: [12110504](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12110504/)
13. Kolb RJ, Woost PG and Hopfer U. Membrane trafficking of angiotensin receptor type-1 and mechanochemical signal transduction in proximal tubule cells. *Hypertension* 2004, 44: 352–359. PMID: [15262908](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15262908/)
14. Miravète M, Dissard R, Klein J, Gonzalez J, Caubet C, Pecher C et al. Renal tubular fluid shear stress facilitates monocyte activation towards inflammatory macrophages. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012, 302: F1409–F1417. doi: [10.1152/ajprenal.00409.2011](https://doi.org/10.1152/ajprenal.00409.2011) PMID: [22419690](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22419690/)
15. Miravète M, Klein J, Besse-Patin A, Gonzalez J, Pecher C, Bascands JL et al. Renal tubular fluid shear stress promotes endothelial cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2011, 407: 813–817. doi: [10.1016/j.bbrc.2011.03.105](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.105) PMID: [21443862](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21443862/)
16. Wang S and Dong Z. Primary cilia and kidney injury: current research status and future perspectives. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013, 305: F1085–1098. doi: [10.1152/ajprenal.00399.2013](https://doi.org/10.1152/ajprenal.00399.2013) PMID: [23904226](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23904226/)
17. Schneeberger EE and Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004, 286: C1213–1228. PMID: [15151915](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15151915/)
18. Szaszi K and Amoozadeh Y. New insights into functions, regulation, and pathological roles of tight junctions in kidney tubular epithelium. *Int Rev Cell Mol Biol* 2014, 308: 205–271. doi: [10.1016/B978-0-12-800097-7.00006-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800097-7.00006-3) PMID: [24411173](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24411173/)
19. Denker BM and Sabath E. The biology of epithelial cell tight junctions in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2011, 22: 622–625. doi: [10.1681/ASN.2010090922](https://doi.org/10.1681/ASN.2010090922) PMID: [21415157](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21415157/)

20. Meng W and Takeichi M. Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009, 1: a002899. doi: [10.1101/cshperspect.a002899](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002899) PMID: [20457565](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20457565/)
21. Takeichi M. Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, 15: 397–410. doi: [10.1038/nrm3802](https://doi.org/10.1038/nrm3802) PMID: [24824068](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24824068/)
22. Yoshida Y, Fogo A, Shiraga H, Glick AD and Ichikawa I. Serial micropuncture analysis of single nephron function in subtotal renal ablation. *Kidney Int* 1988, 33: 855–867. PMID: [3386138](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3386138/)
23. Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA and Brenner BM. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol* 1981, 241: F85–93. PMID: [7246778](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7246778/)
24. Brenner BM. Hemodynamically mediated glomerular injury and the progressive nature of kidney disease. *Kidney Int* 1983, 23: 647–655. PMID: [6336299](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6336299/)
25. Huang B, Pi L, Chen C, Yuan F, Zhou Q, Teng J et al. WT1 and Pax2 re-expression is required for epithelial-mesenchymal transition in 5/6 nephrectomized rats and cultured kidney tubular epithelial cells. *Cells Tissues Organs* 2012, 195: 296–312. doi: [10.1159/000327530](https://doi.org/10.1159/000327530) PMID: [21778682](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21778682/)
26. Bolati D, Shimizu H and Niwa T. AST-120 ameliorates epithelial-to-mesenchymal transition and interstitial fibrosis in the kidneys of chronic kidney disease rats. *J Ren Nutr* 2012, 22: 176–180. doi: [10.1053/j.jrn.2011.10.015](https://doi.org/10.1053/j.jrn.2011.10.015) PMID: [22200438](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22200438/)
27. Blantz RC and Singh P. Glomerular and tubular function in the diabetic kidney. *Adv Chronic Kidney Dis* 2014, 21: 297–303. doi: [10.1053/j.ackd.2014.03.006](https://doi.org/10.1053/j.ackd.2014.03.006) PMID: [24780458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24780458/)
28. Jerums G, Premaratne E, Panagiotopoulos S and MacIsaac RJ. The clinical significance of hyperfiltration in diabetes. *Diabetologia* 2010, 53: 2093–2104. doi: [10.1007/s00125-010-1794-9](https://doi.org/10.1007/s00125-010-1794-9) PMID: [20496053](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20496053/)
29. Magee GM, Bilous RW, Cardwell CR, Hunter SJ, Kee F and Fogarty DG. Is hyperfiltration associated with the future risk of developing diabetic nephropathy? A meta-analysis. *Diabetologia* 2009, 52: 691–697. doi: [10.1007/s00125-009-1268-0](https://doi.org/10.1007/s00125-009-1268-0) PMID: [19198800](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19198800/)
30. Molina-Jijon E, Rodriguez-Munoz R, Namorado Mdel C, Pedraza-Chaverri J and Reyes JL. Oxidative stress induces claudin-2 nitration in experimental type 1 diabetic nephropathy. *Free Radic Biol Med* 2014, 72: 162–175. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.040](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.040) PMID: [24726862](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24726862/)
31. Ryan MJ, Johnson G, Kirk J, Fuerstenberg SM, Zager RA and Torok-Storb B. HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int* 1994, 45: 48–57. PMID: [8127021](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8127021/)
32. Bonvalet JP and de Rouffignac C. Distribution of ferrocyanide along the proximal tubular lumen of the rat kidney: its implications upon hydrodynamics. *J Physiol* 1981, 318: 85–98. PMID: [7320905](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7320905/)
33. Duan Y, Gotoh N, Yan Q, Du Z, Weinstein AM, Wang T et al. Shear-induced reorganization of renal proximal tubule cell actin cytoskeleton and apical junctional complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105: 11418–11423. doi: [10.1073/pnas.0804954105](https://doi.org/10.1073/pnas.0804954105) PMID: [18685100](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18685100/)
34. Belliere J, Casemayou A, Ducasse L, Zakaroff-Girard A, Martins F, Iacovoni JS et al. Specific Macrophage Subtypes Influence the Progression of Rhabdomyolysis-Induced Kidney Injury. *J Am Soc Nephrol* 2014.
35. Qi Z, Whitt I, Mehta A, Jin J, Zhao M, Harris RC et al. Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004, 286: F590–596. PMID: [14600035](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14600035/)
36. Lin D, Edwards AS, Fawcett JP, Mbamalu G, Scott JD and Pawson T. A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol* 2000, 2: 540–547. PMID: [10934475](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10934475/)
37. Suzuki A, Yamanaka T, Hirose T, Manabe N, Mizuno K, Shimizu M et al. Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures. *J Cell Biol* 2001, 152: 1183–1196. PMID: [11257119](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11257119/)
38. Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 2011, 7: 684–696. doi: [10.1038/nrneph.2011.149](https://doi.org/10.1038/nrneph.2011.149) PMID: [22009250](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22009250/)
39. Park SW, Kim M, Brown KM, D'Agati VD and Lee HT. Inhibition of sphingosine 1-phosphate receptor 2 protects against renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2012, 23: 266–280. doi: [10.1681/ASN.2011050503](https://doi.org/10.1681/ASN.2011050503) PMID: [22095950](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22095950/)
40. Quaggin SE and Kapus A. Scar wars: mapping the fate of epithelial-mesenchymal-myofibroblast transition. *Kidney Int* 2011, 80: 41–50. doi: [10.1038/ki.2011.77](https://doi.org/10.1038/ki.2011.77) PMID: [21430641](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21430641/)
41. Cattaneo I, Condorelli L, Terrinoni AR, Antiga L, Sangalli F and Remuzzi A. Shear stress reverses dome formation in confluent renal tubular cells. *Cell Physiol Biochem* 2011, 28: 673–682. doi: [10.1159/000335813](https://doi.org/10.1159/000335813) PMID: [22178879](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22178879/)

42. Dankers PY, Boomker JM, Huizinga-van der Vlag A, Wisse E, Appel WP, Smedts FM et al. Bioengineering of living renal membranes consisting of hierarchical, bioactive supramolecular meshes and human tubular cells. *Biomaterials* 2011, 32: 723–733. doi: [10.1016/j.biomaterials.2010.09.020](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.020) PMID: [20943265](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20943265/)
43. Jang KJ, Mehr AP, Hamilton GA, McPartlin LA, Chung S, Suh KY et al. Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment. *Integr Biol (Camb)* 2013, 5: 1119–1129.
44. Jang KJ and Suh KY. A multi-layer microfluidic device for efficient culture and analysis of renal tubular cells. *Lab Chip* 2010, 10: 36–42. doi: [10.1039/b907515a](https://doi.org/10.1039/b907515a) PMID: [20024048](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20024048/)
45. Frohlich EM, Zhang X and Charest JL. The use of controlled surface topography and flow-induced shear stress to influence renal epithelial cell function. *Integr Biol (Camb)* 2012, 4: 75–83.
46. Friedrich C, Endlich N, Kriz W and Endlich K. Podocytes are sensitive to fluid shear stress in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006, 291: F856–865. PMID: [16684926](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16684926/)
47. Grabias BM and Konstantopoulos K. Epithelial-mesenchymal transition and fibrosis are mutually exclusive responses in shear-activated proximal tubular epithelial cells. *Faseb J* 2012, 26: 4131–4141. doi: [10.1096/fj.12-207324](https://doi.org/10.1096/fj.12-207324) PMID: [22744866](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22744866/)
48. Luo DD, Fielding C, Phillips A and Fraser D. Interleukin-1 beta regulates proximal tubular cell transforming growth factor beta-1 signalling. *Nephrol Dial Transplant* 2009, 24: 2655–2665. doi: [10.1093/ndt/gfp208](https://doi.org/10.1093/ndt/gfp208) PMID: [19420104](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19420104/)
49. Bondeva T, Heinzig J, Franke S and Wolf G. Angiotensin II differentially regulates Morg1 expression in kidney cells. *Am J Nephrol* 2012, 35: 442–455. doi: [10.1159/000337922](https://doi.org/10.1159/000337922) PMID: [22555025](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22555025/)
50. Dankers PY, Boomker JM, Meijer EW, Popa ER and van Luyn MJ. From kidney development to drug delivery and tissue engineering strategies in renal regenerative medicine. *J Control Release* 2011, 152: 177–185. doi: [10.1016/j.jconrel.2011.01.034](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.01.034) PMID: [21334390](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21334390/)
51. Weinbaum S, Duan Y, Thi MM and You L. An Integrative Review of Mechanotransduction in Endothelial, Epithelial (Renal) and Dendritic Cells (Osteocytes). *Cell Mol Bioeng* 2011, 4: 510–537. PMID: [23976901](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23976901/)
52. Carrisoza-Gaytan R, Liu Y, Flores D, Else C, Lee HG, Rhodes G et al. Effects of biomechanical forces on signaling in the cortical collecting duct (CCD). *Am J Physiol Renal Physiol* 2014, 307: F195–204. doi: [10.1152/ajprenal.00634.2013](https://doi.org/10.1152/ajprenal.00634.2013) PMID: [24872319](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24872319/)
53. Hinnebusch BF, Ma Q, Henderson JW, Siddique A, Archer SY and Hodin RA. Enterocyte response to ischemia is dependent on differentiation state. *J Gastrointest Surg* 2002, 6: 403–409. PMID: [12022993](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12022993/)
54. Jansen JH, Weyts FA, Westbroek I, Jahr H, Chiba H, Pols HA et al. Stretch-induced phosphorylation of ERK1/2 depends on differentiation stage of osteoblasts. *J Cell Biochem* 2004, 93: 542–551. PMID: [15378606](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15378606/)
55. Makino A, Prossnitz ER, Bunemann M, Wang JM, Yao W and Schmid-Schonbein GW. G protein-coupled receptors serve as mechanosensors for fluid shear stress in neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006, 290: C1633–1639. PMID: [16436471](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16436471/)
56. Krouwer VJ, Hekking LH, Langelaar-Makkinje M, Regan-Klapisz E and Post JA. Endothelial cell senescence is associated with disrupted cell-cell junctions and increased monolayer permeability. *Vasc Cell* 2012, 4: 12. doi: [10.1186/2045-824X-4-12](https://doi.org/10.1186/2045-824X-4-12) PMID: [22929066](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22929066/)
57. Venkatesh D, Fredette N, Rostama B, Tang Y, Vary CP, Liaw L et al. RhoA-mediated signaling in Notch-induced senescence-like growth arrest and endothelial barrier dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011, 31: 876–882. doi: [10.1161/ATVBAHA.110.221945](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.221945) PMID: [21273559](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21273559/)
58. Satriano J, Mansoury H, Deng A, Sharma K, Vallon V, Blantz RC et al. Transition of kidney tubule cells to a senescent phenotype in early experimental diabetes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010, 299: C374–380. doi: [10.1152/ajpcell.00096.2010](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00096.2010) PMID: [20505038](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20505038/)
59. Verzola D, Gandolfo MT, Gaetani G, Ferraris A, Mangerini R, Ferrario F et al. Accelerated senescence in the kidneys of patients with type 2 diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008, 295: F1563–1573. doi: [10.1152/ajprenal.90302.2008](https://doi.org/10.1152/ajprenal.90302.2008) PMID: [18768588](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18768588/)
60. Martin JA, Klingelutz AJ, Moussavi-Harami F and Buckwalter JA. Effects of oxidative damage and telomerase activity on human articular cartilage chondrocyte senescence. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2004, 59: 324–337. PMID: [15071075](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15071075/)
61. Warboys CM, de Luca A, Amini N, Luong L, Duckles H, Hsiao S et al. Disturbed flow promotes endothelial senescence via a p53-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014, 34: 985–995. doi: [10.1161/ATVBAHA.114.303415](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303415) PMID: [24651677](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24651677/)
62. Ardura JA, Rayego-Mateos S, Ramila D, Ruiz-Ortega M and Esbrit P. Parathyroid hormone-related protein promotes epithelial-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 2010, 21: 237–248. doi: [10.1681/ASN.2009050462](https://doi.org/10.1681/ASN.2009050462) PMID: [19959711](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19959711/)

63. Smith JP, Pozzi A, Dhawan P, Singh AB and Harris RC. Soluble HB-EGF induces epithelial-to-mesenchymal transition in inner medullary collecting duct cells by upregulating Snail-2. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009, 296: F957–965. doi: [10.1152/ajprenal.90490.2008](https://doi.org/10.1152/ajprenal.90490.2008) PMID: [19244405](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19244405/)
64. Docherty NG, O'Sullivan OE, Healy DA, Murphy M, O'Neill A J, Fitzpatrick JM et al. TGF-beta1-induced EMT can occur independently of its proapoptotic effects and is aided by EGF receptor activation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006, 290: F1202–1212. PMID: [16368739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16368739/)
65. Norvell SM, Alvarez M, Bidwell JP and Pavalko FM. Fluid shear stress induces beta-catenin signaling in osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 2004, 75: 396–404. PMID: [15592796](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15592796/)
66. Xiao C, Ogle SA, Schumacher MA, Schilling N, Tokhunts RA, Orr-Asman MA et al. Hedgehog signaling regulates E-cadherin expression for the maintenance of the actin cytoskeleton and tight junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010, 299: G1252–1265. doi: [10.1152/ajpgi.00512.2009](https://doi.org/10.1152/ajpgi.00512.2009) PMID: [20847300](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20847300/)
67. Kim MK, Maeng YI, Sung WJ, Oh HK, Park JB, Yoon GS et al. The differential expression of TGF-beta1, ILK and wnt signaling inducing epithelial to mesenchymal transition in human renal fibrogenesis: an immunohistochemical study. *Int J Clin Exp Pathol* 2013, 6: 1747–1758.
68. Abed A, Toubas J, Kavvadas P, Authier F, Cathelin D, Alfieri C et al. Targeting connexin 43 protects against the progression of experimental chronic kidney disease in mice. *Kidney Int* 2014.
69. Vongwiwatana A, Tasanarong A, Rayner DC, Melk A and Halloran PF. Epithelial to mesenchymal transition during late deterioration of human kidney transplants: the role of tubular cells in fibrogenesis. *Am J Transplant* 2005, 5: 1367–1374. PMID: [15888043](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15888043/)
70. Verghese E, Weidenfeld R, Bertram JF, Ricardo SD and Deane JA. Renal cilia display length alterations following tubular injury and are present early in epithelial repair. *Nephrol Dial Transplant* 2008, 23: 834–841. PMID: [17962379](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17962379/)
71. Rozycki M, Lodyga M, Lam J, Miranda MZ, Fatyol K, Speight P et al. The fate of the primary cilium during myofibroblast transition. *Mol Biol Cell* 2014, 25: 643–657. doi: [10.1091/mbc.E13-07-0429](https://doi.org/10.1091/mbc.E13-07-0429) PMID: [24403605](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24403605/)
72. Sharma A, Mucino MJ and Ronco C. Renal functional reserve and renal recovery after acute kidney injury. *Nephron Clin Pract* 2014, 127: 94–100. doi: [10.1159/000363721](https://doi.org/10.1159/000363721) PMID: [25343829](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25343829/)
73. Yang GK, Har RL, Lytvyn Y, Yip P and Cherney DZ. Renal hyperfiltration is associated with glucose-dependent changes in fractional excretion of sodium in patients with uncomplicated type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2014, 37: 2774–2781. doi: [10.2337/dc14-0798](https://doi.org/10.2337/dc14-0798) PMID: [25011944](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25011944/)

