

LA SÉNESCENCE CELLULAIRE

VARNA MARIANA^{1*}, ARTENIE VLAD²

Mots-cléf : sénescence cellulaire, drogues chimiothérapeutiques, oncogènes, Senescence Associated beta- Galactosidase (SA-beta-Gal)

Résumé :La sénescence cellulaire est un état d'arrêt irréversible ou réversible de la croissance des cellules somatiques. Cet arrêt peut être induit par différents stimuli exogènes (radiations UV, drogues chimiothérapeutiques) ou endogènes (activation des oncogènes Ras, Raf, stress oxydatif). En fonction des stimuli qui la déclenche, la sénescence peut être réplivative (après un certain nombre de divisions cellulaires) ou accélérée (induite par des lésions sur ADN, activation des oncogènes). Elle représente un programme de protection contre toute capacité de prolifération illimitée et est donc un mécanisme suppresseur des tumeurs, en inhibant la prolifération des cellules qui ont des lésions sur l'ADN.

1. GENERALITES SUR LA SENESCENCE CELLULAIRE

1.1. HISTORIQUE

Les organismes complexes ont au moins deux mécanismes de suppression d'une prolifération anormale afin d'éliminer le risque de transformation oncogénique : l'apoptose (ou la mort cellulaire programmée) et la sénescence cellulaire.

La sénescence cellulaire est définie comme un programme physiologique induit par le raccourcissement des télomeres ou par d'autres stress. Le phénomène a été observé pour la première fois par Leonardo Hayflick sur des cellules normales en culture qui, après un certain nombre de divisions cellulaires arrêtaient de se diviser [14].

Cet arrêt normal est induit par le raccourcissement des télomères. Les télomères sont des complexes nucléoprotéiques constitués d'une répétition de nucléotides TTAGGG, dont le rôle est de préserver l'intégrité des chromosomes, d'éviter la dégradation et la fusion entre les chromosomes et pendant la réplication de positionner les chromosomes dans le noyau [9, 13, 15, 18, 19]. La longueur des télomères varie entre les chromosomes et entre les espèces. Chez l'homme elle varie de 5 à 15 kb. A chaque réplication de l'ADN, la longueur des télomères est raccourcie de 200 à 300 pb. Quand les télomères atteignent une longueur de 4-7 kb, la division cellulaire des cellules somatiques normales s'arrête d'une manière irréversible [13]. Inversement, dans les cellules tumorales la longueur des télomères peut être maintenue par l'enzyme télomèrase qui ajoute des répétitions télomériques au niveau des télomères [15].

La télomèrase est une enzyme ribonucléoprotéique responsable de la synthèse *de novo* et de la maintenance des répétitions télomérique. En absence de télomèrase la taille des télomères est raccourcie à chaque cycle cellulaire [34]. Une fois que les télomères atteignent une longueur critique la cellule envoie un signal de détresse et entre dans un état de sénescence. Ce signal peut être annulé si la cellule ne possède pas des protéines p53 ou pRB (Protéine Retinoblastome) fonctionnelles. Dans ce cas, la cellule continue à se diviser et les télomères continuent à se raccourcir jusqu'au moment où ils peuvent causer une instabilité chromosomique qui serait responsable d'un « état de crise ».

Plus récemment a été introduit le terme de *sénescence accélérée*, attribué aux cellules en arrêt du cycle cellulaire ayant subi un stress oxydatif, des lésions sur ADN ou, après un traitement par des agents chimiothérapeutiques comme la doxorubicine, le cisplatine, le taxol ou la vincristine [8, 32]. Les lésions de l'ADN pouvant aussi induire un raccourcissement des télomères du à des divisions rapides, la sénescence accélérée reste donc non-distinguable de la sénescence réplivative [27].

1.2. SENESCENCE INDUITE PAR DES DROGUES CHIMIOTHERAPEUTIQUES

Les cellules tumorales peuvent entrer en sénescence en réponse à des lésions de l'ADN. Ces lésions peuvent être induites par des drogues chimiothérapeutiques comme la doxorubicine [12, 35], aphidicolin, cisplatine [36], camptothecin, bromodeoxyuridine ou par des radiations. Même à des doses faibles les cellules peuvent entrer en sénescence [4].

Il a été observé dans 10% des cellules en culture l'apparition d'un phénotype sénescence sans avoir été préalablement traitées par une chimiothérapie. Ceci suggère que la sénescence dans les cellules tumorales pourrait se développer spontanément, probablement en réponse à des changements subtils de l'environnement cellulaire [4, 25]. Il a été montré sur des cellules de lymphome murin, avec le locus INK4a/ARF (Alternative Reading Frame) intact et une protéine p53 fonctionnelle, qu'il y a une entrée en sénescence suite à un traitement par la cyclophosphamide. Ceci n'est pas le cas pour les cellules ayant des mutations dans p53 et INK4a/ARF qui sont plus résistantes aux drogues et à l'apoptose [31].

Dans les tumeurs humaines un rôle particulier est attribué à la sénescence induite par les drogues chimiothérapeutiques et pourrait être un facteur déterminant pour le traitement du cancer du sein et du poumon [23, 35].

Un autre effet principal des agents anti-tumoraux est la catastrophe mitotique, qui induit la mort cellulaire due à des mitoses anormales et à la formation de micro-noyaux [26].

1.3. SÉNESCENCE INDUITE PAR LES ONCOGENES

Il a été mis en évidence par des études *in vitro* [33] ou *in vivo* [6,7] que les oncogènes peuvent induire un signal d'arrêt du cycle cellulaire et d'entrée en sénescence et cette entrée pourrait être un mécanisme de protection contre le cancer. Sur des études *in vitro* il a été observé que l'expression de l'oncogène Ras dans les cellules primaires humaines ou murines peut induire un arrêt permanent en G₁ avec les caractéristiques de la sénescence cellulaire incluant un marquage positif avec la SA-beta-Gal, la surexpression, de la p16^{INK4a} et l'hypophosphorylation de la pRB. Cet arrêt est phénotypiquement indistinguishable de la sénescence cellulaire. De plus l'inactivation de la p16 ou de la p53 peut annuler l'entrée en sénescence induite par l'expression de Ras[33, 40].

La sénescence induite par les oncogènes peut apparaître pendant les stades précoces de la tumorigénèse. L'association de la sénescence avec des lésions pré-malignes (cellules ayant une morphologie normale et pas de croissance invasive) pourrait être un outil de détection précoce des lésions tumorales [8].

1.4. ETAPES DANS L'INDUCTION DE LA SÉNESCENCE REPLICATIVE ET ACCELEREE

Les événements clés dans la sénescence réplivative et accélérée sont données dans la **figure 1**.

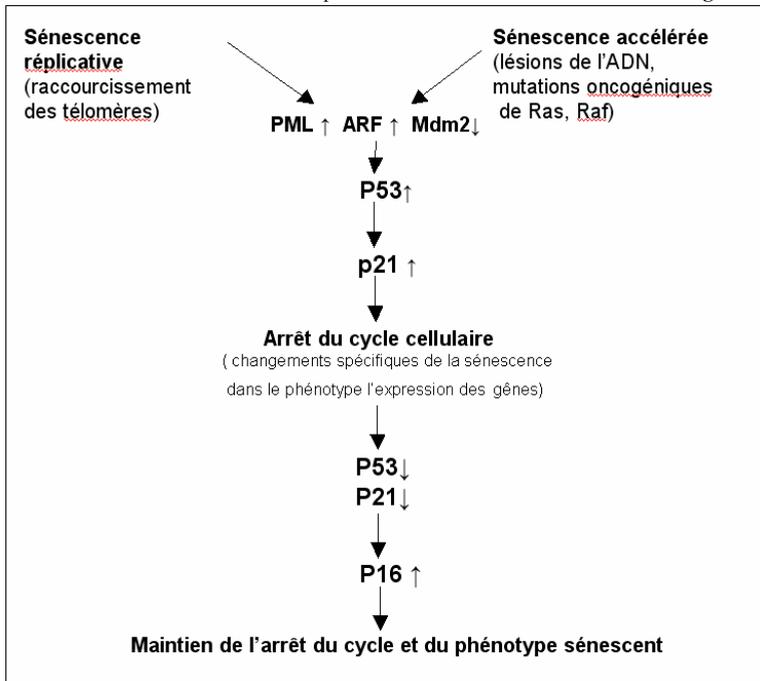


Figure 1. Étapes dans la sénescence réplivative et accélérée [24].

(PML= Promyelocytic Leukemia ; ARF= Alternative Reading Frame ; Mdm2= Mouse double minute 2)

L'arrêt de la croissance dans les cellules sénéscentes est initié avec l'activation de p53. Dans le cas de la sénescence réplivative, la protéine p53 est stabilisée via la protéine p14^{ARF}, un suppresseur de tumeurs, qui séquestre la protéine Mdm2 responsable de la dégradation de p53 [39]. Une autre protéine qui stimule p53 dans les conditions de la sénescence réplivative et de la sénescence accélérée est PML (Promyelocytic Leukemia), codée par un gène considéré comme un gène suppresseur de tumeurs, qui régule l'acétylation de p53 [22]. L'activation de ces gènes a des multiples effets sur l'expression d'autres gènes, le plus important étant l'activation de la p21^{CIP}, un inhibiteur des complexes cyclines /CDK. L'activation de p21^{CIP} a comme effet l'arrêt du cycle et des changements spécifiques à la sénescence au niveau du phénotype cellulaire et de l'expression des gènes. Mais, l'activation de p53 et de p21^{CIP} dans ces cellules est

seulement transitoire, car un autre inhibiteur des CDKs, la protéine p16^{Ink4a} est ensuite sur-exprimé. Ceci suggère que p16^{Ink4a} serait responsable de la maintenance de l'arrêt de la croissance dans les cellules sénescences [1].

1.5. CARACTERISTIQUES DES CELLULES SENESCENTES

La sénescence cellulaire est caractérisée par des changements physiologiques, structuraux, biochimiques et moléculaires. Les cellules en sénescence répliquative sont arrêtées avec une quantité d'ADN caractéristique de la phase G1 (2n) et n'entrent pas en phase S suite à des stimuli mitogènes [10]. Par contre les cellules en sénescence accélérée peuvent être arrêtées en phase G1, S ou G2 [35].

Les caractéristiques morphologiques des cellules sénescences sont : 1) cellules aplaties et vacuolisées avec un contour irrégulier ; 2) masse lysosomique augmentée ; 3) noyau avec des nucléoles très proéminents ; 4) mitochondries moins denses en microscopie électronique et 5) présence de vésicules de lipofuscine (produits de la peroxydation lipidique).

Parmi les caractéristiques biochimiques et moléculaires on peut citer : 1) modifications de l'activité enzymatique comme l'augmentation de l'activité SA-β-Gal ; 2) sur-expression des inhibiteurs du cycle cellulaire : p21^{CIP}, p53, p16^{Ink4a}, PML, p15^{Ink4b} ; 3) baisse du potentiel métabolique et régénérateur et 4) résistance à la mort par apoptose (pour une longue période de temps) [30].

La beta-galactosidase serait une hydrolase localisée dans les lysosomes [17] qui clive les résidus beta-D-galactose en beta-galactosides. L'activité de l'enzyme est maximale à un pH 3-5 [16]. En 1995 un article souligne que seulement à un pH 6 les cellules sénescences (et non pas quiescentes) peuvent donner une coloration bleue après l'incubation avec le substrat X-Gal [10].

Au niveau de la chromatine on observe la formation de SAHFs (Senescence Associated heterochromatin foci), méthylation locale de la lysine 9 de l'histone H3 et recrutement local de la protéine HP1 [30].

La sénescence diffère des autres formes d'arrêt du cycle cellulaire comme la quiescence (voir **table 1**).

Table 1

Comparaison entre la sénescence et la quiescence (d'après [34] avec modifications)

Sénescence vs quiescence	sénescence	quiescence
Stabilité	permanente	réversible
Induction	raccourcissement des télomères lésions sur ADN prolongés stress oxydatif activation des oncogènes	absence du sérum privation en facteurs de croissance croissance à densité élevée
Expression de SA-beta gal	oui	non
Foci de SA hétérochromosome	oui	non
Marqueurs moléculaires	augmentation de l'expression de PAI, p16INK4a, ARF, p53, p21, pRB	expression réduite de de PAI, p16INK4a, ARF, p53, p21, pRB

2. LA SENESCENCE EST UN MECANISME SUPPRESSEUR DES TUMEURS ?

Les cellules somatiques humaines n'expriment pas la télomerase et donc ont une durée de vie limitée. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la sénescence est un mécanisme de protection contre la prolifération anormale et ainsi contre le cancer [19].

Donc les deux types de sénescence répliquative et accélérée pourrait être des mécanismes de protection contre la prolifération anormale [27]. La sénescence répliquative impose un nombre limité de divisions cellulaires et peut interférer avec la croissance tumorale. Si des cellules, avec une longueur des télomères réduite suite à des divisions successives continuent à proliférer, elles peuvent accumuler des aberrations chromosomiques qui peuvent amener à une prolifération anormale [19, 28].

La sénescence accélérée pourrait être plutôt le programme principal contre l'accumulation des mutations oncogéniques ou de la prolifération des cellules avec des lésions sur l'ADN. Rarement des cellules normales peuvent dépasser ce point d'arrêt par l'activation de la télomerase et donc par la stabilisation des télomères. Ainsi le développement d'une prolifération anormale peut commencer [20].

L'arrêt irréversible en G1/ S pourrait être du à des phénomènes de remodelage de la chromatine qui sélectionne spécialement les gènes de la phase S. Ainsi, dans les cellules sénescences induites par l'activation de Ras il a été montré l'apparition des SAHFs (Senescence Associated heterochromatin Foci) [37].

Récemment il a été montré que la voie d'activation des oncogènes Ras ou Raf peut induire la sénescence cellulaire comme mécanisme principal de suppression de tumeurs *in vivo*. L'absence de croissance cellulaire associée avec une expression de p16^{INK4a} élevée, marquage perinuclease positif pour la SA-β-Gal et marquage nucléaire pour HP1 souligne la formation des SAHF, donc une répression transcriptionnelle locale et ceci est trouvé dans la sénescence induite par des oncogènes dans des lésions d'origine humaine ou murine [3, 7].

La sénescence cellulaire n'est pas observée en réponse à tout stimulus oncogénique. Des études sur des cellules primaire *in vitro* suggèrent qu'une activation constitutive de Myc induit plutôt une réponse apoptotique via l'activation de la voie p53/ARF, tandis que l'oncogène RAS induit une entrée des cellules dans un arrêt de type sénescence et ceci est associé à des niveaux élevés de ARF, p16^{INK4a} et p53 [21, 30, 33, 41].

3. LA SENESCENCE CELLULAIRE COMME DETERMINANT DE LA REPONSE *IN VIVO*

La chimiothérapie et les radiations peuvent induire la mort cellulaire ou la sénescence. Le rôle de la sénescence cellulaire comme déterminant de la réponse *in vitro* à différents agents chimiothérapeutiques a été démontré sur différentes lignées cellulaires avec ou sans mutation de *TP53*. Onze sur quatorze lignées traitées avec des doses modérées (30 nM) de la doxorubicine ont montré un phénotype qui ressemble à la sénescence [4]. Le même auteur démontre sur des lignées de cancer du colon traitées avec des doses de doxorubicine que p53 et p21 agissent comme des modulateurs de l'induction de la sénescence cellulaire mais leur présence n'est pas absolument nécessaire car des cellules avec des délétions homozygotes de p53 et de p21 ont eu une induction de sénescence très basse mais aussi une augmentation des catastrophes mitotiques [4].

Des études *in vivo* montrent aussi un marquage positif pour la SA-beta-Gal mis en évidence sur des xénogreffes de tumeurs humaines chez la souris nude, traitées avec des acides rétinoïques [4] ou avec de la doxorubicine [5]. Une autre étude montre que des cellules sénescents ont été détectées aussi sur du tissu provenant de patients ayant reçu cyclophosphamide – adriamycine – 5 fluorouracil et contrairement aux tumeurs non traitées, les échantillons présentaient un marquage assez élevé pour la SA-beta-galactosidase associé à une expression élevée de la p16^{INK4a}. Les lésions sur ADN serait capables d'induire la sénescence dans les cellules tumorales avec une protéine p53 fonctionnelle [35]. Dans cette étude l'apoptose et la sénescence apparaissent être induites par p53 suite à des lésions sur ADN et pourrait être des voies alternatives pour la réponse à la chimiothérapie. Dans le même sens Schmitt et al.[31] montre une absence totale d'induction de sénescence dans les lymphomes Eu-myc traités avec de la cyclophosphamide et déficients en p53 et en p16^{INK4a} [31].

Mais, si la sénescence induite par les drogues chimiothérapeutiques a une vraie importance clinique, les mécanismes qui permettent aux cellules tumorales de dépasser cet arrêt doivent contribuer au mécanisme de résistance aux drogues. De plus il n'est pas possible de distinguer un arrêt irréversible d'un arrêt à long terme réversible. Des expériences *in vitro* ont démontré que des cellules sénescents re-entrent en cycle après l'acquisition de nouvelles mutations qui bloquent la sénescence [2, 11, 29]. La sortie de l'état de sénescence *in vivo* joue un rôle essentiel dans la réponse au traitement [31].

La sénescence induite par des oncogènes apparaît très rapidement *in vitro* pendant que *in vivo* elle est plus retardée. L'induction de la sénescence par les drogues chimiothérapeutiques *in vivo* est une conséquence de l'environnement cellulaire et de la cellule elle même [30].

CONCLUSION/PERSPECTIVES

La sénescence cellulaire représente une limitation dans la capacité proliférative des cellules humaines. Cette limitation est accompagnée des changements dans l'expression génique et de la morphologie cellulaire. Elle est donc un programme de protection de l'organisme contre la prolifération cellulaire mais en même temps il pourrait participer à la réponse aux traitements par des drogues chimiothérapeutiques.

L'élucidation des aspects biologiques de la sénescence dans les tumeurs est importante pour développer des nouvelles stratégies thérapeutiques. La compréhension et l'utilisation de la sénescence dans la thérapie anti-tumorale fait actuellement l'objet de nombreuses recherches.

BIBLIOGRAPHIE

1. Alcorta, D.A., et al., 1996 - *Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(24): p. 13742-7.

2. Beausejour, C.M., et al., 2003 - *Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways*. *Embo J*, 22(16): p. 4212-22.
3. Braig, M., et al., 2005 - *Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development*. *Nature*, 436(7051): p. 660-5.
4. Chang, B.D., et al., 1999 - *A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents*. *Cancer Res*, 59(15): p. 3761-7.
5. Chang, B.D., et al., 2002 - *Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(1): p. 389-94.
6. Chen, Z., et al., 2005 - *Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis*. *Nature*, 436(7051): p. 725-30.
7. Collado, M., et al., 2005 - *Tumour biology: senescence in premalignant tumours*. *Nature*, 436(7051): p. 642.
8. Collado, M. and M. Serrano, 2006 - *The power and the promise of oncogene-induced senescence markers*. *Nat Rev Cancer*, 6(6): p. 472-6.
9. de Lange, T., 2002 - *Protection of mammalian telomeres*. *Oncogene*, 21(4): p. 532-40.
10. Dimri, G.P., et al., 1995 - *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(20): p. 9363-7.
11. Dirac, A.M. and R. Bernards, 2003 - *Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53*. *J Biol Chem*, 278(14): p. 11731-4.
12. Elmore, L.W., et al., 2002 - *Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction*. *J Biol Chem*, 277(38): p. 35509-15.
13. Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider, 1990 - *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts*. *Nature*, 345(6274): p. 458-60.
14. Hayflick, L., 1965 - *The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains*. *Exp Cell Res*, 37: p. 614-36.
15. Kim, N.W., et al., 1994 - *Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer*. *Science*, 266(5193): p. 2011-5.
16. Krishna, D.R., et al., 1999 - *Does pH 6 beta-galactosidase activity indicate cell senescence?* *Mech Ageing Dev*, 109(2): p. 113-23.
17. Lee, B.Y., et al., 2006 - *Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase*. *Aging Cell*, 5(2): p. 187-95.
18. Maser, R.S. and R.A. DePinho, 2002 - *Connecting chromosomes, crisis, and cancer*. *Science*, 297(5581): p. 565-9.
19. MATHON, N.F. and A.C. LLOYD, 2001 - *Cell senescence and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 1(3): p. 203-13.
20. Morales, C.P., et al., 1999 - *Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase*. *Nat Genet*, 21(1): p. 115-8.
21. Palmero, I., C. Pantoja, and M. Serrano, 1998 - *p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras*. *Nature*, 395(6698): p. 125-6.
22. Pearson, M., et al., 2000 - *PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras*. *Nature*, 406(6792): p. 207-10.
23. Roberson, R.S., et al., 2005 - *Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers*. *Cancer Res*, 65(7): p. 2795-803.
24. Roninson, I.B., 2002 - *Tumor senescence as a determinant of drug response in vivo*. *Drug Resist Updat*, 5(5): p. 204-8.
25. Roninson, I.B., 2002 - *Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts*. *Cancer Lett*, 179(1): p. 1-14.
26. Roninson, I.B., E.V. Broude, and B.D. Chang, 2001 - *If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells*. *Drug Resist Updat*, 4(5): p. 303-13.
27. Roninson, I.B. and M. Dokmanovic, 2003 - *Induction of senescence-associated growth inhibitors in the tumor-suppressive function of retinoids*. *J Cell Biochem*, 88(1): p. 83-94.
28. Rudolph, K.L., et al., 1999 - *Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice*. *Cell*, 96(5): p. 701-12.
29. Sage, J., et al., 2003 - *Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry*. *Nature*, 424(6945): p. 223-8.
30. Schmitt, C.A., 2007 - *Cellular senescence and cancer treatment*. *Biochim Biophys Acta*, 1775(1): p. 5-20.
31. Schmitt, C.A., et al., 2002 - *A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy*. *Cell*, 109(3): p. 335-46.
32. Serrano, M. and M.A. Blasco, 2001 - *Putting the stress on senescence*. *Curr Opin Cell Biol*, 13(6): p. 748-53.
33. Serrano, M., et al., 1997 - *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a*. *Cell*, 88(5): p. 593-602.

34. Sharpless, N.E. and R.A. DePinho, 2004 - *Telomeres, stem cells, senescence, and cancer*. J Clin Invest, 113(2): p. 160-8.
35. te Poele, R.H., et al., 2002 - *DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo*. Cancer Res, 62(6): p. 1876-83.
36. Wang, X.D., et al., 2003 - *[Changes of STAT3 in cell replicative senescence and effects of angiotensin II on STAT3]*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 83(4): p. 324-7.
37. Zhang, R., et al., 2005 - *Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA*. Dev Cell, 8(1): p. 19-30.
38. Zhang, X., et al., 2005 - *The ATM/p53/p21 pathway influences cell fate decision between apoptosis and senescence in reoxygenated hematopoietic progenitor cells*. J Biol Chem, 280(20): p. 19635-40.
39. Zhang, Y., Y. Xiong, and W.G. Yarbrough, 1998 - *ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways*. Cell, 92(6): p. 725-34.
40. Zhu, J., et al., 1998 - *Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf*. Genes Dev, 12(19): p. 2997-3007.
41. Zindy, F., et al., 1998 - *Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization*. Genes Dev, 12(15): p. 2424-33.

1 - INSERM U728 et UNIVERSITÉ PARIS 7 DENIS DIDEROT, PARIS, FRANCE ;

2 - UNIVERSITÉ „ALEXANDRU IOAN CUZA”, FACULTÉ DE BIOLOGIE, LABORATOIRE DE BIOCHIMIE, IAȘI, ROUMANIE

* - mariannavarna@yahoo.fr