

ADAM LABBÉ

**PROFIL D'EXPRESSION DES FIBROBLASTES DE
SOURIS EMBRYONNAIRES AVEC UNE
SUPPRESSION DANS LE DOMAINE HÉLICASE DE
L'HOMOLOGUE DU GÈNE WERNER TRAITÉ
AVEC DU PEROXYDE D'HYDROGÈNE**

Mémoire présenté

à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Biologie cellulaire et moléculaire
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2012

RÉSUMÉ

Le syndrome de Werner (SW) est une maladie génétique de transmission autosomique récessive qui cause le vieillissement prématuré. La maladie est causée par une mutation dans le gène Werner (WRN). Étant donné que le niveau d'espèces réactives d'oxygène (EROs) est élevé chez les personnes atteintes du SW et que c'est probablement un facteur causant une partie du phénotype, nous avons vérifié le phénomène au niveau cellulaire. Pour ce faire, nous avons analysé des fibroblastes de souris embryonnaires (FSEs) de type sauvage (TS) et des FSEs ayant une délétion dans une partie du domaine hélicase de la protéine homologue de WRN ($Wrn\Delta hel/\Delta hel$). Nous avons mesuré le niveau d'EROs dans ces cellules. Après avoir constaté que le niveau d'EROs est plus élevé dans les FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ que dans les FSEs TS, nous avons mesuré les effets directs et indirects de cette augmentation du niveau d'EROs au plan de la transcription globale dans ces cellules. Finalement, pour mieux comprendre l'impact des EROs dans le phénotype, nous avons étudié l'effet de l'addition d'EROs exogènes sur les cellules en culture. Nous avons donc traité des FSEs TS et Wrn mutants avec du peroxyde d'hydrogène. À l'aide de biopuces à ADN, nous avons comparé le profil d'expression génique des FSEs traités au peroxyde d'hydrogène par rapport aux cellules non traitées. Nous avons par la suite validé les résultats des biopuces à ADN par transcriptase inverse suivi d'une réaction de polymérase en chaîne quantitative (TI-RPC) et analysé les données avec le programme PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships). Les EROs exogènes ont peu d'impact sur le profil d'expression des gènes chez les FSEs Wrn mutants en comparaison avec les FSEs TS car ces cellules démontrent déjà un niveau d'EROs plus élevé que la normale. Toutefois, plusieurs sentiers biologiques déjà affectés chez les FSEs Wrn mutants ont été affectés de la même façon dans les FSEs TS traités au peroxyde d'hydrogène. D'ailleurs, plusieurs de ces sentiers biologiques sont étroitement reliés au phénotype observé chez notre modèle de souris Wrn mutantes ainsi que chez les patients atteints du SW.

AVANT-PROPOS

En premier lieu, je souhaite remercier mon directeur de recherche, le Dr Michel Lebel de m'avoir admis dans son laboratoire et d'avoir si bien su me guider afin que mes travaux aboutissent à des publications. Je le remercie également pour son soutien financier.

Je remercie la professionnelle de recherche du Dr Lebel, Madame Chantal Garand pour son enseignement technique ainsi que son aide tout au long de mes expériences.

Je remercie les stagiaires postdoctoraux Laurent Massip et Ramachander Turaga qui m'ont permis de continuer des projets menés par le Dr Lebel. Je remercie aussi le bioinformaticien Éric Paquet pour son travail d'analyse de nos résultats. Généreux de son temps, il m'a appris énormément de choses. Je remercie mes collègues de laboratoire Véronique Lafleur et Sophie Lachapelle, pour leur aide et leur collaboration amicale. Je remercie le Dr Dimcho Bachvarov pour l'analyse de l'ARN sur micropuces à ADN. Finalement, je remercie le Dr Jean-Yves Masson de m'avoir permis d'utiliser son thermocycleur.

Ce mémoire contient un article publié dans la revue BioMed Central Genomics. Bien que je sois le principal auteur de cet article, 50% du travail a été réalisé par mes collègues y figurant eux aussi en tant qu'auteurs. Durant ma maîtrise, j'ai aussi été coauteur d'un article publié dans la revue Oncogene [1] ainsi que principal auteur d'un article publié dans la revue Journal of Gerontology [2]. Tout cela fut possible grâce à l'encadrement fourni par le Dr Michel Lebel et Madame Chantal Garand.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	3
AVANT-PROPOS	5
TABLE DES MATIÈRES	7
LISTE DES ABRÉVIATIONS	9
LISTE DES UNITÉS ET MESURES	10
LISTE DES FIGURES	11
CHAPITRE 1	13
1 INTRODUCTION	13
1.1 CONTEXTE	13
1.2 LE VIEILLISSEMENT	13
1.3 LE SYNDROME DE WERNER	14
1.4 LE PHÉNOTYPE CELLULAIRE	16
1.5 LE GÈNE RESPONSABLE DU SW	18
1.6 LA PROTÉINE WERNER	18
1.6.1 AFFINITÉ ET ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA PROTÉINE WERNER	22
1.6.1.1 HÉLICASE	22
1.6.1.2 EXONULÉASE	23
1.6.1.3 LES COFACTEURS DE LA PROTÉINE WRN	24
1.7 LES RÔLES DE LA PROTÉINE WRN RELATIFS À SES PARTENAIRES	25
1.8 LES PARTENAIRES DE LA PROTÉINE WRN	26
1.8.1 P53	26
1.8.2 PROTÉINE DE LA TRANSCRIPTION	26
1.8.3 PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LES HYBRIDES ARN/ADN	27
1.8.4 EXONUCLÉASE 1 (EXO-1)	27
1.8.5 REPLICATION PROTEIN A (RPA)	27
1.8.6 ADN POLYMÉRISE Δ	28
1.8.7 COMPLEXE DE RÉPLICATION	28
1.8.8 ENZYME DE LA RÉPARATION PAR EXCISION DE BASES	29
1.8.9 ENZYME IMPLIQUÉ DANS LA RÉPARATION DES BASES MAL APPARIÉES	29
1.8.10 TOPOISOMÉRISES (TOPO)	29
1.8.11 COMPLEXE DE RÉPARATION PAR LA RECOMBINAISON NON HOMOLOGUE (RRNH)	30
1.8.12 RÉPARATION DES DOMMAGES OXYDATIFS	30
1.8.13 NEI ENDONUCLEASE VIII-LIKE 1 (NEIL1)	31
1.8.14 POLY(ADP-RIBOSE) POLYMÉRISE-1 (PARP-1)	31
1.8.15 ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED (ATM)	31
1.8.16 COMPLEXE BREAST CANCER 1/ BRCA1-ASSOCIATED RING DOMAIN PROTEIN 1 (BRCA1/BARD1)	31
1.8.17 ATAXIA TELANGIECTASIA-RELATED PROTEIN (ATR)	32
1.8.18 RECOMBINAISON HOMOLOGUE	32
1.8.19 HÉLICASE DU SYNDROME DE BLOOM	32
1.8.20 5' FLAP ENDONUCLEASE/5'-3' EXONUCLÉASE (FEN-1) ET PROLIFÉRATING CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA)	33

1.8.21 TÉLOMÈRES	33
1.8.22 TELOMERIC REPEAT-BINDING FACTOR 2 (TRF2)	34
1.8.23 PROTECTION OF TELOMERES PROTEIN 1 (POT 1)	34
1.8.24 RECEPTOR OF ACTIVATED PROTEIN KINASE C 1 (RACK1)	34
1.9 LES MODÈLES DE SOURIS	35
1.9.1 LA SOURIS Δ HÉLICASE	35
1.9.2 LA SOURIS K 557 -> M	36
1.9.3 LA SOURIS WRN NULL	36
1.9.4 LES DOUBLES MUTANTS	37
1.10 LES FIBROBLASTES DE SOURIS EMBRYONNAIRES (FSES)	37
1.11 LES ESPÈCES RÉACTIVES D'OXYGÈNE (EROS)	38
1.12 LE PEROXYDE D'HYDROGÈNE	38
CHAPITRE 2	41
2.1 OBJECTIFS	41
2.2 RÉSUMÉ	43
2.3 ARTICLE	45
CHAPITRE 3	75
3.1 DISCUSSION	75
3.2 CONCLUSION	79
3.3 PERSPECTIVES	80
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	81

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Δ hel : Manquant une partie du domaine hélicase de la protéine Wrn
 4NQO : 4-Nitroquinoline 1-oxide
 ADN: Acide désoxyribonucléique
 ADP : Adénosine diphosphate
 APE1 : Apurinic/aprimidinic endonucléase 1
 ARN : Acide ribonucléique
 ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
 ATP : Adénosine triphosphate
 ATR : Ataxia Telangiectasia-Related protein
 BARD1: BRCA1-Associated Ring Domain protein 1
 BLM: Bloom
 BRCA1: BREast CANcer 1
 DExH : Asp-Glu-X-His
 EROs : Espèces réactives d'oxygène
 EXO-1 : Exonucléase 1
 FEN-1: 5' Flap ENdonuclease/5'-3'exonuclease
 FSEs : Fibroblastes de souris embryonnaires
 HRDC : Hélicase-et-ribonucléase D/C-terminal
 MEC : Matrice extra cellulaire
 NBS1 : Nijmegen breakage syndrome 1
 NEIL1: Nei Endonuclease VIII-Like 1
 PANTHER : Protein ANALYSIS THrough Evolutionary Relationships
 PARP-1: Poly(ADP-ribose) polymérase-1
 PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
 PKC : Protéine kinase C
 POT 1: Protection Of Telomeres protein 1
 PSNs : Polymorphismes pour un seul nucléotide
 RACK1: Receptor of ACTIVated protein Kinase C 1
 Rb : Rétinoblastome
 RCCGF : Réseau Cancer Core Genomic Facility
 RPA : Replication Protein A
 RRNH : Complexe de réparation par la recombinaison non homologue
 Sgs1 : Small growth suppressor 1
 SIRT1 : Silent mating type information regulation 2 homolog 1
 SSB : Single-Stranded DNA-Binding proteins
 SW : Syndrome de Werner
 TI-RCPq : Transcriptase inverse suivi d'une réaction en chaîne de polymérase quantitative
 TOPO I : Topoisomérase I
 TOPO II : Topoisomérase II
 TRF2 : Telomeric Repeat-binding Factor 2
 TS: Type sauvage
 UAG : Uracil-ADN glycosilase
 VCP : Valosin-containing protein
 WRN : Werner

LISTE DES UNITÉS ET MESURES

pb : Paire de base

kb : Kilobase

kDa : Kilodalton

kBT : k_B est la constant de Boltzman et T est la température

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Femme de 51 ans atteinte du SW

Figure 2 : Illustrations des domaines de la protéine Werner

Figure 3 : Illustration de la structure cristalline du domaine Hélicase-et-ribonucléase D/C-terminal (HRDC) de la protéine Werner humaine

Figure 4 : Des principaux substrats de la protéine Werner

Figure 5 : Illustration de la structure cristallisée du domaine exonucléase de la protéine

CHAPITRE 1

1 INTRODUCTION

1.1 CONTEXTE

Le SW est une maladie génétique à mode de transmission autosomique récessif qui cause le vieillissement prématuré de l'individu atteint. Le gène fautif code pour une protéine impliquée dans différents aspects de la transcription, de la réplication et de la réparation de l'ADN. Ainsi, les cellules SW sont sujettes à l'instabilité génomique en plus de montrer un plus grand stress oxydatif. Afin de mieux comprendre l'effet du stress oxydatif sur les cellules SW, nous avons examiné l'impact du peroxyde d'hydrogène sur le profil d'expression transcriptionnelle des FSEs $Wm\Delta hel/\Delta hel$ en comparaison avec des FSEs TS.

1.2 LE VIEILLISSEMENT

Le vieillissement d'un organisme est caractérisé par un déclin général de ses fonctions physiologiques qui, avec le temps, réduit sa capacité à conserver l'homéostasie, à résister au stress et augmente la probabilité que l'organisme soit malade ou qu'il meurt [3, 4].

Durant le cours normal de la vie, un mammifère réussit à subsister par lui-même en plus de se reproduire et de faire vivre ses petits jusqu'à leur propre autonomie. D'un point de vue évolutif, ce qui arrivera à cet être vivant après que sa progéniture ait atteint l'autonomie n'a pas vraiment d'importance [5, 6]. D'ailleurs, après un certain nombre d'années de vie, les êtres humains perdent lentement la capacité de se reproduire et l'énergie nécessaire pour s'occuper d'enfant, puis l'énergie et les capacités minimales nécessaires à leur autonomie, et finalement ils perdent même les fonctions minimales pour se maintenir en vie.

Puisqu'elles sont souvent en perte d'autonomie ou même complètement dépendantes, les personnes très âgées ont besoin de beaucoup plus de soins que la majorité des gens. De plus, l'incidence de la plupart des principales maladies mortelles des pays développés est

augmentée chez les aînés. Inévitablement, le vieillissement touche toute la population et c'est ce qui en fait un important champ de la recherche médicale.

Différentes théories fournissent des modèles ou des pistes pour étudier et comprendre le vieillissement. De fait, l'organisme subit l'effet du temps, c'est-à-dire l'effet de l'usure, de l'oxydation et de l'accumulation des dommages [7]. Ainsi, le vieillissement survient au niveau de l'organisme tout entier, soit des organes, des tissus, des cellules et au niveau moléculaire. Bien que très intéressantes, ces idées à elles seules ne peuvent expliquer toutes les facettes du vieillissement. D'une manière très générale, on peut considérer le vieillissement comme une phase dans le cycle de la vie d'un organisme. Selon cette façon de penser, le vieillissement serait préprogrammé et pourrait être contrôlé par le rythme circadien ainsi que par les hormones de l'axe somatotropique [8]. Nous pouvons suivre la progression du vieillissement au niveau moléculaire en mesurant des marqueurs de vieillissement moléculaire tels que l'accumulation de dommages imparfaitement réparés au niveau de l'ADN, l'accumulation de certaines protéines, des changements progressifs dans la chromatine, ainsi que l'érosion des télomères [9-11]. Au niveau cellulaire, le vieillissement est aussi caractérisé par une augmentation de la proportion des cellules en sénescence [12]. Dans cet ordre d'idée, certains syndromes reproduisent des caractéristiques du vieillissement de façon prématurée et parmi celles-ci, le SW est la maladie qui ressemble le plus au vieillissement normal [13].

1.3 LE SYNDROME DE WERNER

Le SW a été rapporté pour la première fois par l'ophtalmologiste Otto Werner en 1904. Les personnes atteintes du SW sont souvent considérées comme normales jusqu'au moment de la puberté où ils n'ont pas de poussée de croissance et restent impubères. De fait, autant les hommes que les femmes sont souvent atteints d'hypogonadisme, ce qui fait que leurs parties génitales sont peu développées et que leur fertilité est faible. De surcroît, en début de vingtaine, ils commencent à avoir des cheveux gris et à paraître beaucoup plus vieux que leur âge chronologique. Cela est en grande partie attribuable à leur peau qui est mince,

luisante, tendue et affectée par la présence d'acanthosis nigricans en plus d'être parsemée de rides [14, 15]. Ces symptômes s'accompagnent d'une calcification de la peau et d'autres tissus mous comme les vaisseaux sanguins [16] et les tendons [15]. Les problèmes cutanés sont davantage concentrés aux extrémités et touchent particulièrement les membres inférieurs qui sont souvent affectés d'ulcères perforants [16]. Étant donné l'absence de gras sous-cutané, la peau colle aux périostes des membres [15].



Figure 1. Femme de 51 ans atteinte du SW

Adapté de [15]

Au niveau physiologique, les muscles sont atrophiés et les os sont fragiles étant donné une ostéoporose souvent généralisée [16]. Mentionnons également que les personnes atteintes sont souvent bedonnantes (Figure 1) étant donné qu'elles ont beaucoup de gras intra-abdominal [17]. Ce phénomène est probablement attribuable aux différents troubles métaboliques liés au SW tels que le diabète [18], qui est généralement accompagné de résistance à l'insuline [19], et les troubles métaboliques des lipides comme l'hypercholestérolémie. Ces troubles métaboliques augmentent entre autres le taux sanguin de glucose et d'EROs [18]. Étant donné la nature des troubles métaboliques, il est difficile de discerner la cause de l'effet. Dans le même ordre d'idée, les personnes atteintes du SW sont plus sujettes aux maladies rénales, aux maladies parenchymateuses [14] et à la cirrhose. [20]. L'obésité est aussi fort probablement liée à l'artériosclérose et à la forte incidence de crises cardiaques [21] chez les individus atteints du SW.

Les individus atteints du SW sont aussi plus à risque d'avoir des maladies hématologiques en général [22]. De plus, ceux-ci sont plus enclins à développer certains types de cancer

dont le cancer des poumons [23], les cholangiocarcinomes [24] et les méningiomes [25]. Finalement, un polymorphisme pour un seul nucléotide (PSN) dans le gène WRN est associé avec une augmentation des risques de cancer du sein [26].

Le SW est également associés à d'autres maladies généralement liées au vieillissement. Toutefois ces maladies ne sont pas présentes dans les mêmes proportions que chez les individus âgés. Par exemple, des cataractes apparaissent fréquemment dès la vingtaine chez les personnes atteintes du SW. Le traitement de ces cataractes était auparavant accompagné de complications mais les nouvelles techniques chirurgicales offrent aujourd'hui de meilleurs résultats [27]. Les individus atteints du SW développent également d'autres symptômes associés au vieillissement tels que l'arthrite, la sénilité et parfois même la démence [16, 18, 19]. Ils meurent finalement à un âge moyen de 47 ans, généralement d'une crise cardiaque ou du cancer.

On a longtemps cru que les hétérozygotes étaient complètement normaux, mais des études ont démontré qu'ils ont une instabilité génomique et un risque plus élevé pour les maladies hématologiques [22]. Le SW peut s'expliquer en grande partie par le phénotype cellulaire des personnes atteintes.

1.4 LE PHÉNOTYPE CELLULAIRE

Le profil d'expression des gènes dans les fibroblastes SW ressemble à celui des fibroblastes de personnes âgées [28]. De plus, les fibroblastes issus de personnes atteintes du SW sont plus difficiles à cultiver car ils entrent en sénescence très rapidement, tout comme c'est le cas pour les fibroblastes issus de personnes âgées [29]. C'est en partie la sénescence des cellules qui cause le phénotype de vieillissement prématuré chez les personnes atteintes du SW [30]. La lenteur de la division cellulaire est en partie attribuable à une prolongation de la phase S qui peut aboutir à l'arrêt complet du cycle cellulaire. Certains scientifiques soutiennent que la sénescence est due aux télomères qui sont encore plus courts dans les cellules SW que dans des cellules de personnes très âgées [31]. Toutefois, d'autres résultats

expérimentaux indiquent que les télomères de cellules issues de gens atteints du SW ne s'érodent pas plus rapidement que ceux provenant de cellules normales, mais démontrent une plus grande hétérogénéité de la longueur des télomères dans les fibroblastes SW [32]. D'ailleurs, cette hétérogénéité s'explique peut-être par le défaut de réplication du brin tardif de l'ADN télomérique dans les cellules manquant l'activité hélicase de WRN [33]. Quoiqu'il en soit, il semblerait qu'on soit d'accord pour affirmer qu'il y a une anomalie du métabolisme des télomères dans les cellules SW. En outre, des travaux démontrent qu'une expression de la télomérase immortalise les fibroblastes SW sans rétablir la stabilité génomique [34]. Paradoxalement, des résultats indiquent que l'instabilité génomique dans les cellules SW est attribuable aux dysfonctions télomériques [35]. Donc, beaucoup d'incertitudes demeurent sur cette question et des travaux supplémentaires sont requis pour valider ou invalider certaines études ou expliquer la divergence des résultats.

La lenteur du cycle cellulaire et la fréquence plus élevée de sénescences corrént avec une augmentation des dommages à l'ADN ainsi qu'avec des défauts de réparation de cette dernière [36]. En effet, en conséquence à l'instabilité génomique [36], il y a une accumulation des bris double brin dans les cellules SW [37]. De plus, il y a apparition de suppressions plus grandes que la normale lors de la réparation de ces bris par la réparation de bris double brin de type non homologue [38]. Enfin, les lignées cellulaires SW démontrent aussi une augmentation des recombinaisons mitotiques aberrantes [39]. Fait intéressant, les fibroblastes SW exhibent une accélération de la méthylation des ADN ribosomiaux [40]. Ceci entrainerait une dérégulation de l'expression des ARN ribosomiaux lors de la sénescence. Toutefois, l'impact de cette méthylation dans l'induction de la sénescence reste à démontrer.

Finalement, l'activité de la phosphatidylinositol 3-kinase associée aux vésicules intracellulaires contenant les transporteurs de glucose tels que GLUT1 est déficiente et cela affecte la réponse à l'insuline [41]. Ce phénotype cellulaire corréle avec la résistance à l'insuline ainsi qu'avec un taux anormalement élevé de glucose dans le sang des individus atteints du SW [41].

1.5 LE GÈNE RESPONSABLE DU SW

Le SW est un désordre rare avec une fréquence d'une naissance sur 20 millions dans le monde. Ce syndrome est un désordre génétique autosomique récessif [42] concernant un seul gène, c'est-à-dire le gène WRN. Ce gène est situé sur le chromosome 8 en position p12 et est d'une longueur de 140 kilobase (kb) [43, 44]. Il est exprimé dans tous les tissus et à tous les stades de la vie. Le gène WRN possède un promoteur d'expression constitutive sans boîte de type TATA et CAAT [45]. Le gène WRN est transcriptionnellement activé par les protéines rétinoblastome (Rb), SP1 ainsi que AP2 [46] et il est transcriptionnellement réprimé par p53 [47]. Enfin, l'oncogène et le facteur de transcription MYC augmentent la transcription de WRN pour prévenir la sénescence [48]. Ceux-ci sont d'ailleurs fonctionnellement associés à la tumorigenèse [49].

Le SW est causé par une mutation dans la séquence du gène WRN. Plusieurs types de mutation sont possibles tels que des mutations ponctuelles, des délétions et des additions qui engendrent un ARNm incomplet ou parsemé de codon stop. L'ARNm défaillant est par la suite dégradé dans le cytoplasme [50]. Même si certains ARNms finissent par être transcrits, ils résultent tous en une protéine tronquée qui ne contient pas l'extrémité C-terminal [43]. Comme l'extrémité C-terminal contient le signal de localisation au noyau, la protéine WRN ne migre pas vers le noyau et est rapidement dégradée dans le cytoplasme [51]. Pour ces raisons, la protéine WRN est indétectable dans les cellules ou les tissus des patients SW. Donc les patients SW sont considéré d'un point de vue phénotypique comme WRN^{-/-} [52].

1.6 LA PROTÉINE WRN

La protéine WRN est de la famille des hélicases RecQ et contient les sept domaines hélicases consensus qui sont environ identique à 63% à RECQL (RecQ protein-like) [43]. Le peptide contient un motif de liaison aux nucléotides de type ATPase dans le premier

domaine et une séquence Asp-Glu-X-His (DEXH) dans le deuxième domaine [43]. D'autre part, la protéine WRN possède un domaine exonucléase homologue au domaine de correction des épreuves (proofreading) de l'ADN polymérase I d'*Escherichia coli* ainsi que la RNaseD et le domaine nucléase de polymyositis/scleroderma nuclear autoantigen. Ainsi, WRN est la seule hélicase à ADN qui contient un domaine exonucléase à ADN [53]. La protéine WRN contient trois domaines de liaison de l'ADN lui permettant de cibler une panoplie de structures différentes de l'ADN [54]. Parmi celles-ci, deux motifs peptidiques de type boucle-courbe-boucle lient l'ADN dans son sillon mineur [55]. La protéine WRN contient aussi un signal nucléaire en C-terminal et c'est pourquoi WRN se retrouve uniquement dans le noyau [52] (Figure 2). Signalons également qu'il y a un signal nucléolaire en N-terminal de la protéine WRN [56, 57] et un autre signal nucléolaire entre les acides aminés 949-1092 [58].

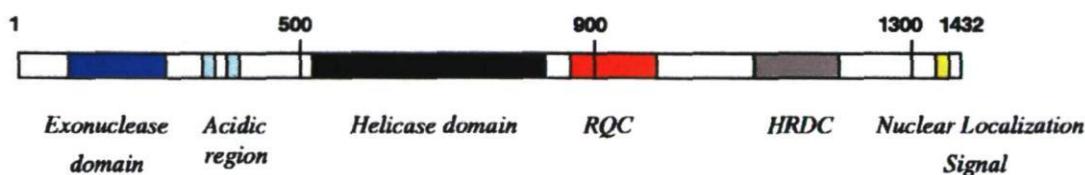


Figure 2. Illustrations des domaines de la protéine Werner.

Adapté de [58]

La région acide stimulerait la transcription en recrutant certains facteurs [57]. En amont de la région acide fortement chargée négativement de la protéine WRN, il y a une région répétée de 27 acides aminés capable de stimuler la transcription par l'ARN polymérase II [57]. Une autre caractéristique intéressante de la protéine WRN est que la lysine 1016 de son domaine évolutivement conservé RecQ est non seulement primordiale à son activité hélicase, mais aussi à plusieurs de ces fonctions en lien avec sa liaison à des structures spécifiques de l'ADN [59] (voir sections qui suivent). La figure 3 illustre la structure cristallisée du domaine hélicase-et-ribonucléase D/C-terminal (HRDC) de la protéine [60]. Le domaine HRDC de WRN pourrait être structuré pour remplir une fonction distincte dans la protéine WRN qui impliquerait des interactions protéine-protéine [60]. En outre, le domaine HRDC de son homologue Sgs1p pourrait moduler la fonction hélicase via des

contacts auxiliaires à l'ADN. D'autre part, les domaines HRDC de WRN et de Bloom (BLM) pourraient avoir un rôle dans leurs différences fonctionnelles en opérant diverses interactions moléculaires [61].

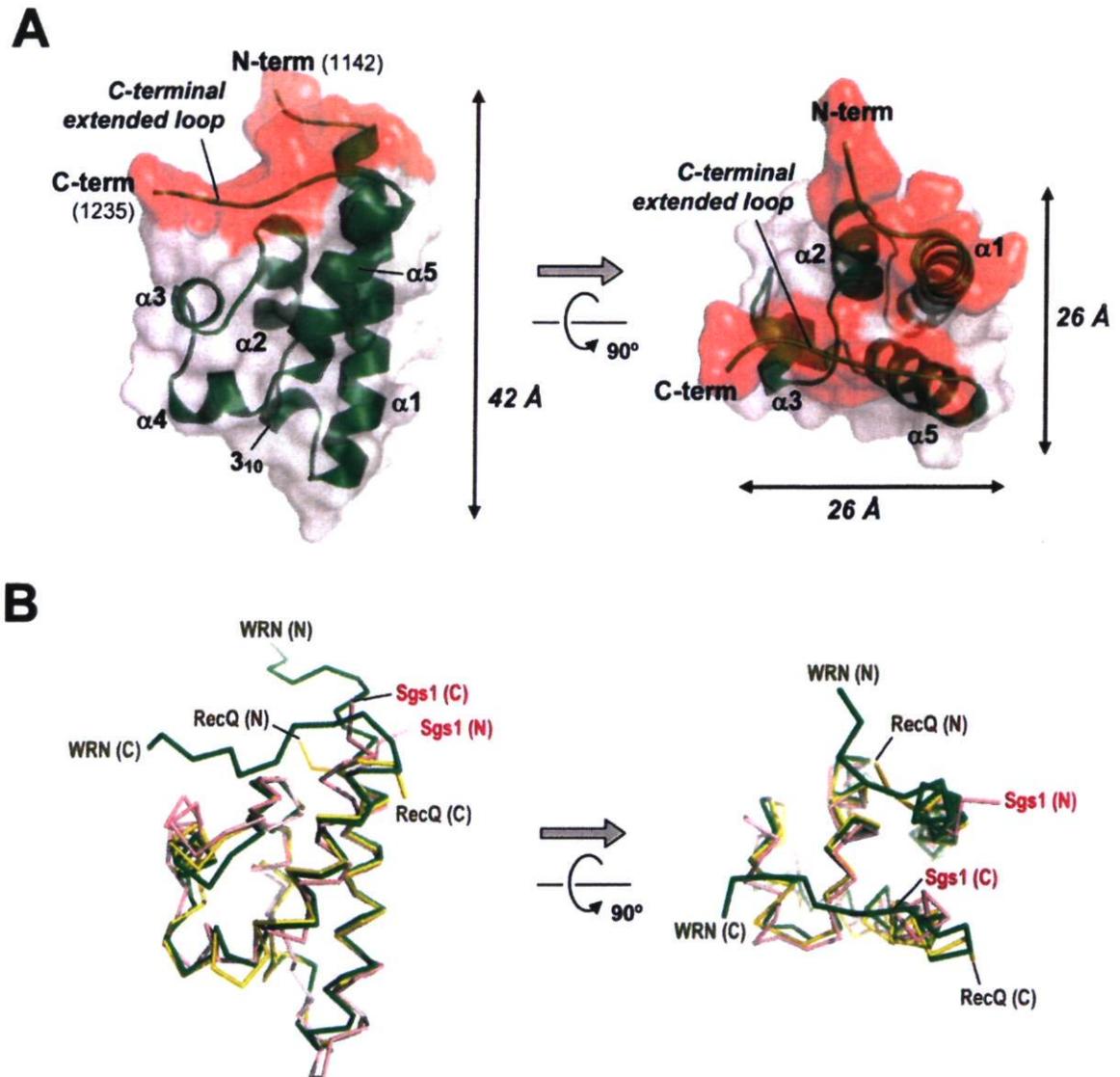


Figure 3. Illustration de la structure cristalline du domaine HRDC de la protéine Werner humaine. A : vue de face à gauche et vue d'au-dessus à droite d'un modèle en ruban du domaine HRDC de la protéine WRN. Les éléments de la structure secondaire sont étiquetés et les dimensions de la molécule sont indiquées. En rouge transparent c'est l'extension C-terminal unique à WRN. B : Superposition de HRDC WRN en vert, HRDC de small

growth suppressor 1 (Sgs1) en rose et HRDC d'*Escherichia coli* (RecQ) en jaune. L'orientation est la même qu'en A.

Adapté de [60]

Dans le nucléole, WRN forme un complexe avec AAA ATPase p97/VCP [60]. En fait, VCP interagit directement avec le domaine RQC de la protéine WRN. Cette interaction est ATP-dépendante, ce qui suggère que VCP joue un rôle mécanistique dans le relâchement de WRN du nucléole vers le nucléoplasme. [63]. De plus, le complexe WRN/VCP se dissocie en réponse à un traitement à la camptothécine, un inhibiteur de topoisomérase I, tandis que d'autres protéines telles que Ku 80 ne sont pas dissociées par cette drogue. Étant donné que les cellules WS sont sensibles aux inhibiteurs de topoisomérase, ces observations suggèrent que VCP joue un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN en modulant la disponibilité de WRN [62].

Par ailleurs la quantité relative de WRN entre le nucléole et le nucléoplasme varie avec le stress répliatif. En effet, les agents causant des dommages à l'ADN durant la réplication vont stimuler le déplacement de la protéine du nucléole vers le nucléoplasme. Ce phénomène se produit également à la suite d'une privation en sérum sur des cellules en culture [64]. D'un point de vue plus mécanistique, suite à des bris dans l'ADN, p300 acétyle la protéine WRN qui quitte le nucléole pour rejoindre les foyers de dommages à l'ADN [65]. Cette acétylation qui est réversible par la protéine SIRT1 [66] augmente ses activités hélicase et exonucléase [67]. En effet, SIRT1 réprime WRN et pourtant les deux protéines ont un effet prosurvi. Rien n'explique clairement ce paradoxe, cependant la localisation cellulaire des deux protéines ainsi que le contexte moléculaire pourraient être à l'origine d'une régulation adéquate de la protéine WRN par SIRT1. Néanmoins, en réponse à une induction par laser de cassure double brin, la protéine WRN s'accumule aux sites de cassure, et ce, indépendamment des protéines de réparation de l'ADN cassé comme PARP1, Ku80, DNA-PKcs, NBS1 ou H2AX [68].

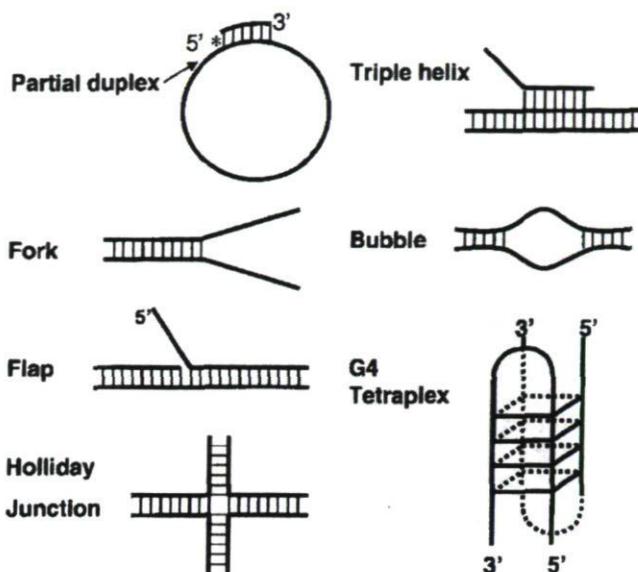
1.6.1 AFFINITÉ ET ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA PROTÉINE WERNER

L'activité hélicase de la protéine WRN serait fonctionnelle à l'état polymérique, mais aussi à l'état monomérique [69]. Cependant, c'est à l'état tétramérique que la protéine WRN lie les jonctions d'Holliday et les fourches de réplifications [70].

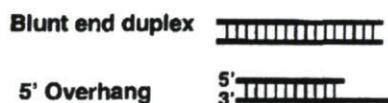
1.6.1.1 HÉLICASE

La protéine WRN possède une activité hélicase 3' -> 5' ATP et dATP dépendante. La protéine WRN déroule efficacement les structures synthétiques en X (jonction d'Holliday), les bulles simple brin de 12 nucléotides, les structures en trihélice et tétrahélice, ainsi que les queues d'ADN 3' simple brin [71] (Figure 4). De plus, WRN possède une activité lui permettant d'hybrider l'ADN simple brin. En conséquence, l'efficacité de son activité hélicase est probablement sous-estimée. Il a récemment été démontré que la protéine de réplication A (RPA) lie l'ADN simple brin stimulant ainsi l'activité hélicase de WRN [72].

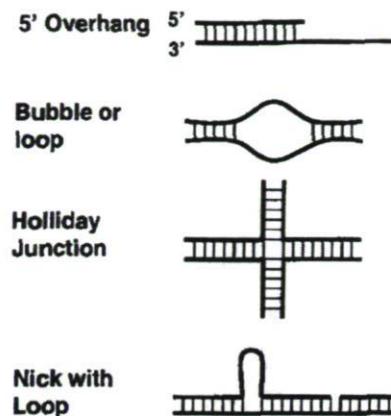
WRN and BLM Helicase Substrates



Not Helicase Substrates



WRN Exo Substrates



Not Exo Substrates



Figure 4. Principaux substrats d'acide nucléique de la protéine Werner, à gauche les substrats de l'hélicase et à droite les substrats de l'exonucléase

Adapté de [73]

1.6.1.2 EXONUCLÉASE

Le domaine exonucléase de WRN lui confère une activité exonucléase 3' → 5' [53] qui est stimulée par les NTP ainsi que les dNTP. Cette activité permet la digestion des brins 3' récessifs [74]. En outre, par son activité exonucléase, WRN dégrade des structures particulières d'acide nucléique tout en hydrolysant l'ATP [75]. Toutefois, son activité exonucléase 3' → 5' peut être bloquée par des lésions volumineuses dans l'ADN [76]. D'autre part et bien que la littérature en traite peu, la protéine Werner aurait aussi une activité exonucléase 5' → 3' qui digère l'ADN et l'ARN des doubles hélices d'acide nucléique qu'elle soit hybride ou non [77]. Mentionnons également que les résidus

lysine 185, tyrosine 206 et arginine 190 sont essentiels à l'activité exonucléase de la protéine WRN [78]. La figure 5 illustre la structure cristallisée du domaine exonucléase comprenant les résidus 31 à 238 liés au $Zn(2+)$ chez la souris. [78, 79].

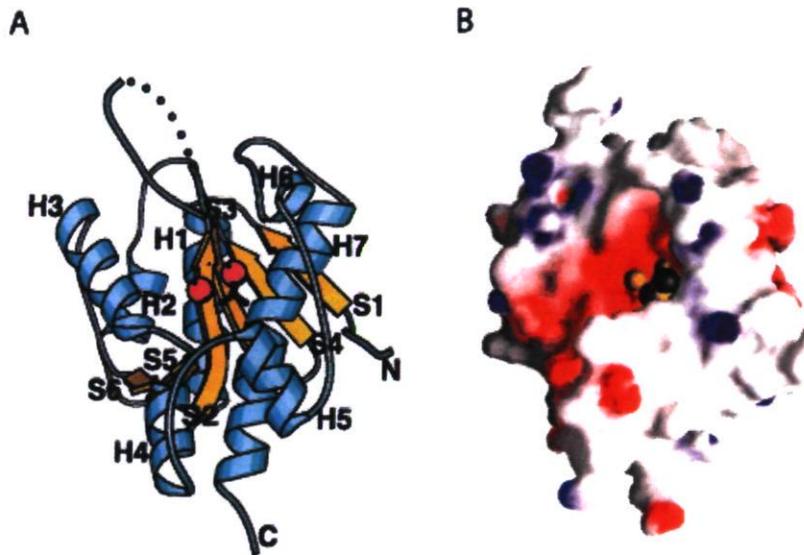


Figure 5. Illustration de la structure cristallisée du domaine exonucléase de la protéine Werner de souris. A, L'exonucléase de Wrn forme un repliement α/β avec 7 hélices (bleu) et 6 feuillets (orange). Les deux ions Zn^{2+} sont montrés en magenta et l'ion sulfate est en jaune. B, Représentation de la surface électrostatique de l'exonucléase de Wrn. Les deux ions Zn^{2+} (Jaune) et l'ion sulfate (noir) sont dans la profonde crevasse au centre de l'exonucléase de Wrn. La surface a été colorée dans la plage $<-8 \text{ à } +8kBT$, alors que kB est la constante de Boltzman et T est la température. Le potentiel positif est en bleu et le potentiel négatif est en rouge. La figure est dans la même orientation que A.

Adapté de [78]

1.6.1.3 LES COFACTEURS DE LA PROTÉINE WRN

Les domaines catalytiques hélicase et exonucléase de la protéine WRN contiennent chacun un site de liaison aux métaux qui peuvent être oxydés par le fer [79]. L'oxydation de ces sites désactive les activités hélicase et exonucléase de la protéine WRN en plus de changer son patron d'interaction avec différentes protéines [79]. Cette oxydation pourrait bien avoir une signification dans la régulation de la protéine WRN puisqu'elle n'entraîne pas la

dégradation de cette dernière par le protéosome [79]. En lien avec ces sites de liaison, les activités catalytiques de la protéine WRN sont maximisées par le complexe ATP-Mg(2+). Cependant, le Mg(2+) peut être remplacé par le Mn(2+) ou le Ni(2+). Le Fe(2+) et le Cu(2+) inhibent totalement l'activité hélicase même en présence de Mg(2+). Finalement, le Zn(2+) augmente fortement son activité exonucléase confirmant l'importance de son site de liaison au Zn(2+) dans son domaine exonucléase [69]. En dernier lieu, sous des conditions permettant l'hydrolyse de l'ATP, il y a coopération entre les activités ATPase/Hélicase et exonucléase de la protéine WRN déterminant la direction et la longueur de la dégradation des extrémités 3' des fragments d'ADN [80]. Cela suggère que les deux activités de la protéine WRN sont reliées.

1.7 LES RÔLES DE LA PROTÉINE WRN RELATIFS À SES PARTENAIRES

Même si la protéine WRN empêche en quelque sorte la sénescence, elle agirait plutôt comme un suppresseur de tumeur et en tant que gardien du génome. En fait, elle est épigénétiquement inactivée par la méthylation de son promoteur dans certains cancers [81]. Signalons également que la protéine WRN est impliquée dans beaucoup de sentiers métaboliques de l'ADN tels que la réparation, la réplication, la transcription, la maintenance des télomères ainsi que la recombinaison homologue ou non homologue. Il n'est donc pas surprenant de constater que la protéine WRN affecte le cycle cellulaire et surtout la phase S. Effectivement, chez les cellules SW, la phase S est beaucoup plus longue [82]. De plus, le cycle cellulaire n'est pas arrêté chez les fibroblastes SW suite à un traitement au peroxyde contrairement à des cellules provenant d'individus normaux [83]. Ces résultats suggèrent un rôle pour WRN dans la régulation du cycle cellulaire en réponse aux EROs. Finalement, des études sur les polymorphismes pour un seul nucléotide (PSNs) du gène WRN suggèrent la régulation de l'expression de la protéine activatrice du plasminogène type 1 par la protéine WRN ainsi qu'un rôle pour WRN dans le métabolisme des lipides et de l'inflammation [84].

1.8 LES PARTENAIRES DE LA PROTÉINE WRN

La protéine WRN est impliquée dans plusieurs mécanismes moléculaires et ce en grande partie grâce à son interaction avec différents partenaires moléculaires. De fait, WRN est connue pour interagir génétiquement, fonctionnellement ou physiquement avec une panoplie de protéines. En particulier, des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, la réplication, la transcription, la maintenance des télomères, la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose [85]. Voici quelques exemples :

1.8.1 p53

Lorsqu'on provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase S avec de l'hydroxyurée, WRN quitte le nucléole pour interagir avec p53 dans le nucléoplasme. De plus, WRN interagit par son extrémité C-terminal avec l'extrémité C-terminal de p53 pour augmenter son activité transcriptionnelle [86]. Ainsi, une surexpression de WRN induit la transcription de p53 et augmente l'apoptose p53 dépendante [87]. D'ailleurs, WRN est nécessaire à l'apoptose p53 dépendante [88]. En outre, un polymorphisme de la protéine WRN (Cys1367Arg) corrèle avec une augmentation de certains types de cancers du sein familiaux et avec certains polymorphismes de p53 [89]. Malgré cela, l'apoptose indépendante de p53 est augmentée dans les cellules SW. De surcroît, suite à son interaction avec p53, les activités exonucléase [90] et hélicase de WRN sont inhibées [91]. Finalement, la sénescence des cellules SW serait induite par p53 puisqu'on peut la reporter en neutralisant p53 avec un anticorps [92].

1.8.2 PROTÉINE DE LA TRANSCRIPTION

La protéine WRN reconnaît et déroule les séquences formant des structures G-tétraplexe. En effet, des résultats de profilage d'expression génique ont démontré que les loci contenant des séquences formant des structures en G-quadruplex étaient faiblement transcrits dans les cellules déficientes en WRN [93]. De plus, la protéine WRN est une composante du complexe de transcription associé à l'ARN polymérase I et accélère la transcription des ARN ribosomaux (ARNr) [94]. Finalement, WRN est un cofacteur dans la

réplication du VIH-1 en permettant le recrutement du facteur de transcription PCAF/PTEFb [95].

1.8.3 PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LES HYBRIDES ARN/ADN

L'ARN hélicase A interagit avec WRN et stimule son activité exonucléase [96]. Mentionnons également que l'interaction de DHX9 avec WRN stimule aussi son activité hélicase spécialement pour les ARNs contenant des structures en pied de poulet et pour les fragments d'Okazaki [97]. Finalement, les deux protéines ensemble permettent la régression des fourches de réplication et la dissolution des structures ressemblant à des jonctions d'Holliday [97].

1.8.4 EXONUCLÉASE 1 (EXO-1)

L'interaction de l'extrémité C-terminal de WRN avec l'exonucléase 1 (EXO-1) stimule les activités exonucléolytique et endonucléolytique de cette dernière [98]. Bien qu'on n'en sache pas beaucoup à propos de cette interaction, on note tout de même qu'EXO-1 coupe des hybrides ARN/ADN. D'autre part, cette exonucléase est aussi impliquée dans la réparation de mauvais appariements dans l'ADN ainsi que dans la recombinaison homologue.

1.8.5 REPLICATION PROTEIN A (RPA)

En induisant des dommages qui bloquent les fourches de réplication, on induit une augmentation de la colocalisation de WRN et de RPA [99]. En fait, RPA interagit avec deux domaines de WRN et son interaction en N-terminal stimule l'activité hélicase de WRN [100]. D'ailleurs, l'augmentation de l'efficacité de WRN à dérouler l'ADN est en grande partie due à l'interaction de RPA avec l'ADN simple brin qui empêche WRN d'hybrider les brins complémentaires d'une fourche [72]. La protéine RPA permet à WRN de séparer des fragments allant jusqu'à 849 paires de bases. La protéine RPA augmente l'activité hélicase de WRN en lui permettant de dérouler des quadruplex d'ADN

télomérique [101] et de l'ADN contenant des liaisons internucléotides [102]. Fait intéressant, la réparation des dimères de thymidines est moins efficace chez les patients SW que chez les sujets normaux du même âge [31].

1.8.6 ADN POLYMÉRISE Δ

La protéine WRN recrute l'ADN polymérase Δ (pol Δ) au nucléole [103] en interagissant directement avec p50 et la troisième sous-unité de l'ADN polymérase Δ. Par son interaction, WRN augmente la productivité de la pol Δ [104] et facilite la réplication à travers les structures en tetraplex et les structures en épingle à cheveux de séquences d(CGG)_n répétées [105] en les déroulant [106]. Ces sites sont d'ailleurs connus pour être des séquences fragiles à la réplication. La fréquence de bris aux sites fragiles est augmentée dans les cellules SW [107].

1.8.7 COMPLEXE DE RÉPLICATION

En interagissant avec le complexe de réplication [108], WRN facilite la poursuite de l'élongation de la réplication par l'entremise de MRE11 [109] ainsi que de Nijmegen breakage syndrome 1 (NBS1) [110]. Mentionnons également que la protéine WRN déroule les triples hélices d'ADN spécialement lorsqu'elle adopte la forme d'une fourche de réplication [111]. De plus, WRN serait impliquée particulièrement dans la réplication du brin tardif puisque la protéine est capable de dérouler les fragments d'Okasaki dans une fourche synthétique [112]. D'autre part, la protéine WRN débloque les fourches de réplication, en catalysant à l'aide de ses principales activités enzymatiques, la régression de la fourche de réplication et la formation de jonction d'Holliday de façon ATP dépendante [113, 114]. Finalement, il a été démontré que la réplication de l'ADN est plus lente dans les cellules SW [115].

1.8.8 ENZYME DE LA RÉPARATION PAR EXCISION DE BASES

Lors de la réparation d'une base par excision, la protéine Uracil-ADN Glycosilase (UAG) reconnaît et lie les bases endommagées dans l'ADN pour les enlever. Par la suite, Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1) remplace UDG au site de dommage [67] pour créer des cassures aux sites ayant contenu les bases anormales. APE1 inhibe l'activité hélicase de la protéine WRN recrutée aux sites modifiés en attendant que la l'ADN polymérase β (pol β) arrive à son tour. La pol β en déplaçant APE1 lève cette inhibition [116]. Par la suite, la protéine WRN stimule la polymérase β [67] en interagissant directement avec elle [117]. La protéine WRN améliore aussi la productivité de plusieurs ADN polymérases pouvant traverser les lésions telles que les ADN polymérases β , κ et I [118].

1.8.9 ENZYME IMPLIQUÉ DANS LA RÉPARATION DES BASES MAL APPARIÉES

Les facteurs de réparation des mauvais appariements MutS α , MutS β et MutL α interagissent avec WRN et stimulent son activité hélicase surtout dans les structures d'ADN en fourche avec un bras 3' simple brin [119].

1.8.10 TOPOISOMÉRASES (TOPO)

La protéine WRN interagit avec la topoisomérase I [108] et stimule son activité de relaxation de l'ADN ainsi que son activité de liaison alors que TOPO I inhibe l'activité ATPase de WRN [120]. En réponse à une transfection de petits ARNs à interférence contre l'ARNm de WRN, les cellules cancéreuses deviennent plus sensibles à la camptotécine, un inhibiteur de TOPO I [121].

La topoisomérase II interagit avec WRN en réponse à un traitement avec un inhibiteur de l'activité catalytique de TOPO II. Toutefois, la protéine WRN ne protège pas les cellules des inhibiteurs de TOPO II comme c'est le cas pour les inhibiteurs de TOPO I [122].

Néanmoins, chez la souris, la protéine Wrn protège les cellules des inhibiteurs de topoisomérases I et II [123].

1.8.11 COMPLEXE DE RÉPARATION PAR LA RECOMBINAISON NON HOMOLOGUE (RRNH)

En réponse à un bris double brin, le complexe Ku70/80 lie les extrémités de l'ADN et recrute la kinase DNA-PK. De plus, en présence de Ku70/80 [124], l'DNA-PK lie la protéine WRN et la phosphoryle pour inhiber ses activités catalytiques [125]. Toutefois, en interagissant avec le complexe Ku70/80 [126], l'DNA-PK perd sa place dans le complexe [127]. Une fois que l'DNA-PK est partie, le complexe Ku70/80 stimule l'activité exonucléase de WRN [128]. Cette stimulation est modulable par l'ADP-Ribosylation de Ku70/80, car cette ADP-Ribosylation de Ku70/80 réduit l'activité exonucléase de WRN [129]. D'autre part, quand WRN est à la fois en présence de Ku70/80 et de RPA, son activité hélicase prédomine sur son activité exonucléase [130]. L'activité exonucléase de WRN en retour, est stimulée par son interaction directe avec le complexe SRCC4-ADN ligase IV (X4L4). Le complexe X4L4 lie les bouts d'ADN modifiés par la protéine WRN [131]. Fait intéressant, des études récentes ont démontré qu'une augmentation de WRN avec l'ADN ligase IIIalpha dans les cellules de leucémie myéloïde chronique permettent la survie de ces cellules en réparant les bris double brin induits par les EROs par une voie alternative de la recombinaison non homologue impliquant WRN [132]. Finalement, l'augmentation des translocations variées dans les fibroblastes SW suggère l'importance de la protéine WRN dans la réparation des bris double brin [133].

1.8.12 RÉPARATION DES DOMMAGES OXYDATIFS

L'activité exonucléase 3' -> 5' de WRN est bloquée par certaines modifications oxydatives produisant des groupes sur les extrémités 3' qui obstruent l'accès aux brins ciblés [134]. Heureusement, les complexes Ku70/80 permettent à WRN de passer à travers plusieurs bris oxydatifs qui l'auraient normalement bloquée comme les modifications de type 8-oxoadenines et 8-oxoguanines [135, 136].

1.8.13 NEI ENDONUCLEASE VIII-LIKE 1 (NEIL1)

L'extrémité C-terminal du domaine RecQ de la protéine WRN interagit avec l'extrémité C-terminal de la protéine NEIL1, une ADN-glycosylase, et stimule la réparation des dommages oxydatifs aux bases d'ADN par cette dernière [137].

1.8.14 POLY(ADP-RIBOSE) POLYMÉRASE-1 (PARP-1)

La protéine WRN interagit physiquement avec la protéine poly(ADP-ribose) polymérase-1 (PARP-1) et ensemble ils préviennent les bris de chromatine, les réarrangements chromosomiques ainsi que le cancer chez la souris [138]. En effet, le complexe WRN/PARP-1 régule le cycle cellulaire en réponse au stress oxydatif ainsi qu'aux agents alkylants. Il a d'ailleurs été démontré que les deux activités catalytiques de WRN sont inhibées par PARP-1, suggérant un rôle de PARP-1 dans la régulation des activités de WRN [139].

1.8.15 ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED (ATM)

La protéine WRN agirait en amont d'ATM dans le repérage des bris d'ADN dans le sentier de la recombinaison non homologue. En fait, la protéine WRN est requise pour l'activation d'ATM en phase S en réponse aux bris double brin induits par les liaisons interbrins [140].

1.8.16 COMPLEXE BREAST CANCER 1/ BRCA1-ASSOCIATED RING DOMAIN PROTEIN 1 (BRCA1/BARD1)

La protéine WRN interagit aussi avec le complexe BRCA1/BARD1 pour réparer les liaisons interbrins [141]. De plus, il n'y a pas de point de contrôle en G2 dans les cellules SW. En effet, la voie d'ATR passe habituellement par une phosphorylation de BRCA1 et cette phosphorylation est absente dans les cellules SW [142].

1.8.17 ATAXIA TELANGIECTASIA-RELATED PROTEIN (ATR)

La protéine WRN participe dans un complexe qu'elle forme avec ATR, RAD51, RAD54 et RAD54B en réponse aux liaisons interbrins [143]. D'ailleurs, les cellules SW sont sensibles aux drogues induisant des liaisons interbrins [144, 145].

1.8.18 RECOMBINAISON HOMOLOGUE

En interagissant avec WRN, RAD52 régule l'activité de WRN engendrant une augmentation de la recombinaison homologue dépendante de RAD52 [146]. De la même façon, la protéine WRN interagit avec RAD51 [143] et interfère dans la recombinaison homologue par cette dernière [147]. D'autre part, il y a une diminution de la fréquence d'initiation de la réparation [148], une accumulation de foyer RAD51 [149] et de plus grandes suppressions dans les cellules somatiques des patients WRN [150]. Finalement, il y a une prolongation de la réparation dans les cellules SW en phase S [149].

Chez le xénope, une déplétion de xWRN cause une réduction significative de la réparation homologue de bris double brin [151]. De plus, le déroulement de l'ADN en direction 5' vers 3' exige la protéine xWRN alors que la dégradation dans la même direction est indépendante de xWRN [152].

1.8.19 HÉLICASE DU SYNDROME DE BLOOM

La protéine responsable du syndrome de Bloom (BLM) est une hélicase RecQC de la même famille que WRN et est aussi impliquée dans différents sentiers métaboliques de l'ADN, dont la recombinaison homologue. Cependant, les deux hélicases se complètent sans toutefois compenser complètement pour la perte de l'autre [153]. De fait, BLM inhibe WRN en interagissant avec le domaine exonucléase de cette dernière [154]. Soulignons également que BLM n'a pas d'activité exonucléase connue.

1.8.20 5' FLAP ENDONUCLEASE/5'-3' EXONUCLEASE (FEN-1) ET PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA)

En réponse à l'arrêt de la fourche de réplication WRN forme un complexe avec 5' flap endonuclease/5'-3' exonuclease (FEN-1) [155] qui stimule drastiquement son activité endonucléase [156]. Ensemble, FEN-1 et WRN migrent les branches de la fourche de réplication [155].

Les protéines WRN et PCNA interagissent ensemble [108] en plus d'interagir toutes les deux sur des sites adjacents en C-terminal de FEN-1. Des résultats expérimentaux suggèrent que ces trois protéines pourraient travailler de concert dans la réplication et la réparation de l'ADN [157]. Finalement, en interagissant avec FEN-1, WRN est essentielle à la réparation et la maintenance des télomères [156]. Ainsi, les deux protéines sont impliquées à la fois dans la réplication et la réparation.

1.8.21 TÉLOMÈRES

La protéine WRN joue incontestablement un rôle dans le métabolisme des télomères. On observe d'ailleurs une dynamique anormale des télomères dans les cellules SW [158]. En outre, à l'intérieur des cellules WRN déficientes, il y a une élévation du taux de recombinaison entre les télomères de différents chromosomes créant une élongation de ces télomères par recombinaison télomérique [159]. Certains résultats soutiennent même que l'activité de WRN est une séquence spécifique dans les télomères et qu'elle influence probablement la formation de structures protectrices en boucle de type T aux télomères [160].

Soulignons également que WRN reconnaît les structures de type « boucle-D » de l'ADN télomérique et initie la migration des branches de structure en « boucle-D » et ce à partir des deux types de brin invasif 5' ainsi que 3' [161]. Au niveau des télomères, DNA-PK stimule l'activité hélicase de WRN et ainsi lui permet d'enlever l'extrémité invasive des

structures en « boucle-D » aux télomères [162]. Cette interaction DNA-PK/WRN est donc cruciale dans le maintien des télomères [162].

1.8.22 TELOMERIC REPEAT-BINDING FACTOR 2 (TRF2)

La protéine telomeric repeat-binding factor 2 (TRF2) lie les hélicases WRN ainsi que l'hélicase du syndrome de BLM et stimule leur activité hélicase [163]. Toutefois, il empêche WRN de migrer les jonctions d'Holliday avec bras télomériques et protège ainsi les structures en « boucle-T » aux extrémités des télomères [164]. Enfin, les activités hélicase et exonucléase ainsi que l'interaction de WRN avec TRF2 sont requises pour réduire la formation de cercles telomériques extra chromosomiques [165].

1.8.23 PROTECTION OF TELOMERES PROTEIN 1 (POT 1)

La protéine protection of telomeres protein 1 (POT1) lie l'ADN simple brin aux télomères. POT1 stimule l'activité hélicase de WRN [166] et prévient l'hybridation des brins complémentaires de l'ADN [167] dans les fourches de réplication telomériques. De plus, POT1 inhibe l'activité exonucléase de WRN sur l'ADN télomérique [160]. Ces résultats suggèrent un rôle dans la réplication des télomères pour le complexe WRN/POT1.

1.8.24 RECEPTOR OF ACTIVATED PROTEIN KINASE C 1 (RACK1)

WRN interagit avec la protéine RACK1 et maintient une sous-population de RACK1 au noyau. Lorsqu'on épuise la protéine WRN à l'aide de petits ARN à interférence contre la séquence de WRN, une sous-population de protéines RACK1 migre vers le cytoplasme et active les protéines kinase C (PKC) β et δ [1]. Les protéines kinase C participent à la transduction du signal en phosphorylant d'autres protéines. De plus, PKC δ phosphoryle p21, qui est stabilisée, et induit la sénescence [168].

1.9 LES MODÈLES DE SOURIS

Chez la souris, le gène *Wrn* se situe sur le chromosome 8 dans une région chromosomique synténique au chromosome 8 humain contenant le gène *WRN* [123]. Chez la souris, le peptide est légèrement plus court que chez l'humain. La protéine *Wrn* de souris ne contient pas la séquence de 27 acides aminés dupliqués chez la protéine *WRN* humaine en N-terminal ni de signal nucléolaire en N-terminal [56]. La protéine *Wrn* de souris est donc située majoritairement dans le nucléoplasme. Signalons que, tout comme chez l'humain, la protéine *Wrn* de souris possède une hélicase et une exonucléase [169]. Plusieurs modèles animaux du SW ont été développés chez la souris pour étudier la fonction du gène dans le vieillissement.

1.9.1 LA SOURIS Δ HELICASE

Le premier modèle murin du SW, la souris *Wrn* Δ hélicase, est le modèle le mieux caractérisé et celui qui ressemble le plus au phénotype humain. C'est une souris dont les motifs III et IV du domaine hélicase de la protéine *Wrn* sont supprimés [123]. Le gène *Wrn* Δ hélicase mutant est transcrit et un peptide légèrement plus court que le peptide sauvage est aussi synthétisé [123]. Cette protéine mutante est stable et acheminée au noyau. Cependant, son activité hélicase est nulle et elle n'interagit pas avec plusieurs protéines du complexe de réplication de l'ADN qui interagissent normalement avec la protéine *Wrn* sauvage.

Les cellules souches embryonnaires *Wrn* Δ hélicase ont une augmentation des mutations spontanées par rapport aux cellules souches embryonnaires (ESC) de souris normales [123]. De plus, les ESC *Wrn* Δ hélicase sont plus sensibles aux inhibiteurs de topoisomérases que les ESC de souris normales [123]. Enfin, les FSEs *Wrn* mutantes en culture ont une diminution de croissance en fonction du temps qui survient prématurément en comparaison aux FSEs TS [123]. Ajoutons également que le ratio de naissance de souris *Wrn* Δ hélicase est inférieur à celui prédit par la génétique mendélienne. Nous pouvons donc en déduire que la délétion confère un désavantage de survie embryonnaire ou

périnatal [123]. Les souris Wrn Δ hélicase qui naissent se développent normalement mais développent des lymphomes de cellules T, des maladies cardiaques et de l'obésité [123]. De plus, les souris Wrn Δ hélicase développent prématurément une défenestration de l'endothélium du foie, de l'inflammation et un syndrome métabolique [170]. Chez ces souris, certains marqueurs de stress liés à l'âge sont plus élevés; c'est le cas de la phosphorylation des substrats d'AKT, de NF-kappaB et de PKCd [170]. De plus, la protéine HIF-1alpha est augmentée chez les souris Wrn Δ hélicase [170]. Finalement, les souris Wrn Δ hélicase vivent en moyenne moins longtemps que les souris TS [170].

Ce modèle de souris a permis la découverte d'une thérapie potentielle pour les patients atteints du SW. En effet, un traitement de longue durée à la vitamine C permet le rétablissement de plusieurs des phénotypes, dont la longévité moyenne [170].

1.9.2 LA SOURIS K 557 -> M

Le deuxième modèle de souris du SW exprime un dominant négatif de la protéine humaine dont la lysine, en position 577 du domaine hélicase, est mutée pour une méthionine [171]. Ce mutant de Wrn n'a pas d'activité hélicase. Tout comme les cellules issues de gens atteints du SW, les cellules de ces souris sont hypersensibles au 4-Nitroquinoline 1-oxide (4NQO). Elles ont un potentiel de réplication réduit ainsi qu'une faible expression de la protéine Wrn endogène [171].

1.9.3 LA SOURIS WRN NULLE

Le troisième modèle est une souris qui a une délétion de la partie C-terminal du domaine hélicase de la protéine Wrn. La souris Wrn nulle ne produit pas la protéine Wrn. Ces souris ont une tendance à l'obésité et démontrent un dérèglement de l'homéostasie du glucose en présence d'une diète diabétogénique [172]. Les fibroblastes de ces souris entrent en sénescence environ un passage plus tôt que les fibroblastes TS [173]. Il est important de souligner que les souris de ce modèle Wrn^{-/-} et p53^{-/-} vivent moins longtemps que des

souris *Wrn*^{-/+} et *p53*^{-/-} [173]. Cela suggère que la longévité de ces souris est déterminée par une synergie entre *p53* et *Wrn* [173].

1.9.4 LES DOUBLES MUTANTS

Les souris *Wrn* Δ hélicase/ Δ hélicase et *p53* nulle ou *Wrn* Δ hélicase/ Δ hélicase et *p21* nulle développent des tumeurs beaucoup plus rapidement que les souris qui sont seulement *p53* nulle ou *p21* nulle [174]. Les souris *Wrn* Δ hélicase/ Δ hélicase et *PARP-1*^{-/-} montrent une augmentation du stress oxydatif ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes apoptotiques [175]. Finalement, les souris *Wrn* nulle et télomérase déficientes (*ARN* gabarit ^{-/-} *Terc*) montrent une diminution des télomères plusieurs générations plus tôt que les souris seulement déficientes en télomérases [176]. Ajoutons également que les souris *Wrn*^{-/-} *Terc*^{-/-} développent un vieillissement plus précoce que les souris *Wrn* Δ hélicase mutantes [177]. En somme, les observations obtenues chez la souris nous indiquent que les souris forment de bons modèles pour étudier le gène et la protéine responsables du SW.

1.10 LES FIBROBLASTES DE SOURIS EMBRYONNAIRES (FSES)

Les fibroblastes de souris embryonnaires (FSEs) sont isolés à partir des tissus d'embryons de souris à 15,5 jours de gestation [138]. Ces cellules ont une morphologie fusiforme ou étoilée et elles sont d'origine mésenchymateuse. Elles sécrètent les macromolécules de la matrice extracellulaire (MEC) telles que le collagène, les protéoglycanes, les glycosaminoglycanes et autres glycoprotéines. À un stade de développement plus avancé, les fibroblastes sont normalement les cellules principales du tissu conjonctif chez l'adulte. En outre, le tissu conjonctif est présent partout dans l'organisme sous la forme de tissu conjonctif lâche, réticulaire, dense, élastique ou très cellulaire (tissu adipeux) ou bien solide (cartilage) ou même solide et minéralisé (tissu osseux). Enfin, les fibroblastes entretiennent la MEC et permettent la guérison des blessures.

1.11 LES ESPÈCES RÉACTIVES D'OXYGÈNE (EROS)

Les espèces réactives d'oxygène (EROs) sont des molécules très réactives contenant au moins un atome d'oxygène et elles sont produites de façon naturelle par la mitochondrie [178]. En réponse à un repas ou en période d'effort physique intense, la production d'EROs par l'organisme est grandement augmentée [179]. En effet, une augmentation de sucre et de lipide dans le sang change le niveau redox des cellules [180]. Les EROs peuvent causer des dommages directs en réagissant avec des macromolécules telles que les acides nucléiques ou les protéines ou indirectement en réagissant avec de petites molécules qui deviendront des radicaux libres. Ces derniers pourront causer des dommages directs à la cellule en réagissant avec des macromolécules. L'ensemble des dommages causés par le stress oxydatif est présumé comme étant la cause principale du vieillissement [181]. Heureusement, la cellule produit des antioxydants pour se protéger des EROs ou pour neutraliser ces dernières et ainsi diminuer les dommages qu'ils causent. La cellule réussit généralement à réparer les dommages causés par les EROs. D'autre part, des niveaux anormaux d'EROs sont connus pour être impliqués dans plusieurs pathologies telles que le diabète, des complications dues à l'obésité et le cancer [182, 183]. Toutefois, les EROs ne sont pas que des nuisances pour la cellule. En fait, elles sont impliquées dans plusieurs sentiers biologiques de signalisation [184]. Le peroxyde d'hydrogène et les anions d'oxygène sont des exemples classiques d'EROs.

1.12 LE PEROXYDE D'HYDROGÈNE

Le peroxyde d'hydrogène est naturellement produit dans le lysosome pour détruire et digérer les bactéries lors de la phagocytose. Cela est possible grâce à des enzymes tels que les oxydases [185-187]. Le peroxyde est ensuite transformé en eau et en oxygène par les peroxydases et la catalase qui sont présentes en forte concentration dans les peroxysomes [188, 189]. Le peroxyde d'hydrogène est aussi produit de manière indirecte par la chaîne respiratoire de la mitochondrie. En effet, durant les différentes réactions enzymatiques d'oxydoréduction de la chaîne respiratoire, il y a production d'anion superoxyde, c'est-à-

dire de dioxygène avec un électron en trop [190]. La superoxyde dismutase catalyse la réduction de l'anion superoxyde qui en réagissant avec les protons libres dans l'eau se transforme en peroxyde d'hydrogène. En somme, le peroxyde d'hydrogène fait partie des EROs produits par la mitochondrie ainsi que d'autres organites au cours du fonctionnement normal de la cellule [191].

CHAPITRE 2

2.1 OBJECTIFS

Il a été démontré que les EROs sont élevées chez les patients WRN [192] ainsi que dans les tissus de souris *Wrn* Δ héliscase/ Δ héliscase [170]. D'ailleurs, des résultats préalables ont démontré que cette hausse des EROs n'était pas un phénomène uniquement observable au niveau de l'organisme entier, mais également au niveau cellulaire. En effet, les EROs sont plus élevées dans des FSEs *Wrn* Δ hel/ Δ hel en culture que dans des FSEs de TS [175]. Cette observation est d'autant plus intéressante du fait que les FSEs sont à l'origine de plusieurs tissus qui sont justement problématiques chez les individus atteints du SW, tels que les tissus adipeux, musculaires, osseux et cutanés par exemple.

Nous avons donc pris comme objectif général de mieux positionner les EROs en tant qu'effet ou cause dans le SW. Pour ce faire, nous avons traité des FSEs *Wrn* Δ hel/ Δ hel et des FSEs TS avec du peroxyde d'hydrogène. Par la suite, afin de comparer la réaction cellulaire aux EROs d'origine exogène ainsi qu'endogène des FSEs-*Wrn* Δ hel/ Δ hel et TS, nous avons mesuré les glutathions intracellulaires des FSEs *Wrn* Δ hel/ Δ hel et TS avant et après un traitement au peroxyde d'hydrogène.

Nous avons par la suite déterminé l'impact des EROs dans le phénotype transcriptionnel des FSEs *Wrn* Δ hel/ Δ hel par rapport aux FSEs TS. Pour ce faire, nous avons traité des cellules *Wrn* Δ hel/ Δ hel et TS avec du peroxyde d'hydrogène. Par la suite, nous avons extrait l'ARN intracellulaire des FSEs *Wrn* Δ hel/ Δ hel et TS avec ou sans traitement. Nous avons mesuré les niveaux d'ARNm de milliers de gènes à l'aide de biopuces. Finalement, nous avons pris les quantités d'ARNm des FSEs TS comme contrôle pour évaluer les quantités d'ARNm des FSEs *Wrn* Δ hel/ Δ hel, des FSEs *Wrn* Δ hel/ Δ hel traitées au peroxyde et des FSEs TS traitées au peroxyde. Finalement, nous avons validé nos résultats par TI-RCPq.

Après avoir constaté l'impact des EROs endogènes et exogènes sur les ARNm des gènes des FSEs TS et *Wrn* Δ hel/ Δ hel, nous avons vérifié si les EROs affectent des sentiers

biologiques spécifiques au niveau transcriptionnel dans nos cellules. Pour ce faire, nous avons utilisé le programme Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships (PANTHER) qui permet de classifier les gènes selon leurs fonctions en utilisant des évidences expérimentales publiées dans des articles scientifiques et leurs liens évolutifs. Cela permet de prédire la fonction d'un gène en l'absence d'évidence expérimentale. À l'aide de ce programme, nous avons classifié les gènes selon leurs sentiers biologiques. D'une manière globale, nos résultats démontrent le rôle des EROs dans le SW et nous permettent de saisir comment elles influencent la destinée cellulaire dans le contexte du SW.

2.2 RÉSUMÉ

Contexte : Le SW est une maladie rare caractérisée par l'apparition prématurée de plusieurs maladies liées au vieillissement. Le gène responsable du SW code pour une protéine ADN hélicase/exonucléase qu'on croit impliquée dans différents aspects de la transcription, de la réplication, et/ou de la réparation de l'ADN. En plus de l'instabilité génomique, les cellules SW humaines montrent plus de stress oxydatif. Dans ce compte rendu, nous avons examiné l'impact du peroxyde d'hydrogène sur le profil d'expression transcriptionnelle de fibroblastes de souris embryonnaires manquant une partie du domaine hélicase de la protéine homologue à WRN, les FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$.

Résultats : Les fibroblastes de souris embryonnaires mutantes $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ montrent une augmentation du stress oxydatif. Cela se reflète par une augmentation des espèces réactives d'oxygènes (EROs) intracellulaires, une augmentation des dommages oxydatifs dans l'ADN génomique, un changement dans le ratio ATP/ADP et une perturbation du potentiel intermembranaire de la mitochondrie en comparaison aux fibroblastes de souris embryonnaires de type sauvage. L'analyse du profil d'expression des cellules de type sauvage traitées au peroxyde d'hydrogène indique une diminution significative de l'expression des gènes impliqués dans la mitose, la glycolyse, le métabolisme des acides gras, le métabolisme des acides nucléiques et le contrôle du cycle cellulaire, aussi bien que la modification et la stabilité des protéines. Plusieurs diminutions de ces processus biologiques n'ont pas été observées dans les cellules $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ traitées au peroxyde d'hydrogène. Essentiellement, les cellules $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ non traitées montraient déjà une diminution de plusieurs de ces processus biologiques diminués dans les cellules de type sauvage traitées avec du peroxyde d'hydrogène.

Conclusion : Le profil d'expression des cellules mutantes $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ révèle une réponse très différente à l'addition de peroxyde d'hydrogène exogène en culture lorsque nous les comparons aux cellules de type sauvage. Cela est en partie dû au fait que les cellules mutantes $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ montraient déjà un stress oxydatif intracellulaire de façon chronique.

Dans cet article publié dans BMC Genomics, j'ai cultivé les FSEs, je les ai ensuite traitées au peroxyde d'hydrogène. Par la suite, j'en ai extrait l'ARN. L'ARN a été analysé par le service de micropuces à ADN du FRSQ-Réseau Cancer Core Genomic Facility (RCCGF). Afin de valider les résultats des biopuces, j'ai dessiné des oligonucléotides puis j'ai fait du TI-RCPq sur l'ARN avec ces derniers. J'ai participé à l'analyse bio-informatique. Enfin, j'ai quantifié les EROs intracellulaires ainsi que les dommages à l'ADN.

2.3 ARTICLE

Expression profiling of mouse embryonic fibroblasts with a deletion in the helicase domain of the Werner Syndrome gene homologue treated with hydrogen peroxide

Adam Labbé, Ramachander V.N. Turaga, Eric R. Paquet, Chantal Garand, and Michel Lebel*

Centre de Recherche en Cancérologie de l'Université Laval, Hôpital Hôtel-Dieu de Québec, Québec, Canada.

*Corresponding author.

Centre de Recherche en Cancérologie,
Hôpital Hôtel-Dieu de Québec, CHUQ, 9 McMahon St,
Québec, Québec G1R 2J6, Canada.

Phone: 418-691-5281

Fax: 418-691-5439

E-mail: michel.lebel@crhdq.ulaval.ca

Keywords: Werner Syndrome; Wrn mutant mouse model; Oxidative stress; Mitochondria; A.D.N. microarrays

Abstract

Background: Werner Syndrome (WS) is a rare disorder characterized by the premature onset of a number of age-related diseases. The gene responsible for WS encodes a DNA helicase/exonuclease protein believed to affect different aspects of transcription, replication, and/or DNA repair. In addition to genomic instability, human WS cells exhibit oxidative stress. In this report, we have examined the impact of exogenous hydrogen peroxide on the expression profile of mouse embryonic fibroblasts lacking part of the helicase domain of the *WRN* homologue (here referred to as *Wrn* ^{Δ hel/ Δ hel}).

Results : *Wrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mutant mouse embryonic fibroblasts exhibit increased oxidative stress. This was reflected by increased intracellular reactive oxygen species (ROS), increased oxidative damage in genomic DNA, changes in ATP/ADP ratios, and a disruption of the inner mitochondrial transmembrane potential when compared to wild type mouse embryonic fibroblasts. Expression profile analyses of hydrogen peroxide-treated wild type cells have indicated significant decreases in the expression of genes involved in mitosis, glycolysis, fatty acid metabolism, nucleic acid metabolism, and cell cycle control, as well as protein modification and stability. Such decreases in these biological processes were not observed in hydrogen peroxide-treated *Wrn* ^{Δ hel/ Δ hel} cells. Importantly, untreated *Wrn* ^{Δ hel/ Δ hel} cells already exhibited down regulation of several biological processes decreased in wild type cells that had been treated with hydrogen peroxide.

Conclusion: Expression profiling of *Wrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mutant cells revealed a very different response to exogenous addition of hydrogen peroxide in culture compared to wild type cells. This is due in part to the fact that *Wrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mutant cells already exhibited a modest chronic intracellular oxidative stress.

Background

It is well established that increased levels of reactive oxygen species (ROS) are involved in a number of diseases including diabetes, complications from obesity, atherosclerosis, and cancer [1-3]. A major source of endogenous ROS comes from the mitochondria during the process of oxidative phosphorylation to produce energy in the form of ATP. In addition, ROS are produced by intracellular membrane oxidases following stimulation either with platelet-derived growth factors, TNF- α , or insulin [1-3]. Inflammation is also a major source of ROS at sites of tissue fibrosis [1-3]. It is thus important for the cell to rapidly neutralize ROS before they can damage cellular macromolecules including DNA. A major DNA lesion generated by excessive ROS is 8-oxo-2'-deoxyguanosine, which leads to a single or double strand break when left unrepaired [4]. Persistent breaks can in turn lead to genomic instability. It is widely believed that the accumulation of mutations is a main cause of several aging processes [5]. In addition, oxidative stress is known to shorten telomeres [6] a process likely leading to replicative senescence and aging as well [7]. Thus, an abnormal response to constant increased levels of endogenous intracellular ROS would likely affect aging [8,9].

Some specific inherited monogenic diseases appear to modulate multiple aspects of aging. They are referred as segmental progeroid syndromes. A common feature of all progeroid syndromes is genomic instability. One such syndrome is Werner syndrome (WS) also known as "Progeria of the Adult" [10]. WS is an autosomal recessive disorder characterized by genomic instability and the premature onset of a number of age related diseases [11,12]. The gene responsible for WS (*WRN*) was identified by positional cloning and encodes a protein containing a RecQ-type helicase consensus domain [13]. It was subsequently found that, in addition to a 3'-5' helicase activity, the WRN protein also possesses a 3'-5' exonuclease activity [14,15]. It has been recently proposed that WRN protein may be required for the repair of oxidative DNA damage [16] including oxidative DNA damage at telomeres [17].

Remarkably, increased oxidative stress was described for WS patients [18]. Furthermore, human WS fibroblasts exhibit increased intracellular oxidized protein content [19]. Increased oxidative stress was also observed in embryonic cells derived from mice lacking part of the helicase domain [20]. In this study, we sought to determine the impact of

additional oxidative stress in mouse embryonic fibroblasts lacking part of the helicase domain of the *WRN* gene ortholog. Expression profiling analyses of *Wrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mutant cells revealed a very different response to addition of hydrogen peroxide in culture compared to wild type cells as they already exhibit a modest but significant chronic increase in intracellular ROS levels.

Methods

Primary mouse embryonic fibroblasts and RNA

Mice lacking part of the helicase domain of the *Wrn* gene were generated by homologous recombination in mouse embryonic stem cells [31]. In the process, 121 amino acid residues of the Wrn protein were deleted (amino acids 710 to 831). The genetic background of these mice was both 129/Sv and Black Swiss (129/Sv/Black Swiss genetic background). Care of mice was in accordance with the guidelines of the Committee for the protection of animals at the Université Laval. Generation and maintenance of the embryonic cells has been described previously [21]. Briefly, healthy 15.5-day old embryos were minced in 6-well plates and maintained in low glucose DMEM supplemented with 10% heat-inactivated calf serum at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. Adherent cells established from embryonic tissues were passaged as soon as they reached confluence. Cytoplasmic RNA was extracted according to standard protocols [36]. After DNase treatment and phenol:chloroform extraction, precipitated cytoplasmic RNA was dissolved in RNase-free water and purity was verified with an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA).

Microarray analysis

Duplicated biological RNA samples (wild type versus H₂O₂-treated wild type; *Wrn* ^{Δ hel/ Δ hel} versus H₂O₂-treated *Wrn* ^{Δ hel/ Δ hel} cells; wild type versus *Wrn* ^{Δ hel/ Δ hel}) were labeled with Cyanin-3 or -5 labeled CTP (PerkinElmer, Boston, MA). Labeled cRNAs were purified using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Mississauga, ON) and were hybridized onto Whole Mouse Genome Agilent 60-mer Oligo Microarrays (44,000 probes/microarray) using the in situ Hybridization Plus kit (Agilent, Palo Alto, CA) following the manufacturer's instructions. Arrays were scanned using a dual-laser DNA microarray scanner. Data were

then extracted from images by the Feature Extraction software 6.1 (Agilent, Palo Alto, CA). Lists of differentially expressed genes were generated using limma in BioConductor <http://www.bioconductor.org>. The data were background subtracted and normalized using the loess method. Correction for multiple hypothesis testing was performed using the Benjamini-Hochberg method. We have deposited all the raw data in the NCBI public database Gene Expression Omnibus <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> [accession series number [GSE19007](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE19007)].

Bioinformatic analyses

The PANTHER (Protein ANALysis THrough Evolutionary Relationships) classification system is a unique resource that classifies genes by their functions, using published scientific experimental evidence and evolutionary relationships to predict function even in the absence of direct experimental evidence. Proteins are classified by expert biologists into families and subfamilies of shared function, which are then categorized by molecular function and biological process ontology terms. This program is implemented in the DAVID (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery) web site [37]. Enrichments for specific biological functions using PANTHER were considered significant with a Benjamini value smaller than 0.05. The Benjamini value corresponds to an adjusted *p*-value using the Benjamini-Hochberg method to correct for multiple hypotheses tested during gene enrichment analyses.

Measurements of reactive oxygen species

Mouse embryonic fibroblasts were incubated with 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of the dye 2'-7' dichlorofluorescein diacetate (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON) for one hour at 37°C. This dye is highly fluorescent upon oxidation. After this incubation time, cells were harvested and lysed in RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate] for 10 minutes. Cell debris were spun down and 100 μl of lysate was transferred to 96-well plates for fluorescence measurements with a Fluoroskan Ascent fluorescence spectrophotometer (Thermo Electron Inc., Milford, MA). The excitation and emission wavelengths used were 485 nm and 527 nm, respectively. The

final result was expressed as units of fluorescence per μg of proteins. Protein concentrations were measured using the Bradford assay.

Measurements of oxidative DNA damage

DNA was extracted from mouse embryonic fibroblasts with the DNeasy Tissue Kit (Qiagen Inc., Mississauga, ON) according to the manufacturer's protocol. Abasic sites in genomic DNA were quantified with the Oxidative DNA Damage Kit from Kamiya Biomedical Company (Seattle, WA). Briefly, this kit contains an aldehyde reactive reagent (N'-aminooxymethylcarbonylhydrazino-D-biotin), which reacts with the open ring form of apurinic sites in DNA. Oxidative attack by hydroxyl radicals on the deoxyribose moiety will lead to the release of free bases from DNA, generating abasic or apurinic sites. The aldehyde reagent will thus tag apurinic sites with biotin. The number of biotin-tagged apurinic sites was quantified using conjugated avidin-horse radish peroxidase followed by a colorimetric detection of peroxidase.

Measurements of reduced glutathione

Intracellular levels of glutathione (GSH) were quantified with the ApoGSH Glutathione Detection Kit from Bio Vision (Mountain View, CA). The assay utilizes monochlorobimane (MCB), a dye that appears to form adducts exclusively with GSH. The GSH-bound MCB dye fluoresces blue. Fluorescence was measured with a Fluoroskan Ascent fluorescence spectrophotometer (Thermo Electron Inc., Milford, MA). The excitation and emission wavelengths used were 355 nm and 460 nm, respectively.

Measurements of ATP and ADP

Intracellular levels of ATP and ADP were quantified with the ApoSensor ADP/ATP ratio assay kit from Bio Vision (Mountain View, CA). The assay utilizes the enzyme luciferase to catalyze the formation of light from ATP and luciferin. ADP levels are measured by conversion to ATP that is subsequently detected using the same reaction. Luminescence was measured with a Luminoskan Ascent luminometer (Thermo Electron Inc., Milford, MA).

Measurements of inner mitochondrial transmembrane potential

The inner mitochondrial transmembrane potential of mouse embryonic fibroblasts was determined using tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE). Cells were incubated in a culture medium containing 100 μ M TMRE for 15 min in the dark at 37°C. Fresh medium was then added after washing cells twice with PBS to remove extracellular TMRE. Cells were harvested and fluorescence intensity of TMRE was detected with a Fluoroskan Ascent fluorescence spectrophotometer (Thermo Electron Inc., Milford, MA). The excitation and emission wavelengths used were 544 nm and 590 nm, respectively.

Statistical analysis

Data are presented as means \pm SEM. The unpaired Student's *t*-tests were all performed using two-tailed hypothesis and equal variance. Differences between classes were considered significant at *P*-value lower than 0.05 in all statistical analyses. All statistical analyses were performed with R version 2.6.0 <http://www.r-project.org>.

Results

Oxidative stress in *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mouse embryonic fibroblasts

Previous data have indicated that *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mouse embryonic fibroblasts acquire a slower growth rate than wild type fibroblasts with the number of passages in culture [21]. In addition, *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mutant cells exhibit increased chromosomal rearrangements with the number of passages in culture [22]. As oxidative DNA damage can lead to chromosomal rearrangements, levels of intracellular ROS and the extent of oxidative DNA damage were measured in wild type and *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} embryonic fibroblasts. Intracellular ROS levels were examined directly in mouse embryonic fibroblasts with the dye 2'-7' dichlorofluorescein diacetate. This dye is highly fluorescent upon oxidation. Cells in the presence of the dye were lysed and the extent of fluorescence released from cells was measured with a fluorescence spectrophotometer as described previously [23]. As shown in Figure 1A, ROS levels were 10% higher in *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} cells (*t*-test; *P* < 0.05) compared to wild type cells. Concomitantly, there were on average 51 abasic sites per pg of genomic

DNA in wild type cells and 64 abasic sites per pg of genomic DNA in $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ cells, a 20% increase in the mutant cells (t -test; $P < 0.05$) (Figure (Figure1B).1B). These results indicate that $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ cells exhibit a modest but significant increase in oxidative stress.

Since a cellular redox change may decrease energy production in the form of ATP from mitochondria, we next examined intracellular ATP levels and mitochondrial membrane potential. As shown in Figure Figure1C,1C, the ATP level in $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mutant cells was 30% lower than wild type cells. Consequently, the ADP/ATP ratio in $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ cells was approximately 30% higher than wild type cells (Figure (Figure1D).1D). A lower ATP production might be a consequence of disruption of the inner mitochondrial transmembrane potential in mutant cells. The mitochondrial membrane potential was thus examined in our mouse embryonic fibroblasts with the fluorescent dye tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) As indicated in Figure Figure1E,1E, fluorescence intensity was 30% lower in $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ cells compared to wild type cells (t -test; $P < 0.03$). Taken together, these results indicate a disturbance of mitochondrial activities in $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mutant cells.

Glutathione (GSH) is the principal intracellular low-molecular-weight thiol and it plays a critical role in the defense against oxidative stress in mammalian cells. We wanted to know whether the abundance of this molecule is affected in mutant cells. Levels of GSH were thus quantified in our mouse wild type and $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mutant embryonic fibroblasts. Remarkably, levels of GSH were 151% higher in $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mutant cells compared to wild type cells (t -test; $P < 0.001$) (Figure (Figure2).2). These results suggest that $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mutant cells display an adaptive response to oxidative stress. This response was further examined by treating cells with exogenous H_2O_2 . Cells were treated one hour with 0.5 mM H_2O_2 and GSH levels were measured 24 hours later. As indicated in Figure Figure2,2, H_2O_2 induced a 178% increase in GSH levels in wild type cells (t -test; $P < 0.001$). There was no significant increase in GSH levels in $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mutant cells. As indicated above GSH levels were already high in untreated $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ cells. These results indicate that $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mutant cells continuously exhibited an increased anti-oxidant response.

Expression profiling of mouse embryonic fibroblasts treated with H₂O₂

Little is known about the global response to H₂O₂ in wild type and *Wrn*^{Δhel/Δhel} mouse embryonic fibroblasts. To compile a list of H₂O₂-responsive genes, we compared wild type cells before and after oxidative cellular stress. Cells were treated with H₂O₂ for one hour, fed with fresh media, and cytoplasmic RNA was harvested 24 hours later. Hybridization was performed on Whole Mouse Genome Agilent 60-mer Oligo Microarray chips (containing approximately 44,000 probes) by mixing wild type Cy-3-labeled cRNA (baseline expression levels) with H₂O₂-treated wild type Cy-5-labeled cRNA. Hybridization experiments were performed twice with different wild type biological replicates. The same strategy was adopted for *Wrn*^{Δhel/Δhel} mutant cells. Hybridization was performed by mixing untreated *Wrn*^{Δhel/Δhel} mutant Cy-3-labeled cRNA with H₂O₂-treated *Wrn*^{Δhel/Δhel} Cy-5-labeled cRNA.

Lists of genes differentially expressed were generated by requiring that the absolute value of the fold change be higher than two, that the log₂ of the expression level (or signal) for each gene be higher than six, and the adjusted *P*-value, using the Benjamini-Hochberg method, be lower than 0.005. Six hundred and seventy eight genes exhibited a two-fold alteration in mRNA expression level in H₂O₂-treated wild type mouse embryonic fibroblasts compared to untreated wild type cells (548 down-regulated and 130 up-regulated, respectively) (additional file 1). Four hundred and twenty one genes exhibited a two-fold alteration in expression in H₂O₂-treated *Wrn*^{Δhel/Δhel} mouse embryonic fibroblasts compared to untreated *Wrn*^{Δhel/Δhel} cells (368 down-regulated and 53 up-regulated, respectively) (additional file 2). One hundred and seventy five genes were altered in both H₂O₂-treated wild type and *Wrn*^{Δhel/Δhel} mouse embryonic fibroblasts (Figure (Figure3A3A and additional file 3).

Real time RT-PCR was performed on seven randomly picked genes from the untreated versus H₂O₂-treated wild type mouse embryonic fibroblasts data (additional file 1) to confirm our microarray analyses (Table (Table1).1). A list of the primers for the genes analyzed is shown in the additional file 4. Overall, the fold changes observed by real time RT-PCR were in good agreement with the predicted fold changes from the microarray data highlighted by a significant Spearman's correlation ($\rho = 0.9286$; $P = 0.0067$).

The PANTHER classification system was used to classify differentially expressed genes by their functions in specific biological processes. Categorization of the genes in our lists revealed 23 and 5 significantly down regulated biological processes (with a Benjamini value of less than 0.05) for wild type and *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mouse embryonic fibroblasts treated with H₂O₂, respectively (Figure (Figure3).3). Four processes were commonly down regulated in wild type and *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mouse embryonic fibroblasts treated with H₂O₂ and they include genes involved in cation transport, chromatin remodeling, cell motility, and developmental processes (or cellular differentiation) (Figure (Figure3B3B and and3C).3C). The only additional biological process that was down regulated in *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mouse embryonic fibroblasts corresponded to the cellular defense response requiring antigen presentation during major histo-compatibility complex II molecule (MHCII)-mediated immunity. Wild type mouse embryonic fibroblasts treated with H₂O₂ also exhibited decreases in biological pathways affecting protein and vesicle transportation, cell surface mediated signal transduction, cell cycle and proliferation, nucleic acid metabolism, several types of protein modification and folding, proteolysis, glycolysis, and mitosis (Figure (Figure3C).3C). Finally, based on PANTHER analysis no biological pathway was significantly up regulated in either H₂O₂-treated wild type or H₂O₂-treated *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mouse embryonic fibroblasts.

Several biological processes are already decreased in untreated *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mouse embryonic fibroblasts

We also performed PANTHER analysis on the list of genes differentially expressed between untreated wild type and untreated *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mouse embryonic fibroblasts. Differentially expressed genes between *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} and wild type mouse embryonic fibroblasts were selected by requiring that the log₂ of the expression level for each gene be higher than six and the adjusted *P*-value, using the Benjamini-Hochberg method, be lower than 0.005 (additional file 5). Figure Figure4A4A indicates that biological processes such as protein folding, protein metabolism and modification, proteolysis, G-protein-mediated signaling, cation transport, and developmental processes were significantly down regulated in *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mouse embryonic fibroblasts compared to wild type cells (with a Benjamini

value < 0.05). Purine metabolisms, as well as amino acid metabolism and biosynthesis processes, were up regulated in *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mouse embryonic fibroblasts compared to wild type cells. These results indicate that all the biological processes down regulated in untreated *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mouse embryonic fibroblasts (compared to untreated wild type cells) were also down regulated in H₂O₂-treated wild type mouse embryonic fibroblasts (Figure (Figure4B4B)).

Discussion

We have previously observed increased oxidative stress in mouse embryonic fibroblasts established from *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mice compared to wild type cells [20]. In this study, we further explored this phenotype by examining the expression profile of such cells. *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mutant cell lines exhibited a 10% increase in ROS levels compared to wild type cells (baseline level). Importantly, the high levels of GSH in *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mutant cells confirmed indirectly the increased oxidative stress in such cells. In fact, GSH levels in *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mutant cells were almost as high as wild type cells that had been treated with exogenous H₂O₂ (Figure (Figure2).2). Further analysis of cells with the potentiometric dye TMRE has indicated a lower mitochondrial transmembrane potential in *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mutant cells. At the same time, we detected a lower amount of ATP in the mutant cells compared to wild type cells. Production of lower quantities of ATP by mitochondria may in part be responsible for the slow growth phenotype associated with *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} cells [20]. The increase in ROS concomitant with the high levels of GSH and the lower energy production (ATP) by mitochondria in *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mouse embryonic fibroblasts are consistent with the phenotypes observed in the liver tissue of *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mice [24]. *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mice exhibit increased GSH levels in liver tissue with increased ROS, DNA damage and decrease ATP levels with age. These results suggest that the observed anomalies in the *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mice are observable at the cellular level with mouse embryonic fibroblasts in culture. Such results suggest that cells in a given tissue already exhibit a modest but chronic intracellular pro-oxidative status. In accord with this, a pro-oxidative status has been described for WS patients [18].

Our prediction was that an exogenous addition of ROS to *Wrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mutant cells would exacerbate the intracellular metabolic anomalies and damage as the anti-oxidative system of such cells is already saturated (at least for the GSH system) while coping with a chronic higher intracellular level of ROS. The results obtained with mouse embryonic fibroblasts treated with an exogenous source of H₂O₂ are highly relevant since additional ROS at the tissue level may follow each meal due to increased sugar and lipid levels in the blood stream after ingestion. Increased sugar and lipids will potentially impact on the cellular redox status of cells in several tissues [25,26].

The impact of H₂O₂ on the expression profile of *Wrn* mutant cells has not been previously analyzed. Microarray analyses indicated that *Wrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mouse embryonic fibroblasts respond very differently from wild type cells to exogenous H₂O₂. These results are consistent with the observation that human WS cells respond differently to H₂O₂ when compared to cells with a functional WRN gene product [27,28]. Again, this difference maybe due to the fact that cells with a mutation in the *Wrn* gene are already exhibiting chronic increased oxidative stress in culture [20,29]. Significant decreases in the expression of genes involved in mitosis, glycolysis and fatty acid metabolism (energy production), nucleic acid metabolism, cell cycle control, as well as protein modification and stability were observed in H₂O₂-treated wild type embryonic fibroblasts. Such dramatic decreases in these biological processes were not observed in H₂O₂-treated *Wrn* ^{Δ hel/ Δ hel} cells. Interestingly, untreated *Wrn* ^{Δ hel/ Δ hel} cells already exhibited changes in several of these biological processes before the addition of H₂O₂ suggesting again a chronic oxidative stress in these mutant cells. A likely deleterious consequence of responding differently to additional ROS is a greater increase in the presence of persistent DNA breaks and the rapid accumulation of chromosome rearrangements compared to wild type mouse embryonic fibroblasts [22].

The International Registry of Werner Syndrome <http://www.wernersyndrome.org> has provided molecular diagnosis of WS for over a decade. Fifty distinct mutations inactivating the WRN protein have been described in WS patients to date [30]. These mutations include missense and nonsense substitutions, frame shifts and premature translation termination mutations, deletions and insertions. All these mutations are believed to disrupt the normal function of WRN protein or to cause a truncation of the protein that cannot localize to the nucleus, the normal site of WRN protein action. Some mutations also cause abnormally

rapid degradation of the WRN protein. Our mouse model has an in-frame deletion in the helicase domain of the *Wrn* protein, which is as stable as the normal protein [31]. However, the mutant protein does not stably interact with the DNA replication complex [32] suggesting that this mutation in mouse severely affects the overall function of the mutant *Wrn* protein. Although thorough biochemical analyses of this mutant protein are required, the *Wrn* helicase mutant mice provide a compelling model as they exhibit most metabolic abnormalities observed in human WS patients [23,24].

Conclusion

To conclude, untreated *Wrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mutant cells exhibit increased ROS generation due to alterations in mitochondrial activities. The exact reason for such mitochondrial alterations is unknown but mitochondrial dysfunction is well known to lead to physiological decline with age [9]. We recently observed that a transient knock down of WRN protein in human fibroblasts is sufficient to change the expression of genes involved in lipidogenesis [33]. Such changes are known to affect the redox status in cells, which in turn affects mitochondrial function [34]. Interestingly, we have also observed that *Wrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mutant mice exhibit increased rate of point mutations in the mitochondrial DNA of liver and heart tissues [24], which can potentially lead to further mitochondrial dysfunction with age. Finally, a transient knock down of WRN in human fibroblasts will increase the activity of several protein kinase C enzymes including PKC δ [29]. PKC δ is known to modulate ROS production from mitochondria [35]. Hence, there is the interesting possibility that depletion of WRN activates PKC δ , which in turn modulates ROS production from mitochondria. Indeed, a decreased production of ROS in WRN-depleted fibroblasts can be observed by knocking down PKC δ protein levels in such cells. Future appropriate experiments will determine which pathways, transcription regulation of specific metabolic genes or activation of specific kinases, are responsible for the redox imbalance seen in human WRN mutant or mouse *Wrn* ^{Δ hel/ Δ hel} cells.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. D. Batchvarov for helpful comments on the microarray analyses. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research to M.L. M.L. is a senior scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Figures

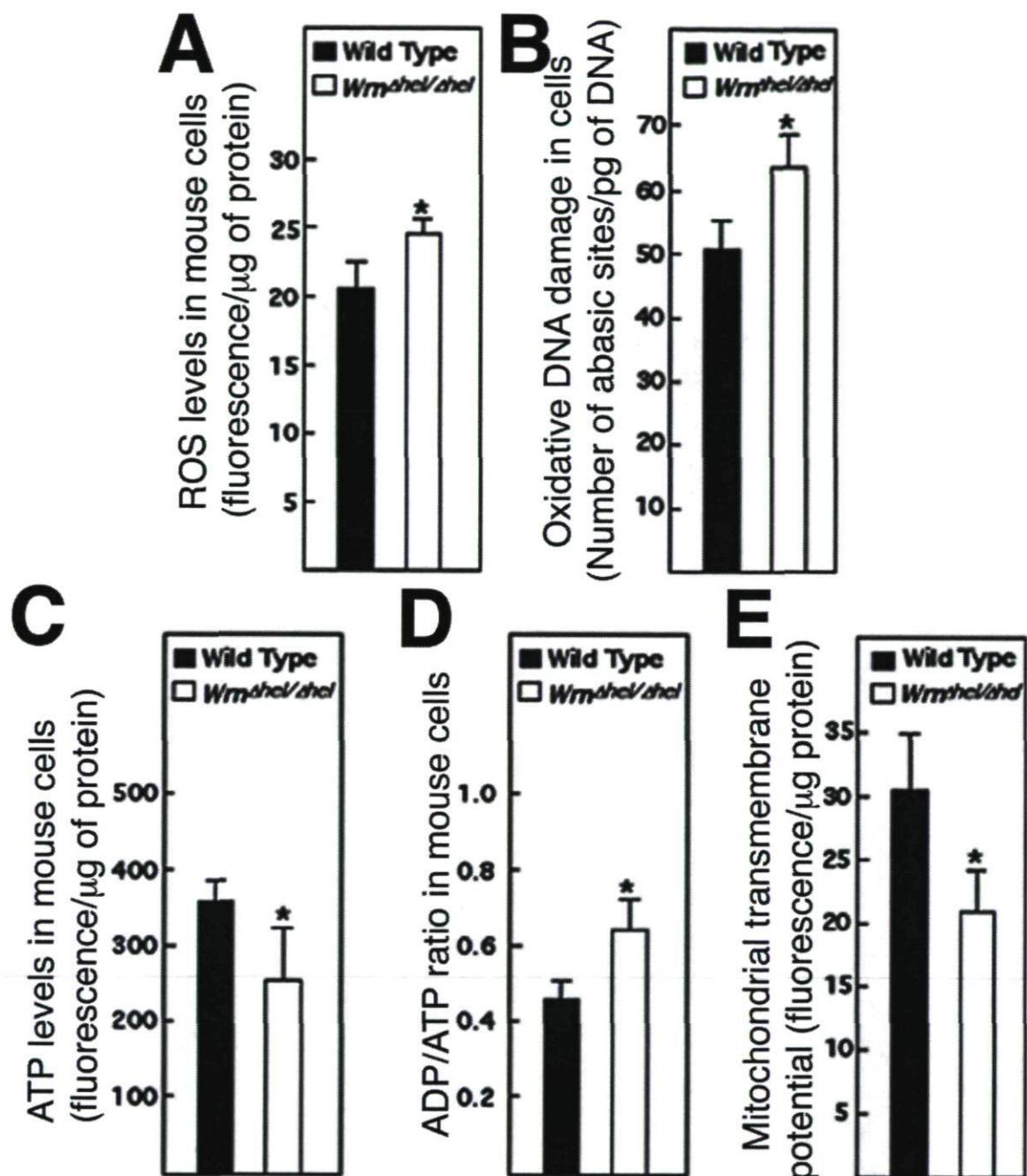


Figure 1. Increased oxidative stress in mutant mouse embryonic cells. (A) Reactive oxygen species (ROS) levels in wild type and *Wrrn $\Delta\text{hel}/\Delta\text{hel}$* cells determined by measuring the intensity of fluorescence by 2',7'-dichlorofluorescein per μg of protein in cells. Asterisks denote statistical significance compared to wild type cells (**t*-test: $P < 0.05$). (B) Oxidative

DNA lesions created by ROS in wild type and *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} cell cultures. The number of abasic sites per pg of genomic DNA was detected as described in Materials and Methods. The asterisk denotes statistical significance compared to wild type cells (**t*-test: $P < 0.05$). (C) ATP levels in wild type and *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} cells. Asterisks denote statistical significance compared to wild type cells (**t*-test: $P < 0.05$). (D) ADP/ATP ratios in wild type and *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} cells. Asterisks denote statistical significance compared to wild type cells (**t*-test: $P < 0.05$). (E) Inner mitochondrial transmembrane potential in wild type and *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} cells. Mitochondrial membrane potential was measured with the potentiometric dye TMRE. Asterisks denote statistical significance compared to wild type cells (**t*-test: $P < 0.03$). All experiments in this figure were performed in quadruplicates.

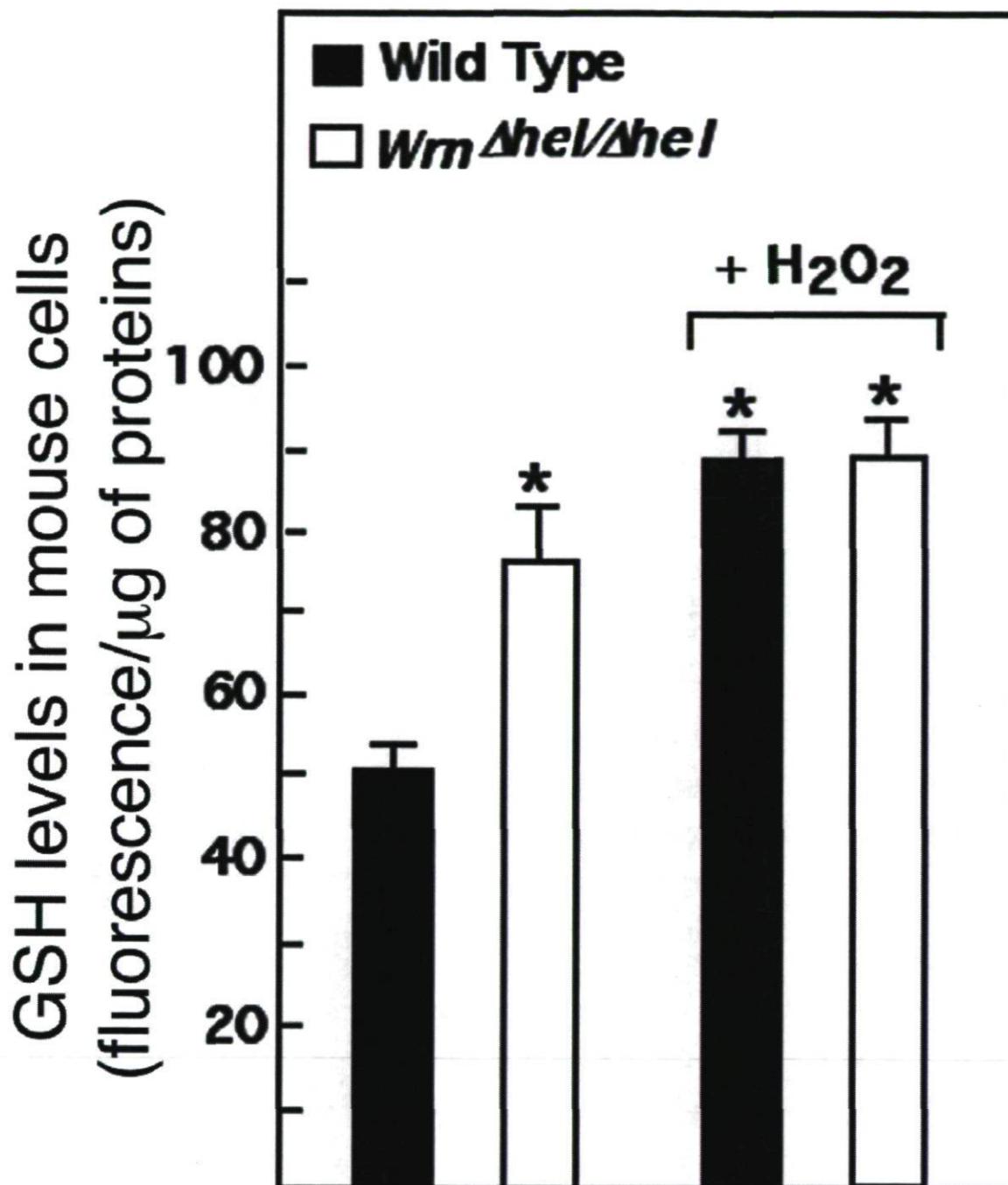


Figure 2. Reduced glutathione (GSH) levels in H₂O₂-treated and untreated wild type and *Wrm^{Δhel/Δhel}* cells determined by the intensity of fluorescence per μg of protein. Fluorescence of reduced GSH was detected with the ApoGSH glutathione detection kit. Oxidative stress was induced by treating cells with 0.5 mM H₂O₂ one hour and fresh media was then added for an additional 24 hours to allow the cells to recover before measurements.

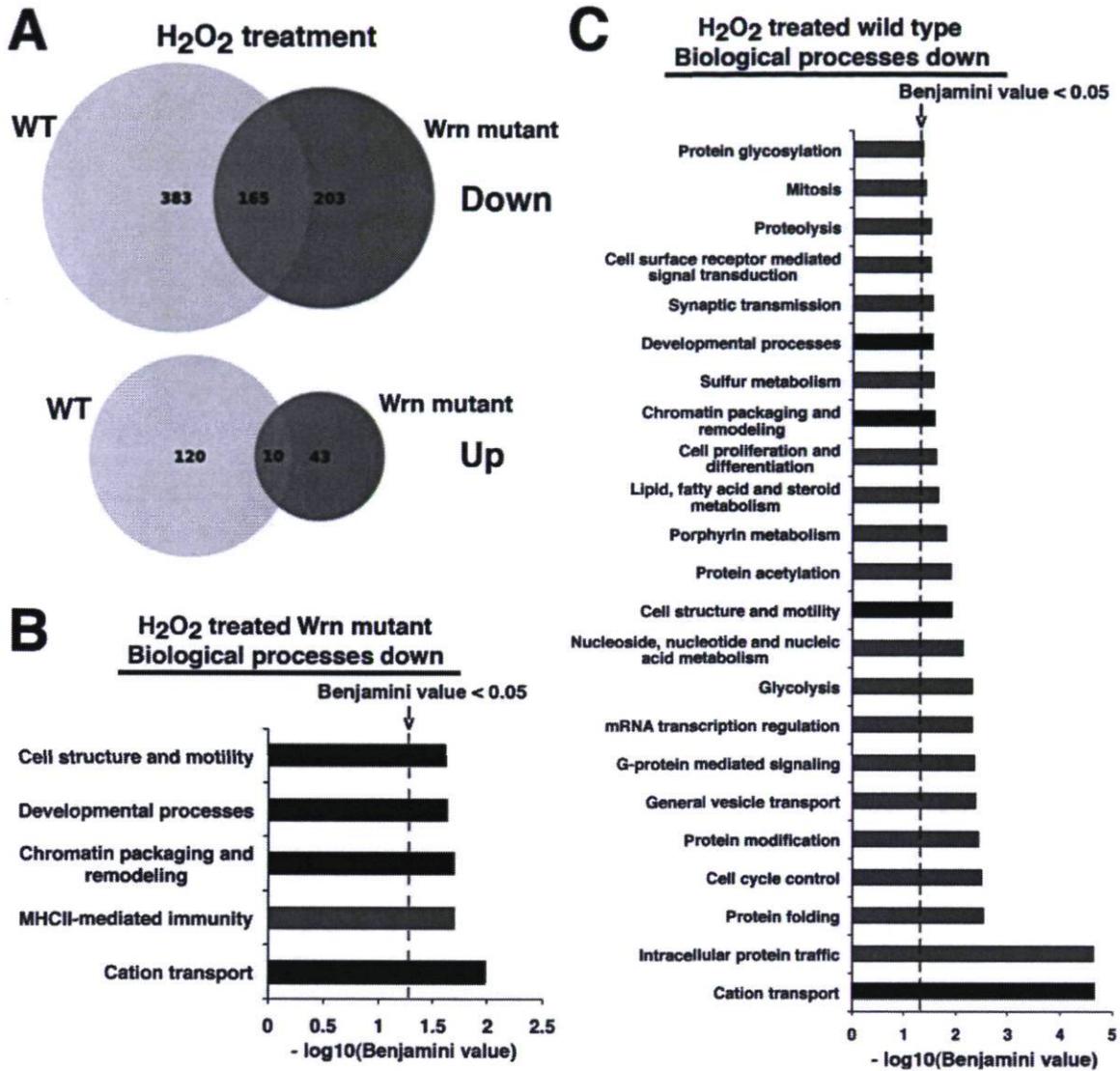


Figure 3. Distinct biological processes significantly altered by H_2O_2 in $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ and wild type mouse embryonic fibroblasts. A) Venn diagrams showing the number of genes overlapping between $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ and wild type mouse embryonic fibroblasts treated with H_2O_2 . B) Histogram representing all the biological processes significantly down regulated by H_2O_2 in $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mouse embryonic fibroblasts. C) Histogram representing all the biological processes significantly down regulated by H_2O_2 in wild type mouse embryonic fibroblasts. Biological processes with a Benjamini value less than 0.05 are presented in each histogram. The black bars in each histogram represent the cellular processes commonly affected in both $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ and wild type mouse embryonic fibroblasts.

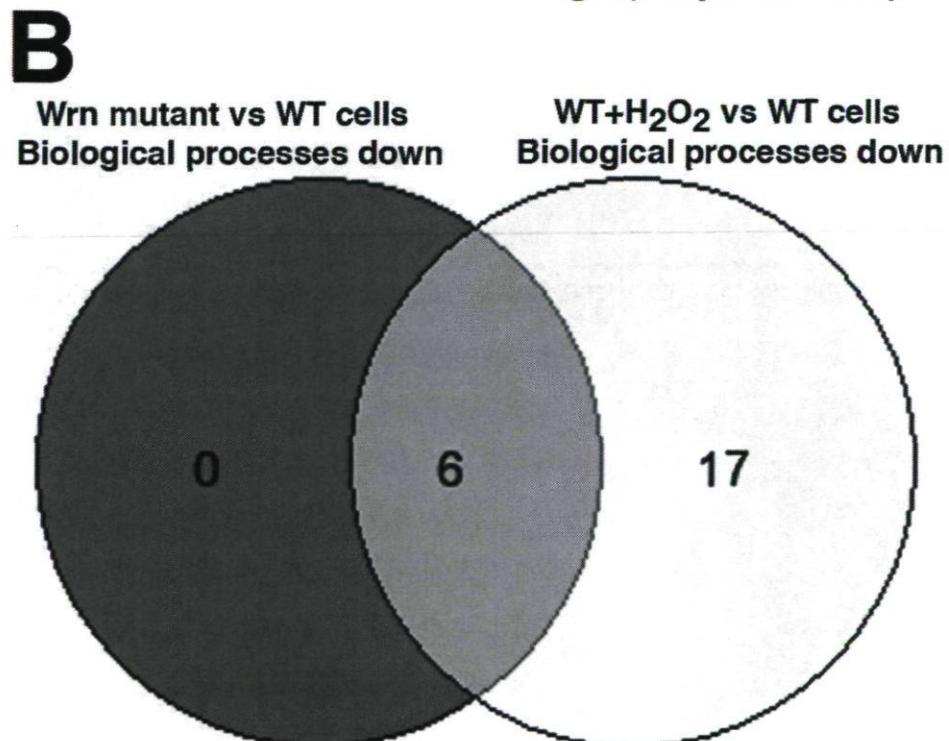
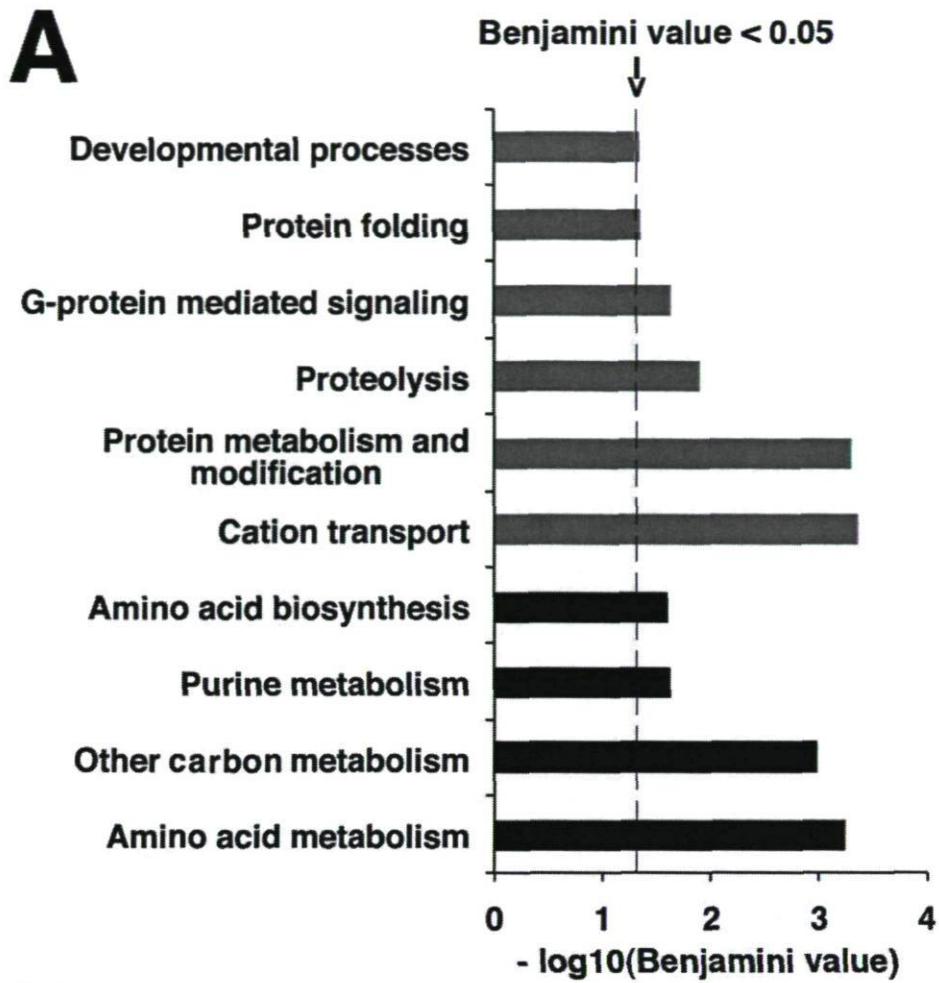


Figure 4. Histogram indicating the major biological processes in *Wrrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mouse embryonic fibroblasts significantly changed compared to wild type cells (no treatment). The biological processes with a Benjamini value less than 0.05 are presented. The black and gray bars represent the up and down regulated cellular processes, respectively.

Table 1. Correlation of the real time RT-PCR derived values with the microarray data from wild type mouse embryonic fibroblasts treated with peroxide.

Gene	Fold change in microarray	Fold change from RT-PCR
Ero1l	2.84	2.76
(endoplasmic reticulum oxidoreductase 1-like)		
Fn1	-2.19	-1.45
(fibronectin-1)		
Mt1	2.25	1.71
(metallothionein-1)		
Mt2	3.98	2.35
(metallothionein-2)		
Nqo1	2.68	1.65
(NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1)		
Txnrd1	2.06	1.63
(thioredoxin reductase 1)		
Uchl1	3.72	7.97
(ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1)		

Spearman's correlation between microarray and RT-PCR data: $\rho=0.9286$; p -value=0.0067

Table S3. Primers used for real time RT-PCR

Fn1fwd	5'-AATGGAAAAGGGGAATGGAC-3'
Fn1rev	5'-ACCATCATCCAGCCTTGGTA-3'
Txnrd1fwd	5'-TGTCACACCGACTCCTCTTG-3'
Txnrd1rev	5'-CCATAGTTGCGCGAGTCTTT-3'
Ngol1fwd	5'-GGTAGCGGCTCCATGTACTC-3'
Ngol1rev	5'-AGACCTGGAAGCCACAGAAA-3'
Ero11fwd	5'-CTTCAGTGGACCAAGCATGA-3'
Ero11rev	5'-GCCCCTTGTAGCCTGTGTAG-3'
Uchl1fwd	5'-GACCATCGGAAACTCCTGTG-3'
Uchl1rev	5'-GGACAGCTTCTCCGTTTCAG-3'
Mt1fwd	5'-CTCCGTAGCTCCAGCTTCAC-3'
Mt1rev	5'-AGGTGCACTTGCAGTTCTTG-3'
Mt2fwd	5'-CCGATCTCTCGTCGATCTTC-3'
Mt2rev	5'-CATTGCAATTGTTTGCATTTG-3'

PCR conditions on cDNA

10 min 95°C 1 cycle

15 sec 95°C, 30 sec 59°C, 30 sec 72°C 40 cycles

REFERENCES

1. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*. 2002;**23**:599–622. doi: 10.1210/er.2001-0039. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
2. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*. 2004;**114**:1752–1761. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
3. Martin J, Kelly DJ, Mifsud SA, Zhang Y, Cox AJ, See F, Krum H, Wilkinson-Berka J, Gilbert RE. Tranilast attenuates cardiac matrix deposition in experimental diabetes: role of transforming growth factor-beta. *Cardiovascular Research*. 2005;**65**:694–701. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.10.041. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
4. Barzilai A, Yamamoto KI. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amsterdam)* 2004;**3**:1109–1115. doi: 10.1016/j.dnarep.2004.03.002. [[Cross Ref](#)]
5. Hasty P, Campisi J, Hoeijmakers J, van Steeg H, Vijg J. Aging and genome maintenance: lessons from the mouse? *Science*. 2003;**299**:1355–1359. doi: 10.1126/science.1079161. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
6. von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in Biochemical Sciences*. 2002;**27**:339–344. doi: 10.1016/S0968-0004(02)02110-2. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
7. Kipling D, Davis T, Ostler EL, Faragher RG. What can progeroid syndromes tell us about human aging? *Science*. 2004;**305**:1426–1431. doi: 10.1126/science.1102587. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
8. Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, Forster MJ, Lal H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mechanisms of Ageing and Development*. 1994;**74**:121–133. doi: 10.1016/0047-6374(94)90104-X. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]

9. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*. 1998;**78**:547–581. [[PubMed](#)]
10. Martin GM. mutagenesis and antimutagenesis in aging research. *Mutation Research*. 1996;**350**:35–41. [[PubMed](#)]
11. Epstein CJ, Martin GM, Schultz AL, Motulsky AG. Werner's syndrome a review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process. *Medecine*. 1966;**45**:177–221.
12. Sato K, Goto M, Nishioka K, Arima K, Hori N, Yamashita N, Fujimoto Y, Nanko H, Ohara K, Ohara K. Werner's syndrome associated with malignancies: five case reports with a survey of case histories in Japan. *Gerontology*. 1988;**34**:212–218. doi: 10.1159/000212956. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
13. Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama F, Alisch R, Matthews S, Nakura J, Miki T, Ouais S, Martin GM, Mulligan J, Schellenberg GD. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science*. 1996;**2**:258–262. doi: 10.1126/science.272.5259.258. [[Cross Ref](#)]
14. Shen JC, Gray MD, Oshima J, Kamath-Loeb AS, Fry M, Loeb LA. Werner syndrome protein. I. DNA helicase and dna exonuclease reside on the same polypeptide. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998;**273**:34139–34144. doi: 10.1074/jbc.273.51.34139. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
15. Kamath-Loeb As, Shen JC, Loeb LA, Fry M. Werner syndrome protein. II. Characterization of the integral 3' --> 5' DNA exonuclease. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998;**273**:34145–34150. doi: 10.1074/jbc.273.51.34145. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
16. Ahn B, Harrigan JA, Indig FE, Wilson DM, Bohr VA. Regulation of WRN helicase activity in human base excision repair. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;**279**:53465–53474. doi: 10.1074/jbc.M409624200. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
17. Ghosh A, Rossi ML, Aulds J, Croteau D, Bohr VA. Telomeric D-loops containing 8-oxo-2'-deoxyguanosine are preferred substrates for Werner and Bloom syndrome helicases and are bound by POT1. *The Journal of Biological Chemistry*.

- 2009;**284**:31074–31084. doi: 10.1074/jbc.M109.027532. [[PMC free article](#)]
[[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
18. Pagano G, Zatterale A, Degan P, d'Ischia M, Kelly FJ, Pallardó FV, Calzone R, Castello G, Dunster C, Giudice A, Kilinç Y, Lloret A, Manini P, Masella R, Vuttariello E, Warnau M. In vivo prooxidant state in Werner syndrome (WS): results from three WS patients and two WS heterozygotes. *Free Radical Research*. 2005;**39**:529–533. doi: 10.1080/10715760500092683. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
 19. Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. Age-related changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1987;**262**:5488–5491. [[PubMed](#)]
 20. Deschênes F, Massip L, Garand C, Lebel M. In vivo misregulation of genes involved in apoptosis, development and oxidative stress in mice lacking both functional Werner syndrome protein and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Human Molecular Genetics*. 2005;**14**:3293–3308. doi: 10.1093/hmg/ddi362. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
 21. Lebel M, Lavoie J, Gaudreault I, Bronsard M, Drouin R. Genetic cooperation between the Werner syndrome protein and poly(ADP-ribose) polymerase-1 in preventing chromatid breaks, complex chromosomal rearrangements, and cancer in mice. *The American Journal of Pathology*. 2003;**162**:1559–1569. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
 22. Lavoie J, Carter R, Drouin R, Lebel M. Increased frequency of multiradial chromosome structures in mouse embryonic fibroblasts lacking functional Werner syndrome protein and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2005;**156**:134–143. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2004.05.005. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
 23. Massip L, Garand C, Turaga RVN, Deschênes F, Thorin E, Lebel M. Increased insulin, triglycerides, reactive oxygen species, and cardiac fibrosis in mice with a mutation in the helicase domain of the Werner Syndrome gene homologue. *Experimental Gerontology*. 2006;**41**:157–168. doi: 10.1016/j.exger.2005.10.011. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]

24. Massip L, Garand C, Paquet ER, Cogger VC, O'Reilly JN, Tworek L, Hatherell A, Taylor CG, Thorin E, Zahradka P, Le Couteur DG, Lebel M. Vitamin C restores healthy aging in a mouse model for Werner syndrome. *The FASEB Journal*. 2009;**24**:158–172. doi: 10.1096/fj.09-137133. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
25. Ragheb R, Shanab GM, Medhat AM, Seoudi DM, Adeli K, Fantus IG. Free fatty acid-induced muscle insulin resistance and glucose uptake dysfunction: evidence for PKC activation and oxidative stress-activated signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009;**389**:211–216. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.08.106. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
26. Fu JH, Sun HS, Wang Y, Zheng WQ, Shi ZY, Wang QJ. The Effects of a Fat- and Sugar-Enriched Diet and Chronic Stress on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Male Wistar Rats. *Digestive Diseases and Sciences*. 2009. in press . [[PubMed](#)]
27. de Magalhães JP, Migeot V, Mainfroid V, de Longueville F, Remacle J, Toussaint O. No increase in senescence-associated beta-galactosidase activity in Werner syndrome fibroblasts after exposure to H₂O₂. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;**1019**:375–378. doi: 10.1196/annals.1297.066. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
28. von Kobbe C, May A, Grandori C, Bohr VA. Werner syndrome cells escape hydrogen peroxide-induced cell proliferation arrest. *The FASEB Journal*. 2004;**18**:1970–1972. [[PubMed](#)]
29. Massip L, Garand C, Labbé A, Perreault E, Turaga RVN, Bohr VA, Lebel M. Depletion of WRN protein causes RACK1 to activate several protein kinase C isoforms. *Oncogene*. 2009. in press . [[PubMed](#)]
30. Huang S, Lee L, Hanson NB, Lenaerts C, Hoehn H, Poot M, Rubin CD, Chen DF, Yang CC, Juch H, Dorn T, Spiegel R, Oral EA, Abid M, Battisti C, Lucci-Cordisco E, Neri G, Steed EH, Kidd A, Isley W, Showalter D, Vittone JL, Konstantinow A, Ring J, Meyer P, Wenger SL, von Herbay A, Wollina U, Schuelke M, Huizenga CR, Leistritz DF, Martin GM, Mian IS, Oshima J. The Spectrum of *WRN* Mutations in Werner Syndrome Patients. *Human Mutations*. 2006;**27**:558–567. doi: 10.1002/humu.20337. [[Cross Ref](#)]

31. Lebel M, Leder P. A deletion within the murine Werner syndrome helicase induces sensitivity to inhibitors of topoisomerase and loss of cellular proliferative capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;**95**:13097–13102. doi: 10.1073/pnas.95.22.13097. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
32. Lebel M, Spillare EA, Harris CC, Leder P. Werner syndrome gene product copurifies with the DNA replication complex and interact with PCNA and topoisomerase I. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;**274**:37795–37799. doi: 10.1074/jbc.274.53.37795. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
33. Turaga RV, Paquet ER, Sild M, Vignard J, Garand C, Johnson FB, Masson JY, Lebel M. The Werner syndrome protein affects the expression of genes involved in adipogenesis and inflammation in addition to cell cycle and DNA damage responses. *Cell cycle*. 2009;**8**:2080–2092. [[PubMed](#)]
34. Graier WF, Malli R, Kostner GM. Mitochondrial protein phosphorylation: instigator or target of lipotoxicity? *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2009;**20**:186–193. doi: 10.1016/j.tem.2009.01.004. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
35. Kohda Y, Gemba M. Cephaloridine induces translocation of protein kinase C delta into mitochondria and enhances mitochondrial generation of free radicals in the kidney cortex of rats causing renal dysfunction. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2005;**98**:49–57. doi: 10.1254/jphs.FP0040926. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
36. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
37. Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biology*. 2003;**4**:P3. doi: 10.1186/gb-2003-4-5-p3. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]

CHAPITRE 3

3.1 DISCUSSION

Les résultats observés quant au niveau d'EROs plus élevé dans les FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ que dans les FSEs TS vont dans le sens des observations faites dans le foie de souris $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ par rapport à celles faites dans le foie de souris TS. Or, nous savons que les personnes atteintes du SW présentent un état pro-oxydatif lors de prélèvements sanguins. À partir de ces constats, nous avons décidé de mesurer l'effet de cette augmentation des EROs dans les cellules mêmes. Nous avons donc mesuré l'augmentation des dommages oxydatifs à l'ADN dans les FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ en comparaison avec les FSEs TS. Ainsi, la protéine WRN qui est reconnue pour jouer un rôle dans la réparation des dommages à l'ADN serait aussi impliquée dans la prévention de ces dommages en régulant les gènes de la réponse au stress oxydant. Les FSEs intracellulaires pourraient bien être la cause du niveau plus élevé de dommage oxydatif à l'ADN chez les souris ainsi que chez les patients atteints du SW. De plus, les dommages oxydatifs intracellulaires sont reconnus comme une des causes majeures du vieillissement. Il est donc possible d'envisager que des niveaux anormalement élevés d'EROs et de dommages oxydatifs puissent être des facteurs importants du vieillissement prématuré observé chez les patients avec le SW. La mitochondrie serait une source possible d'EROs. En effet, durant les différentes étapes d'oxydoréduction de l'oxygène dans la chaîne respiratoire mitochondriale, il y a production de différents types d'EROs. Dans cette optique, une augmentation de la production d'EROs par la mitochondrie peut aussi être due à l'altération d'une réaction de la chaîne respiratoire qui affecterait le potentiel transmembranaire, et par le fait même, la production d'ATP nécessaire à plusieurs processus biologiques cellulaires. D'ailleurs, nous avons observé une diminution de l'ATP intracellulaire dans les FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ en comparaison avec les FSEs TS. Cette diminution d'ATP pourrait être partiellement responsable de plusieurs phénotypes cellulaires et moléculaires chez les souris $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ comme par exemple, la prolifération plus lente des cellules $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ ainsi que la diminution d'ATP dans le foie de souris $Wrn\Delta hel/\Delta hel$. Nos résultats démontrent une augmentation du ratio d'ADP/ATP dans les FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ versus les FSEs TS. Ceci confirme la diminution

d'ATP dans les FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$. La diminution d'ATP produite par les mitochondries dans les FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ favorise l'hypothèse d'une altération anormale de la chaîne respiratoire.

En accord avec cette hypothèse, nous avons observé une diminution du potentiel transmembranaire de la membrane interne des mitochondries de FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$. Cette perte de potentiel transmembranaire renforce l'idée selon laquelle une ou des réactions de la chaîne respiratoire seraient altérées dans les cellules FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$. Cette perte de potentiel transmembranaire pourrait très bien altérer le fonctionnement normal des pompes à proton inversé de la mitochondrie et expliquer la perte de production d'ATP des mitochondries.

Nous avons observé une augmentation significative des glutathions dans les FSEs TS et $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ en réponse à l'addition de peroxyde d'hydrogène. Chez les FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ on constate une augmentation des glutathions en comparaison au FSEs TS avant même l'addition de peroxyde d'hydrogène. Cette observation suggère que les FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ réagissent à un stress oxydatif chronique déjà existant en produisant plus de glutathions pour contrecarrer les EROs.

Les résultats obtenus en réponse à l'ajout de peroxyde d'hydrogène exogène sont d'autant plus intéressants du fait qu'ils miment une augmentation rapide des EROs qui se produit au niveau systémique suite à l'ingestion de nourriture. Ainsi, en réponse à un traitement au peroxyde d'hydrogène, l'augmentation de GSH est beaucoup plus modérée dans les FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ que dans les FSEs TS; toutefois, le niveau final de GSH est à peu près égal à celui des FSEs TS traités au peroxyde. Cela suggère que la production de glutathions des FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ en réponse aux EROs n'est pas affectée. Malgré cette augmentation des glutathions, le stress oxydatif est plus élevé dans les cellules $Wrn\Delta hel/\Delta hel$. Nous pouvons conclure que cette réponse n'est pas parfaitement efficace puisque nous détectons des niveaux plus élevés d'EROs. Ainsi, la protéine Wrn régulerait le niveau d'EROs par la production de ces dernières par les mitochondries. D'ailleurs, nous avons des résultats qui démontrent que la protéine Wrn diminue la quantité d'EROs [193].

Les résultats sur biopuces effectués à partir de l'ARN de FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ et de FSEs TS traités ou non avec du peroxyde nous montrent une réponse importante au niveau transcriptionnel pour les deux types cellulaires. La corrélation entre les résultats obtenus par transcriptase inverse suivi d'une réaction en chaîne de polymérase quantitative (TI-RCPq) et par l'analyse de l'expression génique globale nous a permis de valider les résultats des biopuces et de déterminer quelles variations sont significatives. L'analyse transcriptionnelle montre que la réponse au peroxyde d'hydrogène est plus modérée dans les FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ que dans les FSEs TS. En fait, la transcription est diminuée pour 548 gènes dans les FSEs TS contre 368 gènes dans les FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$, tandis que la transcription est augmentée pour 130 gènes dans les FSEs TS contre 53 gènes dans les FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$. De plus, il y a peu de gènes en commun en réponse au peroxyde d'hydrogène dans ces deux cultures cellulaires. Ainsi, la réponse transcriptionnelle au peroxyde d'hydrogène des FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ est très différente en plus d'être plus modérée.

L'analyse des résultats sur biopuces avec le logiciel PANTHER nous a permis de comprendre l'effet du peroxyde d'hydrogène sur les FSEs TS et les FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ d'un point de vue plus général. En fait, cinq processus biologiques sont particulièrement diminués par le peroxyde dans les FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$. Ces processus incluent la motilité et la structure cellulaire, le processus de développement, le remodelage et l'organisation de la chromatine, l'immunité entremise par MHCII ainsi que le transport des cations. À part l'immunité entremise par MHCII, tous les autres processus biologiques précédemment énumérés sont aussi diminués dans les FSEs TS en réponse à un traitement au peroxyde d'hydrogène. Cela nous indique que la réaction des FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ est plutôt normale dans son ensemble. Cependant, un bien plus grand nombre de processus biologiques ont été diminués dans les FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$. Ainsi, les FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ réagissent plus modérément au peroxyde d'hydrogène que les FSEs TS.

Les processus biologiques qui sont augmentés dans les FSEs $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ sont le métabolisme des acides aminés, le métabolisme des autres carbones, le métabolisme des

purines ainsi que la biosynthèse des acides aminés. Parmi les processus qui sont augmentés, on remarque que certains sont de nature anabolique, et ce, même si les cellules $Wrn\Delta hel/\Delta hel$ ont un cycle cellulaire plus lent. Ainsi, la croissance plus lente des cellules Wrn ne serait pas due à une limitation provenant de ces processus. En plus, l'augmentation de ces voies anaboliques dans un contexte de cycle cellulaire plus lent peut entraîner une accumulation inadéquate de certaines molécules. Cela peut introduire un stress additionnel aux cellules participant à leur sénescence prématurée. Cette dernière hypothèse reste à démontrer.

Les processus biologiques qui sont diminués englobent le transport des cations, le métabolisme des protéines et de leurs modifications, la protéolyse, la signalisation par les protéines G, le repliement des protéines ainsi que les processus développementaux. La baisse des processus développementaux est peut-être directement impliquée dans les troubles développementaux de notre modèle de souris ainsi que dans ceux des patients atteints du SW. La baisse des processus tels que le repliement des protéines, le métabolisme des protéines et leurs modifications ainsi que la protéolyse peuvent engendrer une accumulation de dommages et d'erreurs qui participent probablement au vieillissement prématuré des cellules. Enfin, la baisse du transport des cations pourrait influencer le potentiel transmembranaire de la membrane interne des mitochondries, le potentiel électrique des neurones et bien d'autres processus cellulaires ou systémiques impliquant le transport des cations.

Une hypothèse est que la protéine Wrn régule les EROs ou agit en tant qu'intermédiaire dans la réaction de la cellule aux EROs. Ainsi, la protéine Wrn serait non seulement un élément régulateur des EROs mais aussi un élément senseur de ces derniers. Il est possible que la protéine Wrn perçoive les EROs de manière directe ou par une protéine intermédiaire. D'ailleurs, il n'est pas impossible que Wrn perçoive les EROs directement par ses domaines de liaison aux métaux qui sont oxydables. D'autre part, il est connu que les activités exnucléase et hélicase de Wrn sont inhibées par son oxydation [79]. Ainsi, peut-être qu'une nouvelle fonction de Wrn est dévoilée par l'inhibition de ses fonctions les plus connues. Il serait intéressant de muter les acides aminés qui sont oxydables contre des

acides aminés toujours chargés négativement et des acides aminés toujours chargés positivement pour mimer l'état oxydé et l'état réduit de Wrn et de mesurer les EROs intracellulaires des deux types de mutant, ceci afin de vérifier si le niveau d'EROs intracellulaire serait affecté.

3.2 Conclusion

La protéine Wrn est essentielle au bon fonctionnement de la mitochondrie et à la régulation de la production d'EROs par cette dernière. Par conséquent, dans les FSEs Wrn Δ hel/ Δ hel, la production d'ATP est diminuée et la production d'EROs est augmentée. Cette augmentation des EROs est confirmée indirectement par l'augmentation des dommages oxydatifs dans l'ADN génomique ainsi que par l'augmentation des GSH dans les FSEs Wrn Δ hel/ Δ hel en réponse à ce stress. Ainsi, les FSEs Wrn Δ hel/ Δ hel subissent un stress oxydatif chronique et leurs systèmes antioxydants semblent déjà saturés. Les FSEs Wrn Δ hel/ Δ hel sont donc incapables de réagir adéquatement à une augmentation d'EROs additionnelle et cela résulte en une augmentation des dommages cellulaires. Les FSEs TS et Wrn Δ hel/ Δ hel réagissent à l'ajout de peroxyde en produisant plus de GSH, mais cette augmentation est moins appréciable dans les FSEs Wrn Δ hel/ Δ hel parce que les GSH sont déjà élevés.

Au niveau transcriptionnel, les FSEs Wrn Δ hel/ Δ hel s'adaptent à l'ajout de peroxyde en dérégulant un nombre de gènes moins important que les FSEs TS et pour la majorité des gènes dérégulés, ils sont différents de ceux dérégulés chez les FSEs TS. Enfin, moins de processus biologiques sont affectés par le peroxyde dans les FSEs Wrn Δ hel/ Δ hel que dans les FSEs TS. Cela s'explique en grande partie par le fait que plusieurs de ces processus sont déjà affectés de façon chronique dans les FSEs Wrn Δ hel/ Δ hel. En somme, les FSEs TS se rapprochent phénotypiquement des FSEs Wrn Δ hel/ Δ hel en réponse à un traitement au peroxyde d'hydrogène. Nos résultats confirment le rôle de la protéine Wrn dans la régulation des EROs mitochondriales, ce qui suggère aussi un rôle de détecteur des EROs pour la protéine Wrn. Étant donné l'omniprésence de Wrn dans tous les types cellulaires et

à tous les stades du développement, il est fort probable que cette augmentation des EROs soit responsable des phénotypes non seulement chez notre modèle de souris, mais aussi chez les patients atteints du SW. La connexion entre la dysfonction mitochondriale et une fonction anormale de la protéine Wrn dans le noyau reste à déterminer au niveau moléculaire. Ceci étant dit, nous avons des résultats préliminaires indiquant que l'interaction de WRN avec la protéine RACK1 serait importante pour la dysfonction mitochondriale [1].

3.3 Perspectives

Les conclusions auxquelles nous amènent nos résultats éclairent de nouvelles avenues pour la recherche ainsi que de nouvelles options thérapeutiques pour le SW. Ainsi nos résultats nous démontrent l'importance des EROs dans le SW, ce qui confirme l'importance de faire plus de recherche sur l'effet ainsi que sur la cause des EROs dans le SW. Les domaines catalytiques hélicase et exonucléase de la protéine WRN contiennent chacun un site de liaison aux métaux qui peut être oxydé [79]. L'oxydoréduction de ces sites module les activités hélicase et exonucléase de la protéine WRN en plus de changer son patron d'interaction avec différentes protéines [79]. Il serait donc intéressant de déterminer si ces sites sont nécessaires au contrôle du niveau d'EROs par WRN. Ajoutons également que de nouveaux traitements ciblant la mitochondrie ou les EROs pourraient être développés pour contrecarrer le SW. En somme, certains antioxydants pourraient réduire les symptômes du SW. Finalement, peut-être qu'une diète adaptée aux personnes atteintes du SW pourrait réduire la production d'EROs et par le fait même réduire la virulence de la maladie.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Massip, L., et al., *Depletion of WRN protein causes RACK1 to activate several protein kinase C isoforms*. *Oncogene*, 2010. **29**(10): p. 1486-97.
2. Labbe, A., et al., *Resveratrol improves insulin resistance hyperglycemia and hepatosteatosis but not hypertriglyceridemia, inflammation, and life span in a mouse model for Werner syndrome*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2011. **66**(3): p. 264-78.
3. Tosato, M., et al., *The aging process and potential interventions to extend life expectancy*. *Clin Interv Aging*, 2007. **2**(3): p. 401-12.
4. Sehl, M.E. and F.E. Yates, *Kinetics of human aging: I. Rates of senescence between ages 30 and 70 years in healthy people*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2001. **56**(5): p. B198-208.
5. Kirkwood, T.B., *The nature and causes of ageing*. *Ciba Found Symp*, 1988. **134**: p. 193-207.
6. Kirkwood, T.B., *Understanding ageing from an evolutionary perspective*. *J Intern Med*, 2008. **263**(2): p. 117-27.
7. Gensler, H.L. and H. Bernstein, *DNA damage as the primary cause of aging*. *Q Rev Biol*, 1981. **56**(3): p. 279-303.
8. Masoro, E.J., *Aging: current concepts*. *Aging (Milano)*, 1997. **9**(6): p. 436-7.
9. Golden, T.R., D.A. Hinerfeld, and S. Melov, *Oxidative stress and aging: beyond correlation*. *Aging Cell*, 2002. **1**(2): p. 117-23.
10. Dimauro, T. and G. David, *Chromatin modifications: the driving force of senescence and aging?* *Aging (Albany NY)*, 2009. **1**(2): p. 182-90.
11. Partridge, L. and N. Prowse, *Gerontology. Mutation, variation and the evolution of ageing*. *Curr Biol*, 1994. **4**(5): p. 430-2.
12. Cristofalo, V.J. and B.B. Sharf, *Cellular senescence and DNA synthesis. Thymidine incorporation as a measure of population age in human diploid cells*. *Exp Cell Res*, 1973. **76**(2): p. 419-27.
13. Kyng, K., D.L. Croteau, and V.A. Bohr, *Werner syndrome resembles normal aging*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(15): p. 2323.
14. Sert, M., K. Fakioglu, and T. Tetiker, *Review of Two Siblings with Werner's Syndrome: A Case Report*. *Case Report Med*, 2009. **2009**: p. 138312.
15. Ellison, D.J. and D.W. Pugh, *Werner's syndrome*. *Br Med J*, 1955. **2**(4933): p. 237-9.
16. Williams, D.I., *Werner's syndrome*. *Proc R Soc Med*, 1949. **42**(8): p. 572.
17. Mori, S., et al., *Enhanced intra-abdominal visceral fat accumulation in patients with Werner's syndrome*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2001. **25**(2): p. 292-5.
18. Gibbs, D.D., *Werner's syndrome ('progeria of the adult')*. *Proc R Soc Med*, 1967. **60**(2): p. 135-6.
19. Alberti, K.G., J.D. Young, and T.D. Hockaday, *Werner's syndrome: metabolic observations*. *Proc R Soc Med*, 1974. **67**(1): p. 36-8.
20. Sogawa, M., et al., *Aortic valve replacement for aortic stenosis with a small aortic annulus in a patient having Werner's syndrome and liver cirrhosis*. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2001. **7**(6): p. 378-80.

21. Soto-Figueroa, S.F., R.L. Nussbaum, and E. Garcia, *A case of myocardial infarction in a patient with Werner's syndrome*. *Tex Heart Inst J*, 1984. **11**(1): p. 80-3.
22. Moser, M.J., et al., *Genetic instability and hematologic disease risk in Werner syndrome patients and heterozygotes*. *Cancer Res*, 2000. **60**(9): p. 2492-6.
23. Yamanaka, A., et al., *Lung cancer associated with Werner's syndrome: a case report and review of the literature*. *Jpn J Clin Oncol*, 1997. **27**(6): p. 415-8.
24. Okamura, H., et al., *Werner's syndrome associated with cholangiocarcinoma*. *Jpn J Med*, 1986. **25**(2): p. 179-83.
25. Tsurubuchi, T., et al., *Meningioma associated with Werner syndrome--case report*. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2008. **48**(10): p. 470-3.
26. Ding, S.L., et al., *Genetic variation in the premature aging gene WRN: a case-control study on breast cancer susceptibility*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007. **16**(2): p. 263-9.
27. Kocabora, M.S., et al., *[Cataract surgery by phacoemulsification in Werner's syndrome]*. *J Fr Ophtalmol*, 2000. **23**(10): p. 1012-5.
28. Kyng, K.J., et al., *Gene expression profiling in Werner syndrome closely resembles that of normal aging*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(21): p. 12259-64.
29. Danes, B.S., *Progeria: a cell culture study on aging*. *J Clin Invest*, 1971. **50**(9): p. 2000-3.
30. Ding, S.L. and C.Y. Shen, *Model of human aging: recent findings on Werner's and Hutchinson-Gilford progeria syndromes*. *Clin Interv Aging*, 2008. **3**(3): p. 431-44.
31. Kruk, P.A., N.J. Rampino, and V.A. Bohr, *DNA damage and repair in telomeres: relation to aging*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(1): p. 258-62.
32. Baird, D.M., et al., *Normal telomere erosion rates at the single cell level in Werner syndrome fibroblast cells*. *Hum Mol Genet*, 2004. **13**(14): p. 1515-24.
33. Crabbe, L., et al., *Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity*. *Science*, 2004. **306**(5703): p. 1951-3.
34. Choi, D., et al., *Telomerase expression prevents replicative senescence but does not fully reset mRNA expression patterns in Werner syndrome cell strains*. *FASEB J*, 2001. **15**(6): p. 1014-20.
35. Crabbe, L., et al., *Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(7): p. 2205-10.
36. Weirich-Schwaiger, H., et al., *Correlation between senescence and DNA repair in cells from young and old individuals and in premature aging syndromes*. *Mutat Res*, 1994. **316**(1): p. 37-48.
37. Ariyoshi, K., et al., *Increased chromosome instability and accumulation of DNA double-strand breaks in Werner syndrome cells*. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2007. **48**(3): p. 219-31.
38. Oshima, J., et al., *Lack of WRN results in extensive deletion at nonhomologous joining ends*. *Cancer Res*, 2002. **62**(2): p. 547-51.
39. Prince, P.R., M.J. Emond, and R.J. Monnat, Jr., *Loss of Werner syndrome protein function promotes aberrant mitotic recombination*. *Genes Dev*, 2001. **15**(8): p. 933-8.
40. Machwe, A., D.K. Orren, and V.A. Bohr, *Accelerated methylation of ribosomal RNA genes during the cellular senescence of Werner syndrome fibroblasts*. *FASEB J*, 2000. **14**(12): p. 1715-24.

41. Kausch, C., et al., *Association of impaired phosphatidylinositol 3-kinase activity in GLUT1-containing vesicles with malinsertion of glucose transporters into the plasma membrane of fibroblasts from a patient with severe insulin resistance and clinical features of Werner syndrome.* J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(2): p. 905-18.
42. Epstein, C.J., et al., *Werner's syndrome a review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process.* Medicine (Baltimore), 1966. **45**(3): p. 177-221.
43. Yu, C.E., et al., *Positional cloning of the Werner's syndrome gene.* Science, 1996. **272**(5259): p. 258-62.
44. Ichikawa, K., et al., *Physical map of the human chromosome 8p12-p21 encompassing tumor suppressor and Werner's syndrome gene loci.* DNA Res, 1998. **5**(2): p. 103-13.
45. Wang, L., et al., *Structure and function of the human Werner syndrome gene promoter: evidence for transcriptional modulation.* Nucleic Acids Res, 1998. **26**(15): p. 3480-5.
46. Motonaga, K., et al., *Age related expression of Werner's syndrome protein in selected tissues and coexpression of transcription factors.* J Clin Pathol, 2002. **55**(3): p. 195-9.
47. Yamabe, Y., et al., *Sp1-mediated transcription of the Werner helicase gene is modulated by Rb and p53.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(11): p. 6191-200.
48. Grandori, C., et al., *Werner syndrome protein limits MYC-induced cellular senescence.* Genes Dev, 2003. **17**(13): p. 1569-74.
49. Grandori, C., et al., *Functional link between Myc and the Werner gene in tumorigenesis.* Cell Cycle, 2004. **3**(1): p. 22-5.
50. Moser, M.J., et al., *WRN helicase expression in Werner syndrome cell lines.* Nucleic Acids Res, 2000. **28**(2): p. 648-54.
51. Oshima, J., et al., *Homozygous and compound heterozygous mutations at the Werner syndrome locus.* Hum Mol Genet, 1996. **5**(12): p. 1909-13.
52. Shiratori, M., et al., *Detection by epitope-defined monoclonal antibodies of Werner DNA helicases in the nucleoplasm and their upregulation by cell transformation and immortalization.* J Cell Biol, 1999. **144**(1): p. 1-9.
53. Shen, J.C., et al., *Werner syndrome protein. I. DNA helicase and dna exonuclease reside on the same polypeptide.* J Biol Chem, 1998. **273**(51): p. 34139-44.
54. von Kobbe, C., et al., *Werner syndrome protein contains three structure-specific DNA binding domains.* J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52997-3006.
55. Brosh, R.M., Jr., et al., *Potent inhibition of werner and bloom helicases by DNA minor groove binding drugs.* Nucleic Acids Res, 2000. **28**(12): p. 2420-30.
56. Marciniak, R.A., et al., *Nucleolar localization of the Werner syndrome protein in human cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6887-92.
57. Balajee, A.S., et al., *The Werner syndrome protein is involved in RNA polymerase II transcription.* Mol Biol Cell, 1999. **10**(8): p. 2655-68.
58. von Kobbe, C. and V.A. Bohr, *A nucleolar targeting sequence in the Werner syndrome protein resides within residues 949-1092.* J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 20): p. 3901-7.
59. Lee, J.W., et al., *Modulation of Werner syndrome protein function by a single mutation in the conserved RecQ domain.* J Biol Chem, 2005. **280**(47): p. 39627-36.

60. Kitano, K., N. Yoshihara, and T. Hakoshima, *Crystal structure of the HRDC domain of human Werner syndrome protein, WRN*. J Biol Chem, 2007. **282**(4): p. 2717-28.
61. Liu, Z., et al., *The three-dimensional structure of the HRDC domain and implications for the Werner and Bloom syndrome proteins*. Structure, 1999. **7**(12): p. 1557-66.
62. Partridge, J.J., et al., *DNA damage modulates nucleolar interaction of the Werner protein with the AAA ATPase p97/VCP*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(10): p. 4221-9.
63. Indig, F.E., et al., *Werner syndrome protein directly binds to the AAA ATPase p97/VCP in an ATP-dependent fashion*. J Struct Biol, 2004. **146**(1-2): p. 251-9.
64. Suzuki, T., et al., *Diverged nuclear localization of Werner helicase in human and mouse cells*. Oncogene, 2001. **20**(20): p. 2551-8.
65. Blander, G., et al., *DNA damage-induced translocation of the Werner helicase is regulated by acetylation*. J Biol Chem, 2002. **277**(52): p. 50934-40.
66. Li, K., et al., *Regulation of WRN protein cellular localization and enzymatic activities by SIRT1-mediated deacetylation*. J Biol Chem, 2008. **283**(12): p. 7590-8.
67. Muftuoglu, M., et al., *Acetylation regulates WRN catalytic activities and affects base excision DNA repair*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e1918.
68. Lan, L., et al., *Accumulation of Werner protein at DNA double-strand breaks in human cells*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 18): p. 4153-62.
69. Choudhary, S., J.A. Sommers, and R.M. Brosh, Jr., *Biochemical and kinetic characterization of the DNA helicase and exonuclease activities of werner syndrome protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34603-13.
70. Compton, S.A., et al., *The Werner syndrome protein binds replication fork and holliday junction DNAs as an oligomer*. J Biol Chem, 2008. **283**(36): p. 24478-83.
71. Mohaghegh, P., et al., *The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(13): p. 2843-9.
72. Machwe, A., et al., *Competition between the DNA unwinding and strand pairing activities of the Werner and Bloom syndrome proteins*. BMC Mol Biol, 2006. **7**: p. 1.
73. Opresko, P.L., et al., *Werner syndrome and the function of the Werner protein; what they can teach us about the molecular aging process*. Carcinogenesis, 2003. **24**(5): p. 791-802.
74. Kamath-Loeb, A.S., et al., *Werner syndrome protein. II. Characterization of the integral 3' --> 5' DNA exonuclease*. J Biol Chem, 1998. **273**(51): p. 34145-50.
75. Shen, J.C. and L.A. Loeb, *Werner syndrome exonuclease catalyzes structure-dependent degradation of DNA*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(17): p. 3260-8.
76. Machwe, A., et al., *Selective blockage of the 3'-->5' exonuclease activity of WRN protein by certain oxidative modifications and bulky lesions in DNA*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(14): p. 2762-70.
77. Suzuki, N., et al., *Werner syndrome helicase contains a 5'-->3' exonuclease activity that digests DNA and RNA strands in DNA/DNA and RNA/DNA duplexes dependent on unwinding*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(11): p. 2361-8.
78. Choi, J.M., et al., *Probing the roles of active site residues in the 3'-5' exonuclease of the Werner syndrome protein*. J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 9941-51.

79. Harrigan, J.A., et al., *Metal-catalyzed oxidation of the Werner syndrome protein causes loss of catalytic activities and impaired protein-protein interactions*. J Biol Chem, 2007. **282**(50): p. 36403-11.
80. Machwe, A., L. Xiao, and D.K. Orren, *Length-dependent degradation of single-stranded 3' ends by the Werner syndrome protein (WRN): implications for spatial orientation and coordinated 3' to 5' movement of its ATPase/helicase and exonuclease domains*. BMC Mol Biol, 2006. **7**: p. 6.
81. Agrelo, R., et al., *Epigenetic inactivation of the premature aging Werner syndrome gene in human cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(23): p. 8822-7.
82. Poot, M., et al., *Impaired S-phase transit of Werner syndrome cells expressed in lymphoblastoid cell lines*. Exp Cell Res, 1992. **202**(2): p. 267-73.
83. Von Kobbe, C., et al., *Werner syndrome cells escape hydrogen peroxide-induced cell proliferation arrest*. FASEB J, 2004. **18**(15): p. 1970-2.
84. Castro, E., V. Oviedo-Rodriguez, and L.I. Angel-Chavez, *WRN polymorphisms affect expression levels of plasminogen activator inhibitor type 1 in cultured fibroblasts*. BMC Cardiovasc Disord, 2008. **8**: p. 5.
85. Lachapelle, S., et al., *Proteome-wide identification of WRN-interacting proteins in untreated and nuclease-treated samples*. J Proteome Res, 2011. **10**(3): p. 1216-27.
86. Blander, G., et al., *Physical and functional interaction between p53 and the Werner's syndrome protein*. J Biol Chem, 1999. **274**(41): p. 29463-9.
87. Blander, G., et al., *The Werner syndrome protein contributes to induction of p53 by DNA damage*. FASEB J, 2000. **14**(14): p. 2138-40.
88. Spillare, E.A., et al., *p53-mediated apoptosis is attenuated in Werner syndrome cells*. Genes Dev, 1999. **13**(11): p. 1355-60.
89. Wirtenberger, M., et al., *Interaction of Werner and Bloom syndrome genes with p53 in familial breast cancer*. Carcinogenesis, 2006. **27**(8): p. 1655-60.
90. Brosh, R.M., Jr., et al., *p53 Modulates the exonuclease activity of Werner syndrome protein*. J Biol Chem, 2001. **276**(37): p. 35093-102.
91. Sommers, J.A., et al., *p53 modulates RPA-dependent and RPA-independent WRN helicase activity*. Cancer Res, 2005. **65**(4): p. 1223-33.
92. Davis, T., et al., *Telomere-based proliferative lifespan barriers in Werner-syndrome fibroblasts involve both p53-dependent and p53-independent mechanisms*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 7): p. 1349-57.
93. Johnson, J.E., et al., *Altered gene expression in the Werner and Bloom syndromes is associated with sequences having G-quadruplex forming potential*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(4): p. 1114-22.
94. Shiratori, M., et al., *WRN helicase accelerates the transcription of ribosomal RNA as a component of an RNA polymerase I-associated complex*. Oncogene, 2002. **21**(16): p. 2447-54.
95. Sharma, A., et al., *The Werner syndrome helicase is a cofactor for HIV-1 long terminal repeat transactivation and retroviral replication*. J Biol Chem, 2007. **282**(16): p. 12048-57.
96. Friedemann, J., F. Grosse, and S. Zhang, *Nuclear DNA helicase II (RNA helicase A) interacts with Werner syndrome helicase and stimulates its exonuclease activity*. J Biol Chem, 2005. **280**(35): p. 31303-13.

97. Chakraborty, P. and F. Grosse, *WRN helicase unwinds Okazaki fragment-like hybrids in a reaction stimulated by the human DHX9 helicase*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(14): p. 4722-30.
98. Sharma, S., et al., *The exonucleolytic and endonucleolytic cleavage activities of human exonuclease 1 are stimulated by an interaction with the carboxyl-terminal region of the Werner syndrome protein*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(26): p. 23487-96.
99. Machwe, A., et al., *Molecular cooperation between the Werner syndrome protein and replication protein A in relation to replication fork blockage*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(5): p. 3497-508.
100. Doherty, K.M., et al., *Physical and functional mapping of the replication protein A interaction domain of the werner and bloom syndrome helicases*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(33): p. 29494-505.
101. Ohsugi, I., et al., *Telomere repeat DNA forms a large non-covalent complex with unique cohesive properties which is dissociated by Werner syndrome DNA helicase in the presence of replication protein A*. *Nucleic Acids Res*, 2000. **28**(18): p. 3642-8.
102. Garcia, P.L., et al., *RPA alleviates the inhibitory effect of vinylphosphonate internucleotide linkages on DNA unwinding by BLM and WRN helicases*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(12): p. 3771-8.
103. Szekely, A.M., et al., *Werner protein recruits DNA polymerase delta to the nucleolus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(21): p. 11365-70.
104. Kamath-Loeb, A.S., et al., *Functional interaction between the Werner Syndrome protein and DNA polymerase delta*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(9): p. 4603-8.
105. Kamath-Loeb, A.S., et al., *Interactions between the Werner syndrome helicase and DNA polymerase delta specifically facilitate copying of tetraplex and hairpin structures of the d(CGG)_n trinucleotide repeat sequence*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(19): p. 16439-46.
106. Fry, M. and L.A. Loeb, *Human werner syndrome DNA helicase unwinds tetrahelical structures of the fragile X syndrome repeat sequence d(CGG)_n*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(18): p. 12797-802.
107. Shah, S.N., et al., *DNA structure and the Werner protein modulate human DNA polymerase delta-dependent replication dynamics within the common fragile site FRA16D*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(4): p. 1149-62.
108. Lebel, M., et al., *The Werner syndrome gene product co-purifies with the DNA replication complex and interacts with PCNA and topoisomerase I*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(53): p. 37795-9.
109. Franchitto, A. and P. Pichierri, *Protecting genomic integrity during DNA replication: correlation between Werner's and Bloom's syndrome gene products and the MRE11 complex*. *Hum Mol Genet*, 2002. **11**(20): p. 2447-53.
110. Cheng, W.H., et al., *Linkage between Werner syndrome protein and the Mre11 complex via Nbs1*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(20): p. 21169-76.
111. Brosh, R.M., Jr., et al., *Unwinding of a DNA triple helix by the Werner and Bloom syndrome helicases*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(5): p. 3024-30.
112. Brosh, R.M., Jr., J. Waheed, and J.A. Sommers, *Biochemical characterization of the DNA substrate specificity of Werner syndrome helicase*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(26): p. 23236-45.

113. Constantinou, A., et al., *Werner's syndrome protein (WRN) migrates Holliday junctions and co-localizes with RPA upon replication arrest*. EMBO Rep, 2000. **1**(1): p. 80-4.
114. Machwe, A., et al., *Replication fork regression in vitro by the Werner syndrome protein (WRN): holliday junction formation, the effect of leading arm structure and a potential role for WRN exonuclease activity*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(17): p. 5729-47.
115. Fujiwara, Y., T. Higashikawa, and M. Tatsumi, *A retarded rate of DNA replication and normal level of DNA repair in Werner's syndrome fibroblasts in culture*. J Cell Physiol, 1977. **92**(3): p. 365-74.
116. Ahn, B., et al., *Regulation of WRN helicase activity in human base excision repair*. J Biol Chem, 2004. **279**(51): p. 53465-74.
117. Harrigan, J.A., et al., *The Werner syndrome protein stimulates DNA polymerase beta strand displacement synthesis via its helicase activity*. J Biol Chem, 2003. **278**(25): p. 22686-95.
118. Kamath-Loeb, A.S., et al., *Werner syndrome protein interacts functionally with translesion DNA polymerases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(25): p. 10394-9.
119. Saydam, N., et al., *Physical and functional interactions between Werner syndrome helicase and mismatch-repair initiation factors*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(17): p. 5706-16.
120. Laine, J.P., et al., *Werner protein stimulates topoisomerase I DNA relaxation activity*. Cancer Res, 2003. **63**(21): p. 7136-46.
121. Futami, K., et al., *Increased chemotherapeutic activity of camptothecin in cancer cells by siRNA-induced silencing of WRN helicase*. Biol Pharm Bull, 2007. **30**(10): p. 1958-61.
122. Christmann, M., et al., *WRN protects against topo I but not topo II inhibitors by preventing DNA break formation*. DNA Repair (Amst), 2008. **7**(12): p. 1999-2009.
123. Lebel, M. and P. Leder, *A deletion within the murine Werner syndrome helicase induces sensitivity to inhibitors of topoisomerase and loss of cellular proliferative capacity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(22): p. 13097-102.
124. Karmakar, P., et al., *Werner protein is a target of DNA-dependent protein kinase in vivo and in vitro, and its catalytic activities are regulated by phosphorylation*. J Biol Chem, 2002. **277**(21): p. 18291-302.
125. Yannone, S.M., et al., *Werner syndrome protein is regulated and phosphorylated by DNA-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 2001. **276**(41): p. 38242-8.
126. Karmakar, P., et al., *Ku heterodimer binds to both ends of the Werner protein and functional interaction occurs at the Werner N-terminus*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(16): p. 3583-91.
127. Li, B. and L. Comai, *Requirements for the nucleolytic processing of DNA ends by the Werner syndrome protein-Ku70/80 complex*. J Biol Chem, 2001. **276**(13): p. 9896-902.
128. Li, B. and L. Comai, *Functional interaction between Ku and the werner syndrome protein in DNA end processing*. J Biol Chem, 2000. **275**(50): p. 39800.
129. Li, B., et al., *Identification and biochemical characterization of a Werner's syndrome protein complex with Ku70/80 and poly(ADP-ribose) polymerase-1*. J Biol Chem, 2004. **279**(14): p. 13659-67.

130. Opresko, P.L., et al., *Coordinate action of the helicase and 3' to 5' exonuclease of Werner syndrome protein*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 44677-87.
131. Kusumoto, R., et al., *Werner protein cooperates with the XRCC4-DNA ligase IV complex in end-processing*. Biochemistry, 2008. **47**(28): p. 7548-56.
132. Sallmyr, A., A.E. Tomkinson, and F.V. Rassool, *Up-regulation of WRN and DNA ligase IIIalpha in chronic myeloid leukemia: consequences for the repair of DNA double-strand breaks*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1413-23.
133. Salk, D., et al., *Cytogenetics of Werner's syndrome cultured skin fibroblasts: variegated translocation mosaicism*. Cytogenet Cell Genet, 1981. **30**(2): p. 92-107.
134. Harrigan, J.A., et al., *WRN exonuclease activity is blocked by DNA termini harboring 3' obstructive groups*. Mech Ageing Dev, 2007. **128**(3): p. 259-66.
135. Orren, D.K., et al., *A functional interaction of Ku with Werner exonuclease facilitates digestion of damaged DNA*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. 1926-34.
136. Bukowy, Z., et al., *WRN Exonuclease activity is blocked by specific oxidatively induced base lesions positioned in either DNA strand*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(15): p. 4975-87.
137. Das, A., et al., *The human Werner syndrome protein stimulates repair of oxidative DNA base damage by the DNA glycosylase NEIL1*. J Biol Chem, 2007. **282**(36): p. 26591-602.
138. Lebel, M., et al., *Genetic cooperation between the Werner syndrome protein and poly(ADP-ribose) polymerase-1 in preventing chromatid breaks, complex chromosomal rearrangements, and cancer in mice*. Am J Pathol, 2003. **162**(5): p. 1559-69.
139. von Kobbe, C., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates both the exonuclease and helicase activities of the Werner syndrome protein*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(13): p. 4003-14.
140. Cheng, W.H., et al., *WRN is required for ATM activation and the S-phase checkpoint in response to interstrand cross-link-induced DNA double-strand breaks*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(9): p. 3923-33.
141. Cheng, W.H., et al., *Collaboration of Werner syndrome protein and BRCA1 in cellular responses to DNA interstrand cross-links*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(9): p. 2751-60.
142. Franchitto, A., J. Oshima, and P. Pichierri, *The G2-phase decatenation checkpoint is defective in Werner syndrome cells*. Cancer Res, 2003. **63**(12): p. 3289-95.
143. Otterlei, M., et al., *Werner syndrome protein participates in a complex with RAD51, RAD54, RAD54B and ATR in response to ICL-induced replication arrest*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 24): p. 5137-46.
144. Poot, M., et al., *Werner syndrome cells are sensitive to DNA cross-linking drugs*. FASEB J, 2001. **15**(7): p. 1224-6.
145. Poot, M., et al., *Werner syndrome diploid fibroblasts are sensitive to 4-nitroquinoline-N-oxide and 8-methoxypsoralen: implications for the disease phenotype*. FASEB J, 2002. **16**(7): p. 757-8.
146. Baynton, K., et al., *WRN interacts physically and functionally with the recombination mediator protein RAD52*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36476-86.
147. Saintigny, Y., et al., *Homologous recombination resolution defect in werner syndrome*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(20): p. 6971-8.

148. Takeuchi, F., et al., *Altered frequency of initiation sites of DNA replication in Werner's syndrome cells*. Hum Genet, 1982. **60**(4): p. 365-8.
149. Pichierri, P., et al., *Werner's syndrome protein is required for correct recovery after replication arrest and DNA damage induced in S-phase of cell cycle*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(8): p. 2412-21.
150. Fukuchi, K., G.M. Martin, and R.J. Monnat, Jr., *Mutator phenotype of Werner syndrome is characterized by extensive deletions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(15): p. 5893-7.
151. Yan, H., et al., *Analysis of the Xenopus Werner syndrome protein in DNA double-strand break repair*. J Cell Biol, 2005. **171**(2): p. 217-27.
152. Toczylowski, T. and H. Yan, *Mechanistic analysis of a DNA end processing pathway mediated by the Xenopus Werner syndrome protein*. J Biol Chem, 2006. **281**(44): p. 33198-205.
153. Imamura, O., et al., *Werner and Bloom helicases are involved in DNA repair in a complementary fashion*. Oncogene, 2002. **21**(6): p. 954-63.
154. von Kobbe, C., et al., *Colocalization, physical, and functional interaction between Werner and Bloom syndrome proteins*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 22035-44.
155. Sharma, S., et al., *WRN helicase and FEN-1 form a complex upon replication arrest and together process branchmigrating DNA structures associated with the replication fork*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(2): p. 734-50.
156. Brosh, R.M., Jr., et al., *Werner syndrome protein interacts with human flap endonuclease 1 and stimulates its cleavage activity*. EMBO J, 2001. **20**(20): p. 5791-801.
157. Sharma, S., et al., *The interaction site of Flap Endonuclease-1 with WRN helicase suggests a coordination of WRN and PCNA*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(21): p. 6769-81.
158. Tahara, H., et al., *Abnormal telomere dynamics of B-lymphoblastoid cell strains from Werner's syndrome patients transformed by Epstein-Barr virus*. Oncogene, 1997. **15**(16): p. 1911-20.
159. Laud, P.R., et al., *Elevated telomere-telomere recombination in WRN-deficient, telomere dysfunctional cells promotes escape from senescence and engagement of the ALT pathway*. Genes Dev, 2005. **19**(21): p. 2560-70.
160. Li, B., S. Reddy, and L. Comai, *Sequence-specific processing of telomeric 3' overhangs by the Werner syndrome protein exonuclease activity*. Aging (Albany NY), 2009. **1**(3): p. 289-302.
161. Opresko, P.L., G. Sowd, and H. Wang, *The Werner syndrome helicase/exonuclease processes mobile D-loops through branch migration and degradation*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4825.
162. Kusumoto-Matsuo, R., et al., *Cooperation of DNA-PKcs and WRN helicase in the maintenance of telomeric D-loops*. Aging (Albany NY), 2010. **2**(5): p. 274-84.
163. Opresko, P.L., et al., *Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 41110-9.
164. Nora, G.J., N.A. Buncher, and P.L. Opresko, *Telomeric protein TRF2 protects Holliday junctions with telomeric arms from displacement by the Werner syndrome helicase*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(12): p. 3984-98.

165. Li, B., et al., *WRN controls formation of extrachromosomal telomeric circles and is required for TRF2DeltaB-mediated telomere shortening*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(6): p. 1892-904.
166. Opresko, P.L., et al., *POT1 stimulates RecQ helicases WRN and BLM to unwind telomeric DNA substrates*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(37): p. 32069-80.
167. Sowd, G., M. Lei, and P.L. Opresko, *Mechanism and substrate specificity of telomeric protein POT1 stimulation of the Werner syndrome helicase*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(13): p. 4242-56.
168. Oh, Y.T., et al., *Regulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 by protein kinase Cdelta-mediated phosphorylation*. *Apoptosis*, 2007. **12**(7): p. 1339-47.
169. Huang, S., et al., *Characterization of the human and mouse WRN 3'-->5' exonuclease*. *Nucleic Acids Res*, 2000. **28**(12): p. 2396-405.
170. Massip, L., et al., *Vitamin C restores healthy aging in a mouse model for Werner syndrome*. *FASEB J*, 2010. **24**(1): p. 158-72.
171. Wang, L., et al., *Cellular Werner phenotypes in mice expressing a putative dominant-negative human WRN gene*. *Genetics*, 2000. **154**(1): p. 357-62.
172. Moore, G., et al., *Hyperinsulinemia and insulin resistance in Wrn null mice fed a diabetogenic diet*. *Mech Ageing Dev*, 2008. **129**(4): p. 201-6.
173. Lombard, D.B., et al., *Mutations in the WRN gene in mice accelerate mortality in a p53-null background*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(9): p. 3286-91.
174. Lebel, M., R.D. Cardiff, and P. Leder, *Tumorigenic effect of nonfunctional p53 or p21 in mice mutant in the Werner syndrome helicase*. *Cancer Res*, 2001. **61**(5): p. 1816-9.
175. Deschenes, F., et al., *In vivo misregulation of genes involved in apoptosis, development and oxidative stress in mice lacking both functional Werner syndrome protein and poly(ADP-ribose) polymerase-1*. *Hum Mol Genet*, 2005. **14**(21): p. 3293-308.
176. Du, X., et al., *Telomere shortening exposes functions for the mouse Werner and Bloom syndrome genes*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(19): p. 8437-46.
177. Multani, A.S. and S. Chang, *WRN at telomeres: implications for aging and cancer*. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 5): p. 713-21.
178. Scandalios, J.G., *Oxidative stress and defense mechanisms in plants: introduction*. *Free Radic Biol Med*, 1997. **23**(3): p. 471-2.
179. Mills, P.C., et al., *Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse*. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1996. **74**(1-2): p. 60-6.
180. Fu, J.H., et al., *The effects of a fat- and sugar-enriched diet and chronic stress on nonalcoholic fatty liver disease in male Wistar rats*. *Dig Dis Sci*, 2010. **55**(8): p. 2227-36.
181. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. *J Gerontol*, 1956. **11**(3): p. 298-300.
182. Runge, M.S., K. Molnar, and N.R. Madamanchi, *"Old" hearts and arteries: the role of oxidative stress*. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 2010. **121**: p. 52-8; discussion 59-60.
183. Riemann, A., et al., *Acidic Environment Leads to ROS-Induced MAPK Signaling in Cancer Cells*. *PLoS One*, 2011. **6**(7): p. e22445.

184. Palmer, H.J. and K.E. Paulson, *Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression*. Nutr Rev, 1997. **55**(10): p. 353-61.
185. De Deken, X., et al., *Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 23227-33.
186. Dupuy, C., et al., *Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas*. J Biol Chem, 1999. **274**(52): p. 37265-9.
187. Moreno, J.C., et al., *Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism*. N Engl J Med, 2002. **347**(2): p. 95-102.
188. Fahimi, H.D., *Cytochemical localization of peroxidatic activity of catalase in rat hepatic microbodies (peroxisomes)*. J Cell Biol, 1969. **43**(2): p. 275-88.
189. Frederick, S.E. and E.H. Newcomb, *Cytochemical localization of catalase in leaf microbodies (peroxisomes)*. J Cell Biol, 1969. **43**(2): p. 343-53.
190. Forman, H.J. and J. Kennedy, *Superoxide production and electron transport in mitochondrial oxidation of dihydroorotic acid*. J Biol Chem, 1975. **250**(11): p. 4322-6.
191. Rotilio, G., et al., *Intracellular localization of superoxide dismutase and its relation to the distribution and mechanism of hydrogen peroxide-producing enzymes*. Biochim Biophys Acta, 1973. **321**(1): p. 98-102.
192. Pagano, G., et al., *In vivo prooxidant state in Werner syndrome (WS): results from three WS patients and two WS heterozygotes*. Free Radic Res, 2005. **39**(5): p. 529-33.
193. Labbe, A., et al., *Expression profiling of mouse embryonic fibroblasts with a deletion in the helicase domain of the Werner Syndrome gene homologue treated with hydrogen peroxide*. BMC Genomics, 2010. **11**: p. 127.

