

La réponse des cellules aux stress : relation avec le processus de vieillissement et la pathologie

Olivier Toussaint, Martine Raes, Carine Michiels, José Remacle

La sénescence répliquative in vitro est caractérisée par un ralentissement puis un arrêt irréversible de la multiplication des types cellulaires prolifératifs. Des stress sublétaux peuvent accélérer le processus de vieillissement cellulaire et entraîner l'apparition de ses principaux marqueurs que sont l'altération morphologique, le raccourcissement des télomères, la perte du processus prolifératif. L'étude fondamentale des processus cellulaires et moléculaires

liés, en particulier, aux modifications irréversibles dues à l'effet de stress non létaux peut être replacée dans le contexte des affections liées au vieillissement. Une interprétation globale fondée sur la théorie de la thermodynamique des systèmes ouverts loin de l'équilibre permet d'expliquer comment des stress de diverses natures physico-chimiques peuvent entraîner un vieillissement accéléré des cellules.

Les progrès de la biologie cellulaire sont remarquables dans la compréhension des réponses que les cellules mettent en œuvre lors de variations de leur environnement. Après l'apport de la biochimie sur le métabolisme et sa régulation, la biologie moléculaire et la mise en évidence des cascades de régulation impliquant les kinases et les phosphatases ont permis de lier les stimulations ou les *stress* se produisant à l'extérieur des cellules à leurs réponses métaboliques et à la régulation de leur expression génique.

Dans notre laboratoire, nous avons abordé trois aspects particuliers de la réponse cellulaire. Le premier concerne le processus du vieillissement des cellules, influence du temps sur l'évolution du comportement des cellules. Nous avons montré qu'il est possible d'accélérer ce processus en appliquant des *stress*, notamment des *stress* oxydatifs, sur des fibroblastes en culture. Nous développerons pourquoi ces résultats expérimentaux ne peuvent s'expli-

quer qu'en les replaçant dans une approche plus globale du fonctionnement de la cellule.

La deuxième étude porte sur le comportement des cellules en condition d'hypoxie sévère. Cette situation, qui mime la stase veineuse, a permis non seulement de mettre en évidence un mécanisme d'activation des cellules endothéliales par l'hypoxie, mais aussi les effets de l'hypoxie sur les interactions des cellules endothéliales avec les cellules sanguines et les autres cellules de la paroi veineuse. Cette cascade d'interactions cellulaires induites par l'hypoxie pourrait notamment conduire aux modifications physiopathologiques caractéristiques des veines variqueuses.

Enfin, d'autres recherches portent sur les mécanismes régulateurs qui contrôlent la réponse cellulaire des fibroblastes en culture, stimulés par le facteur de croissance dérivé des plaquettes sanguines (ou PDGF) ou par de l'interleukine-1, et plus spécifiquement sur l'étude des voies d'activation et d'inhibition qui s'enclenchent lors de ces stimula-

tions afin de moduler la réponse cellulaire [1, 2].

Dans cet article, nous aborderons principalement le premier de ces thèmes, à savoir comment on peut aborder le problème du vieillissement des cellules au niveau expérimental et au niveau théorique et comment on peut comprendre les effets des *stress* sur ce processus.

Le vieillissement des cellules prolifératives en culture

Historiquement, les problèmes posés par les études sur le vieillissement cellulaire se confondent avec les progrès techniques successivement réalisés en culture de cellules. Les travaux d'Alexis Carrel avaient suggéré l'immortalité des cellules lorsqu'elles sont retirées de l'organisme et mises en culture [3] et ce mythe s'est maintenu au moins jusque dans les années 1950. On a montré par la suite que les résultats de Carrel provenaient d'un artéfact expérimental, à savoir la présence de nouvelles cellules

dans le milieu de culture [4]. Ce sont les travaux de L. Hayflick au début des années 1960 qui montrèrent que les fibroblastes d'embryon humain se divisent un nombre limité de fois, correspondant à environ 50 passages en culture [5], excepté en cas de transformation cellulaire. Hayflick a aussi introduit la notion qu'il existe trois phases dans l'évolution des cultures, à savoir la phase I correspondant à la mise en culture à partir du tissu, la phase II correspondant à une croissance rapide et donc à une multiplication exponentielle des cellules, suivie d'un ralentissement et finalement de l'arrêt irréversible de la croissance ou phase III. Depuis, on a observé que ce modèle, dorénavant appelé limite de Hayflick ou sénescence répllicative, peut être généralisée à de nombreux types cellulaires prolifératifs, et est valable pour de nombreuses espèces animales.

Ce modèle de vieillissement des cellules en culture a servi de base à des centaines de travaux car il offre aux chercheurs la possibilité de disposer de manière presque illimitée de populations de cellules jeunes et vieilles et donc de réaliser des travaux comparatifs sur leur composition, leur comportement, leur stimulation, leur régulation, etc. [6]. La validation du modèle par rapport au vieillissement des cellules de l'organisme a aussi fait l'objet de très nombreux travaux et fut parfois à l'origine de polémiques. Parmi toutes les observations qui ont tenté de valider ce modèle, les plus significatives restent celles de l'équipe de Martin *et al.* [7] qui montrent que le nombre maximum de passages en culture diminue lorsque l'âge de l'individu donneur de fibroblastes augmente et cela malgré une grande variabilité individuelle.

Certaines variations sont cependant observées entre espèces, notamment sur le plan de la morphologie cellulaire. Ainsi les études du groupe de Bayreuther, à Stuttgart, montrèrent qu'il est possible de classer les fibroblastes humains selon sept morphologies bien distinctes qui se succèdent au cours des divers passages en culture des fibroblastes humains [8]. Sur la *figure 1*, nous montrons, d'une part, une culture de fibroblastes

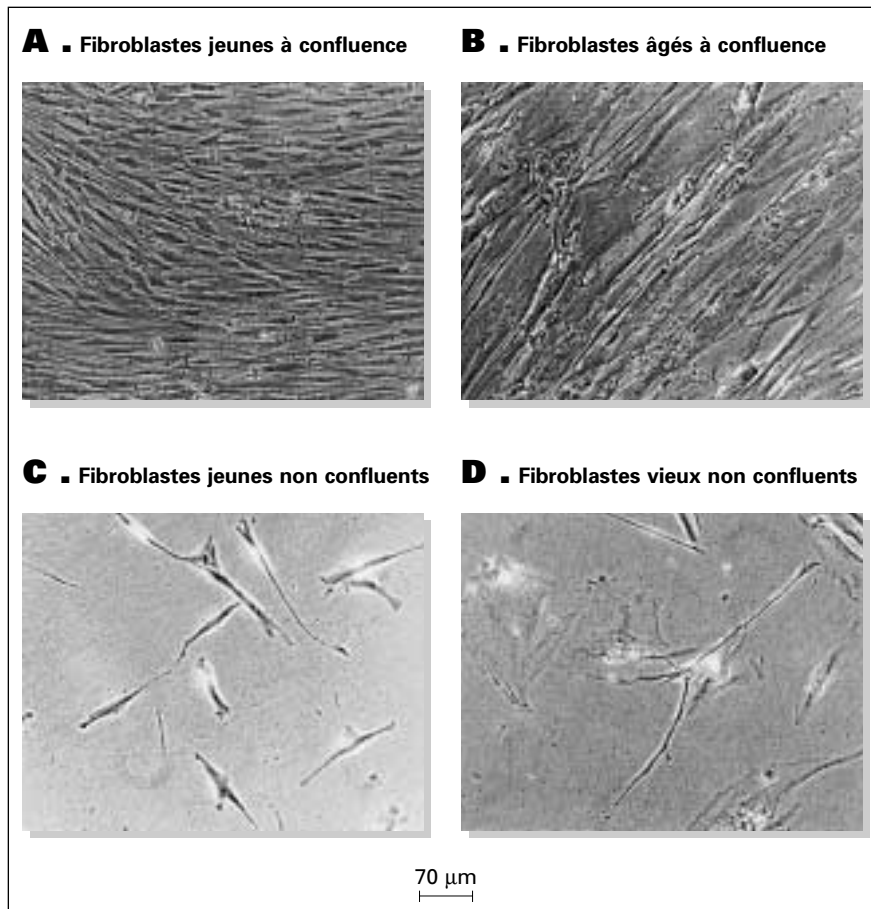


Figure 1. **Fibroblastes humains WI-38 en culture** à confluence aux passages en culture 23 (A) et 49 (B) ou lorsqu'ils sont cultivés à très faible densité (700 cellules/cm²) aux passages en culture 18 (C) et 49 (D), représentant respectivement 37% et 100% de la durée de vie proliférative in vitro de ces cellules.

jeunes et vieux comme on les observe lorsque l'on réalise des cultures successives et, d'autre part, les mêmes cellules mais repiquées à une forte dilution (1/16) et observées deux jours plus tard. Dans ces conditions, les cellules ont la possibilité de s'étaler et des différences entre les morphologies apparaissent très nettement. Bayreuther proposa d'appeler morphotypes ces différentes morphologies apparaissant au cours du vieillissement des fibroblastes. La *figure 2* montre les divers morphotypes observés pour des fibroblastes de poumon fœtal humain de la souche AG04432. Bayreuther avait proposé que ces morphotypes représentaient des états distincts de différenciation, mais aucun argument décisif n'a jamais été avancé en

faveur de cette hypothèse, de même qu'aucun argument expérimental n'a jamais démontré s'il s'agit d'un processus continu ou discret. Cependant, l'analyse de différentes morphologies cellulaires s'est avéré un excellent outil pour étudier, par exemple, un effet éventuel d'accélération du processus de vieillissement lors de *stress* sublétaux.

Dans les cultures jeunes apparaissent principalement trois morphotypes de petite taille et qui se divisent activement (morphotypes I, II et III). En revanche, dans les vieilles cultures, une grande majorité des fibroblastes sont postmitotiques et de taille de plus en plus élevée. On peut également les répartir en trois morphotypes différents suivant leur forme et leur taille (morphotypes IV, V et VI).

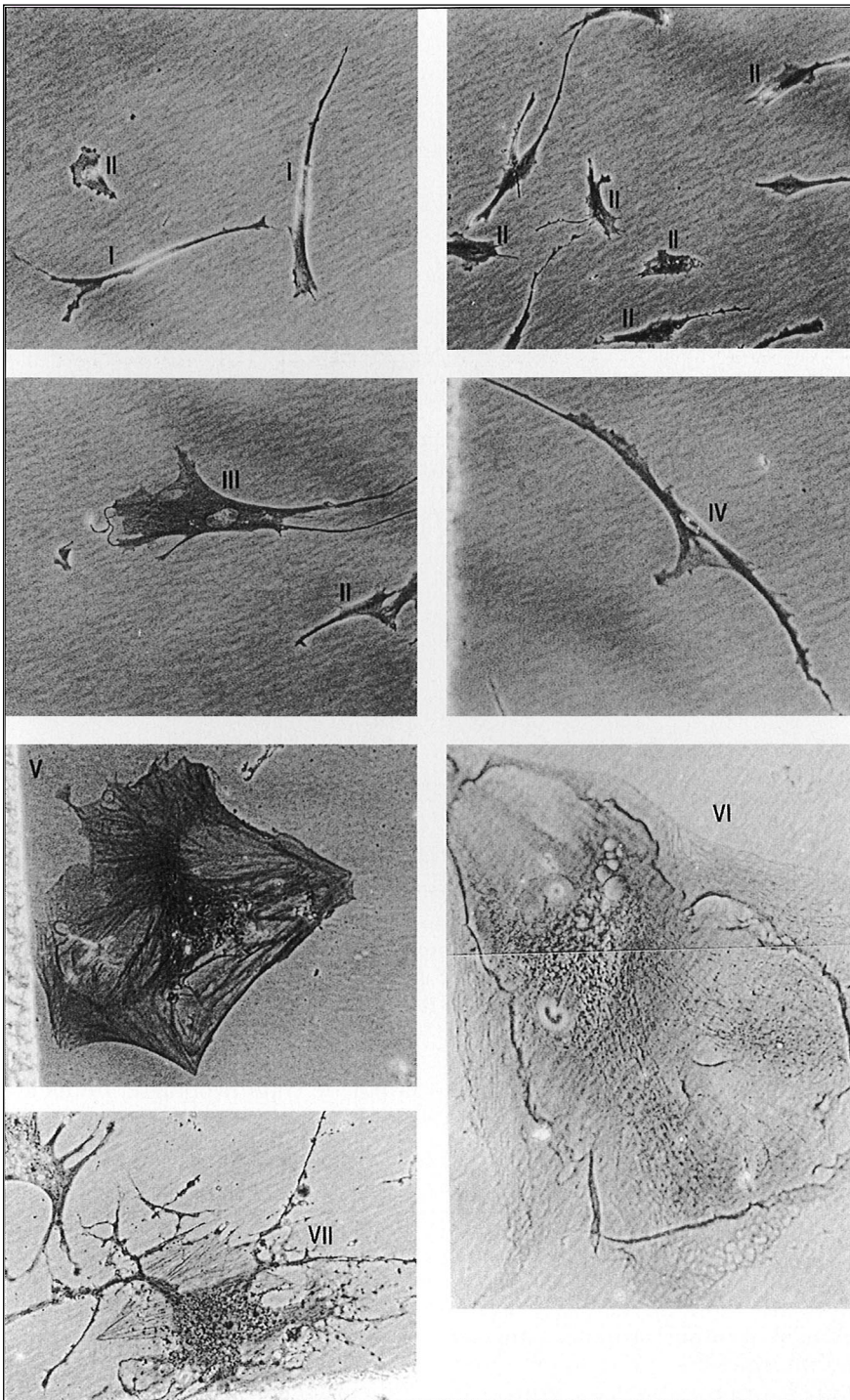


Figure 2. **Morphotypes mitotiques et postmitotiques des fibroblastes humains de poumon fœtal AG04432.** (1) Fibroblaste mitotique MF I, (2) fibroblaste mitotique MF II, (3) fibroblaste mitotique MF III, (4) fibroblaste postmitotique PMF IV, (5) fibroblaste post-mitotique PMF V, (6) fibroblaste postmitotique PMF VI, (7) fibroblaste postmitotique en dégénérescence PMF VII.

Le septième morphotype correspond à des cellules nécrotiques. Dans le cas des fibroblastes, il s'agit bien d'une

nécrose et le processus d'apoptose est rare ou inexistant du fait que les fibroblastes âgés voient leur mitose

inhibée en phase G1 du cycle cellulaire, empêchant ainsi l'engagement des cellules en apoptose.

Des fibroblastes ont été suivis individuellement en microscopie optique et on a montré qu'ils forment des clones de fibroblastes présentant le morphotype du fibroblaste de départ, lorsqu'il s'agit d'un morphotype prolifératif. Des fibroblastes présentant le morphotype suivant apparaissent par la suite, d'abord en périphérie du clone. Ces études montrent bien que la présence de morphotypes différents dans les cultures résulte de l'apparition d'un morphotype plus « âgé » à partir de morphotypes plus « jeunes » et non d'une sélection de morphotypes au cours des passages en culture.

Des études microscopiques réalisées à partir de cellules WI-38 cultivées à très faible densité ont montré que les morphotypes I et II peuvent se diviser de deux manières. La première consiste en une division symétrique pour donner naissance respectivement à deux morphotypes I ou II selon que la cellule de départ est respectivement un morphotype I ou II. La seconde conduit à une division asymétrique produisant soit un morphotype I et un morphotype II, soit un morphotype II et un morphotype III selon que la cellule de départ est respectivement un morphotype I ou II. Enfin, les morphotypes IV apparaissent toujours à partir de la division symétrique d'un morphotype III. Les observations que les fibroblastes passent progressivement par ces différents morphotypes ont été réalisées lors de passages en culture successifs de fibroblastes humains de poumon fœtaux de souche WI-38 [9] et AG04432, et de fibroblastes humains de peau adulte de souche HH-8 [8].

Nous présentons, sur la *figure 3*, l'évolution des proportions relatives de ces divers morphotypes au cours des passages en culture des fibroblastes AG04432. Les fibroblastes de morphotype I ne représentent déjà plus que 10 % des fibroblastes au quinzième passage en culture et disparaissent assez rapidement. La proportion des fibroblastes de morphotype II est encore de 90 % au quinzième passage en culture pour diminuer par la suite

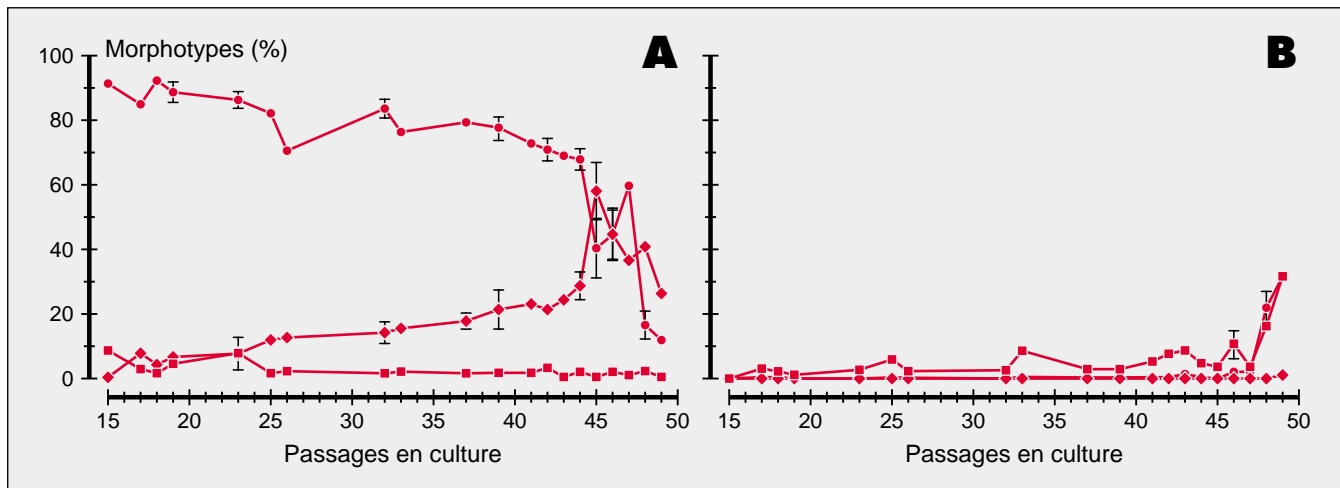


Figure 3. **Proportions des morphotypes des fibroblastes AG04432 en fonction des passages en culture.** A. Morphotypes mitotiques I (■), II (●) et III (◆). B. Morphotypes postmitotiques IV (■), V (●) et VI (◆).

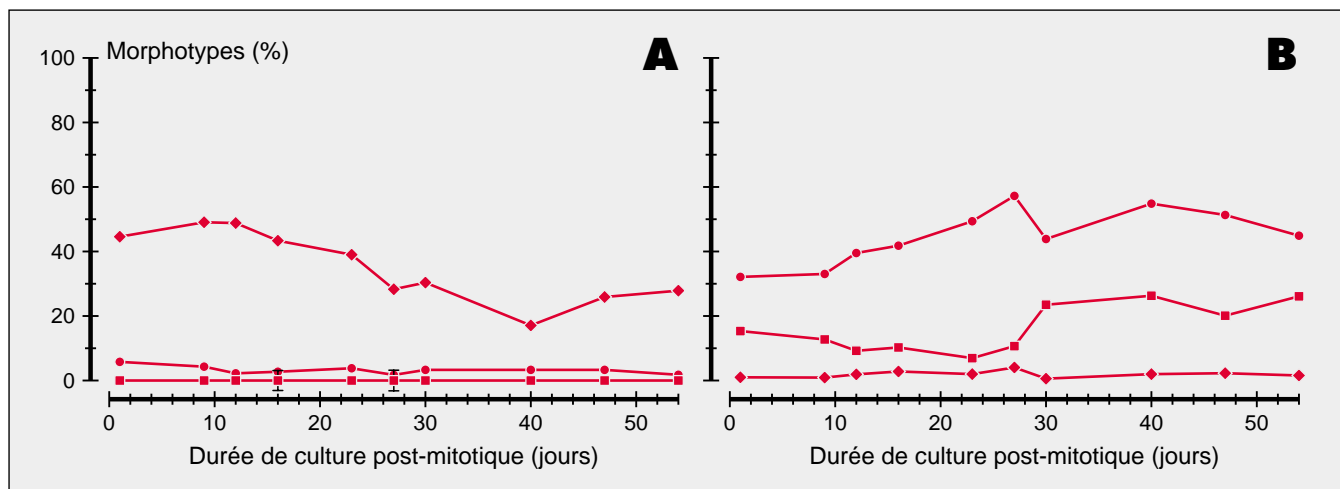


Figure 4. **Évolution de la proportion des morphotypes des fibroblastes AG04432 maintenus en culture après le dernier passage.** A. Morphotypes mitotiques I (■), II (●) et III (◆). B. Morphotypes postmitotiques IV (■), V (●) et VI (◆). Le milieu de culture est changé chaque semaine.

au profit des fibroblastes de morphotype III. Enfin les morphotypes postmitotiques IV, V et VI apparaissent lentement et s'accumulent lors des tout derniers passages en culture. Il est possible de conserver les fibroblastes devenus postmitotiques pendant plusieurs mois en changeant régulièrement le milieu de culture. La figure 4 donne l'évolution des proportions des morphotypes dans de telles cultures postmitotiques. On observe que les fibroblastes de morphotype III disparaissent progressivement au bénéfice des morphotypes IV à VI. L'évolution des proportions des morphotypes successifs au cours des passages en culture est similaire chez les

trois souches fibroblastiques citées ci-dessus, de même que l'évolution des proportions de morphotypes postmitotiques lors de cultures stationnaires. Quelle est la signification biologique de ce processus de passage des cellules par ces divers morphotypes? En ce qui concerne les morphotypes mitotiques, trois étapes successives ont été mises en évidence lors de la phase proliférative des cultures de fibroblastes humains par des méthodes totalement différentes appliquées *in vivo* ou *in vitro*. Les critères utilisés dans cette étude étaient la prolifération cellulaire, le rapport cytoplasme/noyau, le degré de condensation du noyau et la synthèse

des composants majeurs de la matrice extracellulaire [10]. Des analyses biochimiques ont aussi montré que ces différents morphotypes présentent des différences dans les profils d'expression protéique. En effet, les analyses en gels à deux dimensions révèlent des différences quantitatives et qualitatives dans la synthèse des protéines de ces divers morphotypes [11]. Ces expériences ont été réalisées de la manière suivante: des populations restreintes de fibroblastes présentant une homogénéité pour un morphotype donné furent isolées du reste de la culture par un anneau de clonage. Des gels d'électrophorèse en deux dimensions

furent alors réalisés à partir des protéines marquées à la méthionine-³⁵S provenant des cellules ainsi isolées. Le rapport avec la situation *in vivo* a aussi été examiné et là aussi les cellules isolées de tissus âgés ont montré une composition en morphotypes proche de celle des vieilles cultures; c'est-à-dire avec une proportion plus grande en morphotypes III, IV et V que dans les cultures de cellules provenant de tissus jeunes.

Ces morphotypes correspondent donc bien à des cellules différentes ayant des systèmes de synthèse protéique et de régulation propres. Les raisons et les mécanismes par lesquels ces cellules modifient l'expression de leurs gènes ne sont pas encore connus. La morphologie qui permet de les distinguer dans les boîtes de culture est un aspect de ces changements. Le suivi des proportions entre les différents morphotypes au cours des cultures représente donc un outil très sensible pour caractériser le vieillissement d'une population de fibroblastes en culture. En 1995, la présence d'une activité β -galactosidase associée à la sénescence cellulaire a été mise en évidence (pour revue, voir [12]). Nous avons examiné ce marqueur en fonction des morphotypes et observé une excellente corrélation entre les morphotypes âgés et cette activité β -galactosidase détectée à pH 6.0. Plus un morphotype apparaît tardivement dans la culture (ou *in vivo*), plus élevé est le pourcentage de fibroblastes appartenant à ce morphotype présentant cette activité enzymatique spécifique (non publié).

Mécanismes moléculaires de la sénescence répllicative

Des cellules sénescents, on sait principalement qu'elles sont incapables de proliférer, qu'elles montrent des modifications de leur état de différenciation, des diminutions de leur capacité d'induire de nombreux gènes de réponse aux *stress*, et des modifications, à la hausse ou à la baisse, de l'expression de nombreux gènes constitutifs. Les cellules en phase de sénescence répllicative se trouvent bloquées en phase G1 du cycle cellulaire, dans un état où les

agents mitogènes sont incapables d'induire l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire. Cette incapacité d'induire la phase de synthèse de l'ADN n'est pas due à un effondrement généralisé des voies de transmission du signal déclenchées par les facteurs de croissance [12]. En fait, seul un petit nombre de gènes inductibles par les facteurs de croissance sont réprimés dans les cellules sénescents. On peut envisager le problème de la sénescence répllicative sous forme de trois questions. Quel est le mécanisme qui « compte » le nombre de divisions cellulaires? Pourquoi les cellules ne peuvent-elles plus entrer en phase S? Comment les *stress* et les stimulations cellulaires modulent-ils ces mécanismes?

Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer comment les cellules « comptent » le nombre de divisions qu'elles ont effectué. La première se fonde sur le raccourcissement des télomères, qui sont les extrémités des chromosomes linéaires, constituées de séquences fortement répétitives, TTAGGG chez les humains. Puisque l'ADN polymérase a besoin d'une amorce labile pour débiter la réplication unidirectionnelle 5'-3' de l'ADN, chaque réplication de l'ADN s'accompagne d'une perte de bases à l'extrémité 3' des télomères. *In vitro*, les fibroblastes perdent environ 50 paires de bases à chaque réplication, et *in vivo* environ 15 paires de bases par année supplémentaire d'âge des donneurs de cellules. Par ailleurs, on a montré que la longueur des télomères se stabilise et parfois augmente dans de nombreuses lignées de cellules immortelles. Récemment, on a montré que des fibroblastes de peau et des cellules épithéliales de la rétine transfectés avec le gène de la télomérase humaine non seulement possèdent des télomères plus longs par rapport aux cellules témoins non transfectées, mais surtout ne montrent pas d'augmentation d'activité β -galactosidase associée à la sénescence au cours des passages en culture et effectuent au moins 20 doublements de population en plus avant d'atteindre la phase de sénescence répllicative [13].

D'autres modifications de structure peuvent aussi empêcher une réplica-

tion normale des cellules, par exemple une diminution du nombre de nucléosomes par unité de longueur de la fibre d'ADN de 10 nm de diamètre, des modifications dans l'organisation de l'ADN en solénoïdes de 30 nm de diamètre, ou l'apparition d'ADN circulaire extrachromosomique, sans compter les délétions d'ADN mitochondrial et les échanges de séquences d'ADN entre le noyau et les mitochondries (pour une revue, [14]).

Quatre mécanismes au moins peuvent rendre compte de l'arrêt irréversible de la prolifération. Le premier est la répression de certains gènes de réponse précoce. Nous citerons ici trois gènes: *c-fos* qui code pour une sous-unité du facteur de transcription AP-1, et les gènes *Id1* et *Id2* qui codent pour des régulateurs négatifs de facteurs de transcription hélice-boucle-hélice. Les gènes *c-fos*, *Id1* et *Id2* sont nécessaires à l'entrée en phase S. Les mécanismes responsables de la répression de *Id1* et *Id2* sont inconnus. Le gène *c-fos* reste réprimé car le facteur de réponse au sérum (SRF) ne peut plus se lier à l'élément de réponse au sérum (SRE) dans son promoteur, du fait que SRF est hyperphosphorylé dans les cellules sénescents. En revanche, le gène *c-fos* reste inductible par les agents qui endommagent l'ADN, notamment par la voie des Jun-kinases [12].

Le second type de mécanisme est la répression de gènes normalement induits en fin de phase G1 et à la limite G1/S, dont ceux de certaines histones dépendant de la réplication, de la thymidine-kinase, de la thymidilate synthétase, et de la dihydrofolate réductase [15]. On sait que les cellules sénescents sont déficientes en facteur E2F, qui est un facteur de transcription hétérodimérique essentiel pour l'induction de nombreux gènes de la partie G1/S du cycle cellulaire [16], probablement du fait de la répression de E2F1, un composant de E2F réglé par le cycle cellulaire.

Troisièmement, on observe une répression de certaines cyclines et de kinases dépendantes de cyclines (CDK), notamment la sous-expression des cyclines A et B, de Cdc2 et le déficit d'activité des kinases dépendantes des cyclines E et D [17, 18]. Les cyclines A et Cdc2 nécessitent

l'activité de E2F pour leur expression [19].

Enfin, des inhibiteurs de croissance peuvent être exprimés de manière continue dans les cellules âgées, dont par exemple p21^{WAF1/CIP1} qui forme un complexe avec une variété de complexes cycline-CDK, par exemple les complexes de cycline-Cdk2 de la phase G1 [18]. Quant à la protéine de rétinoblastome pRb, elle devient normalement hyperphosphorylée lorsque la cellule est stimulée par un facteur de croissance. Cette hyperphosphorylation n'est plus observée chez les cellules sénescents, ce qui est sans doute lié à la diminution de l'activité des CDK à la suite de l'expression de p21^{WAF1/CIP1}. Concernant p53, son activité doit décliner pour que les cellules puissent entrer en phase S, ce déclin étant causé par l'induction du gène *mdm2*. Ce gène n'est plus induit par les mitogènes dans les cellules âgées (pour revue, voir [12]). Une interaction de p53 avec la poly-(APD-ribose)-polymérase a aussi été mise en évidence [20]. Mais il reste à savoir comment les *stress* et les stimulations cellulaires modulent ces mécanismes menant à la sénescence répliative.

Effet des stress non létaux sur le vieillissement des fibroblastes humains en culture

Le passage des fibroblastes par différents morphotypes a été mis à profit afin d'examiner quel pourrait être l'effet de *stress* non létaux sur le vieillissement des fibroblastes. On peut en effet considérer qu'il y a un vieillissement accéléré si la proportion des fibroblastes de morphotypes plus « âgés » augmente plus rapidement dans les cultures. Les *stress* sont définis comme des agents qui perturbent le bon fonctionnement des cellules. Nous avons étudié plusieurs types de *stress* sublétaux, dont celui causé par le tert-butylhydroperoxyde, un modèle de *stress* radicalaire, ou par l'éthanol [9, 21]. Les *stress* sous les UV ou la mitomycine C donnent les mêmes effets sur l'évolution des proportions des morphotypes [11], à la condition de ne pas être cyto-

toxiques. Expérimentalement, les cellules sont mises en présence des agents stressants pendant un temps court (de 20 à 60 min) ; le lendemain, elles sont sous-cultivées à faible densité et après 24 h supplémentaires les proportions des différents morphotypes sont déterminées au microscope optique. Un exemple de changement dans la proportion des morphotypes après cinq *stress* successifs, à raison d'un *stress* quotidien, en présence de tert-butylhydroperoxyde est illustré sur la figure 5. On observe que la proportion de ces morphotypes est devenue semblable à celle que l'on trouve dans des cultures de cellules vieilles, c'est-à-dire marquée par une forte diminution des morphotypes I et II et une augmentation des morphotypes III, IV et V. Il s'agit bien d'un « vieillissement » accéléré sous l'effet des *stress* et non pas d'une sélection de cellules par la mort des cellules de morphotypes I ou II, car ces *stress* sont réalisés de manière à éviter toute cytotoxicité. La détermination de la proportion des morphotypes est réalisée par deux observateurs différents et un système d'analyse d'image fondé sur un programme d'intelligence artificielle a été mis au point qui permet de classer les types cellulaires avec une incertitude de l'ordre de 10 %. Le suivi par microphotographie de fibroblastes après un *stress* a bien montré qu'il s'agissait du passage d'un morphotype à un autre, et non de la sélection d'un morphotype donné par mort d'autres morphotypes [9].

Ces données morphologiques ont été confirmées de plusieurs manières. Par exemple, la proportion des fibroblastes présentant une activité β -galactosidase spécifique de la sénescence cellulaire, augmente dans les cultures de fibroblastes ayant subi des *stress* successifs. On a aussi montré que ces cellules voient leur potentiel prolifératif altéré de manière irréversible.

D'autres travaux confirment que les *stress* entraînent bien un vieillissement accéléré des cellules. Ainsi, Von Zglinicki *et al.* (Berlin, Allemagne) ont montré, sur des fibroblastes humains exposés à une atmosphère d'oxygène enrichie à 40 %, un blo-

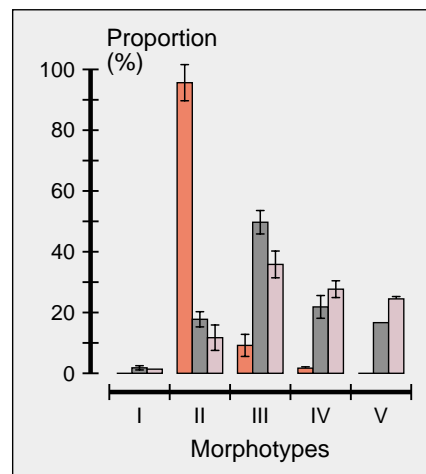


Figure 5. **Proportion des différents morphotypes observés dans une culture de fibroblastes WI-38** jeunes (passage en culture 27) (colonnes rouges), vieux (passage en culture 43) (colonnes grises), et de fibroblastes jeunes deux jours après avoir subi cinq *stress* successifs de 1 h en présence de tert-butylhydroperoxyde 100 μ M (colonnes bistres).

cage irréversible en phase G1 du cycle cellulaire, une accumulation de lipofuscine, une transition vers une morphologie typique de cellules âgées, et un raccourcissement accéléré de la longueur de leurs télomères [22]. Chen et Ames (Berkeley, CA, USA) ont aussi observé, après des *stress* non létaux en présence de peroxyde d'hydrogène, un blocage des cellules en phase G1, une morphologie typique de cellules âgées [23] ; l'expression de la protéine p21 inhibitrice de kinases dépendantes de cyclines est alors continue.

Une accélération similaire du processus du vieillissement *in vitro* par des *stress* peut être obtenue par des stimulations plus physiologiques. C'est ainsi que les stimulations répétées par l'interleukine-1 (IL-1) ou par le TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), accélèrent aussi le passage des fibroblastes des morphotypes I et II vers les morphotypes III, IV et V [24]. Ces cytokines induisent un *stress* oxydatif transitoire modifiant le potentiel redox cellulaire, et permettent l'activation du facteur de transcription NF- κ B [2, 25]. La figure 6 montre que la N-acétylcystéine, un anti-oxydant favorisant la synthèse du glutathion, protège

complètement les fibroblastes contre ces modifications lorsqu'on suit la proportion des morphotypes après stimulation par l'IL-1 α ou par le TNF- α .

Modulation de la réponse cellulaire au stress

Différents comportements cellulaires sont observés après des *stress* de durées et/ou d'intensités croissantes. Parmi ces comportements, se trouvent le retour à un niveau de fonctionnement normal, le vieillissement normal ou accéléré par des *stress*, de nombreuses formes d'activation cellulaire dont l'apoptose, ou la nécrose [26]. Les systèmes de défense spécifiques du type de *stress* encouru,

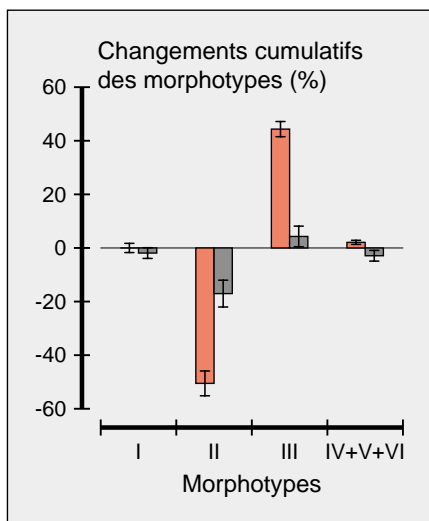


Figure 6. Effet cumulatif de cinq incubations successives de fibroblastes WI-38 en présence d'IL-1 α sur l'évolution des proportions des différents morphotypes à partir de cellules à passage en culture 28, sans (colonnes rouges) ou avec (colonnes grises) N-acétyl-cystéine (1 mM) ajoutée dans le milieu au moment de l'incubation avec l'IL-1 α . La stimulation est obtenue en incubant les cellules chaque jour pendant 1 h en présence de l'IL-1 α à 10 ng/ml. Les cellules sont ensuite repiquées à faible densité cellulaire et leur morphotype est déterminé. Les résultats sont exprimés en variations du pourcentage des morphotypes obtenus après cinq incubations.

comme, par exemple, les mécanismes anti-oxydants face à un *stress* oxydatif, ne sont pas les seuls moyens de défense face à des *stress*. Parmi ces autres facteurs qui protègent les cellules contre l'effet des *stress*, se trouve l'état énergétique des cellules.

Des molécules comme le glucose, le pyruvate et le malate permettent en effet aux cellules de résister à l'effet cytotoxique de *stress* intenses [27]. Des effets protecteurs de ces molécules ont aussi été observés pour des *stress* non cytotoxiques ayant un effet sur le vieillissement cellulaire [27]. Ces résultats ont été obtenus pour des types de *stress* très divers comme l'exposition au tert-butylhydroperoxyde ou à l'éthanol. Nous indiquons sur le Tableau I l'influence du glucose 5 mM présent pendant le *stress*, sur l'évolution des proportions des morphotypes des fibroblastes WI-38 ayant subi cinq *stress* successifs au tert-butylhydroperoxyde ou à l'éthanol. Après ces deux types de *stress* successifs, on constate que le D-glucose maintient la proportion des morphotypes I et II et, dans un même temps, empêche l'augmentation de la proportion de morphotypes IV à VI provoquée par les deux *stress*. En revanche, en présence de vitamine E par exemple, on observe une protection uniquement contre les *stress* oxydatifs et en aucun cas contre le *stress* à l'éthanol. Le glucose, contrairement à la vitamine E, assure donc un effet de protection globale qui permet à la cellule de résister à des conditions défavorables, oxydatives ou non. Ces données, obtenues par détermination du

pourcentage des différents morphotypes, ont été confirmées en utilisant le critère histochimique d'apparition de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence cellulaire.

Réactions moléculaires des cellules soumises à des stress

Plusieurs protéines sont connues depuis longtemps pour leur rôle cytoprotecteur lors de *stress*, comme par exemple les enzymes anti-oxydantes, les enzymes de réparation de l'ADN, ou les protéines de choc thermique (HSP). Depuis quelques années, on a commencé à analyser les mécanismes moléculaires mis en place par les cellules pour se défendre face à un *stress*.

Par exemple, la HSP70 est une protéine chaperon qui protège les protéines dénaturées en leur permettant de reprendre leur conformation active par un mécanisme dépendant de l'ATP. L'induction de plusieurs HSP a été mise en évidence lors de divers *stress*, non seulement thermiques, mais aussi oxydatifs, dus à l'exposition à des métaux lourds, à des *stress* mécaniques, osmotiques... Ces protéines sont induites par des systèmes complexes de transmission du signal, dont nous décrirons brièvement les grandes voies ci-dessous. Ces voies interagissent souvent entre elles et aboutissent à la régulation de l'activité ou de la synthèse de facteurs de transcription et/ou de protéines du cycle cellulaire, dont des gènes de la réponse immédiate comme *c-fos*, *c-jun*, *jun β* , *c-myc* ou

Tableau I			
PROTECTION DES EFFETS DE STRESS PAR LE D-GLUCOSE			
Morphotypes Stress	I + II	III	IV + V + VI
TBHP	- 29,6	+ 21,3	+ 8,1
TBHP + D-glucose 5mM	- 17,0	+ 20,4	- 3,6
Éthanol	- 33,0	+ 23,8	+ 9,4
Éthanol + D-glucose 5 mM	- 14,2	+ 22,8	- 8,4

Effet protecteur du D-glucose sur les proportions de morphotypes de fibroblastes WI-38 après cinq *stress* successifs par le tert-butylhydroperoxyde (25 μ M) (TBHP) ou l'éthanol (4,5 %), avec un *stress* quotidien. Les résultats sont exprimés en variation du pourcentage des morphotypes obtenu après cinq *stress*.

egr-1. Ces proto-oncogènes sont impliqués dans la division et la différenciation cellulaires, mais ils interviennent aussi dans la réponse précoce aux *stress*. Certaines des protéines induites par ces proto-oncogènes correspondent à une réponse spécifique comme les protéines de la phase aiguë, qui sont réglées par des facteurs de transcription C/EBP, l'aldose réductase dans les conditions hypertoniques, la O-6-méthylguanine DNA méthyltransférase et l'hème oxygénase après irradiation ou après *stress* oxydatifs [28]. On ne connaît pas encore l'ensemble des mécanismes aboutissant à l'induction de ces multiples protéines lors de *stress*. La plupart de ces réactions impliquent des cascades d'activation qui mettent en jeu des systèmes de kinases/phosphatases spécifiques, mais qui peuvent aussi interagir avec les voies d'activation qui dépendent de stimulus tels que les facteurs de croissance, les hormones, les cytokines. Nous mentionnerons ici trois de ces voies.

La première, mise en évidence après traitement des cellules par les UV, est la voie dépendant de la Jun kinase-1 (JNK1). Cette voie inclut l'activation du complexe Rac-1-PAK1, les kinases MEKK1, SEK1 et finalement la JNK1. Cette dernière est capable de phosphoryler plusieurs facteurs de transcription comme Jun sur les sérines 63 et 73, mais aussi ATF-2 et Elk-1 et de déclencher ainsi la synthèse de protéines adaptées au *stress* [29].

Dans le cas de choc hyperosmotique, de choc thermique ou de stimulation en présence d'IL-1, une voie dépendant de la p38 protéine-kinase est activée. Cette kinase est elle-même activée par la MKK3. Elle peut elle-même activer d'autres kinases comme la MAPKAPK-2 ou des facteurs de transcription comme ATF-2 et GADD153 [30].

Les voies qui aboutissent à la réparation des dommages de l'ADN font évidemment partie de la réponse générale aux *stress*. La cellule dispose de divers systèmes de contrôle, de réparation ou d'arrêt du cycle cellulaire qu'elle active en cas de mutations, d'appariements incorrects ou de désappariements de l'ADN. Ainsi, une kinase qui s'active

en se liant à des brins cassés d'ADN a été mise en évidence. Il s'agit de la protéine-kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK). Elle est associée à une autre protéine de 350 kDa qui sert probablement de régulateur (*m/s n° 4, vol. 11, p. 633*). Elle agit comme une sérine/thréonine kinase qui, *in vitro*, phosphoryle un grand nombre de protéines nucléaires et des protéines de régulation comme le polypeptide Ku, la HSP90, l'antigène T du virus SV40, Jun, SRF et p53 [31].

La phosphorylation de p53 par la DNA-PK n'est qu'une des voies d'activation de p53. La concentration de p53 s'accroît dans le cas d'irradiation, sans doute par diminution de sa dégradation. La protéine p53 peut être activée par phosphorylation mais aussi par liaison à l'ADN simple brin ou de l'ADN mal apparié [32]. Cette liaison, qui se produit dans un domaine situé à l'extrémité carboxy-terminale, libère le domaine central qui lui permet de se lier à une séquence consensus présente dans le promoteur de plusieurs gènes et de stimuler leur transcription. C'est le cas de la protéine p21^{WAF1/CIP1} qui inhibe le cycle cellulaire, et de la protéine GADD45 qui va contribuer à reformer les portions endommagées de l'ADN. Ainsi les dommages de l'ADN vont induire l'arrêt de la division et engendrer une réparation rapide des dommages.

Récemment, un autre complexe a été mis en évidence qui s'active lors de l'irradiation de l'ADN a été mis en évidence. Il s'agit de la protéine ATM qui est mutée dans la l'ataxie-télangiectasie. Cette protéine est associée à une tyrosine-kinase, c-Abl qui n'est pas active dans les conditions normales. Cependant, sous l'effet de radiations ou de dommages à l'ADN, ATM s'active et phosphoryle c-Abl sur la sérine 465, ce qui la rend active [33]. Cette kinase peut alors phosphoryler d'autres protéines impliquées dans la transcription comme l'ARN polymérase II et la Jun-kinase. c-Abl peut aussi s'associer à pRb, entraînant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S; la liaison d'ATM à p53 induit, soit l'arrêt du cycle, soit l'apoptose. Ces dernières décou-

vertes mettent en évidence que la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN peut varier suivant la sévérité des dommages, le type cellulaire et les conditions extracellulaires pour conduire soit à la réparation de l'ADN, soit à l'arrêt de la croissance, ou encore à la mort programmée ou apoptose [34].

La plus grande prudence s'impose lors de l'extrapolation à une situation physiologique réelle dans l'organisme de données expérimentales comme celles présentées ci-dessus, qui sont obtenues, soit en tube, en ce qui concerne certaines études de liaison de protéines régulatrices entre elles, soit sur des cellules en culture, ou sur des échantillons d'organes *ex vivo*. Un niveau de complexité supplémentaire s'ajoute dès le passage au niveau de l'organisme entier: le comportement de cellules appartenant à un type cellulaire donné, dans un organe particulier, est influencé par des interactions multiples, en particulier avec la matrice extracellulaire, ou avec des molécules diverses telles que les molécules d'adhérence portées par d'autres types cellulaires ou encore des molécules solubles telles que des cytokines, facteurs de croissance, hormones, peptides, etc., sécrétées par des cellules jouxtant le type cellulaire étudié ou apportées par la circulation sanguine. Ainsi, une voie activée dans des cellules en culture par une molécule donnée, ne le sera pas forcément, ou le sera peut-être moins, dans le même type cellulaire étudié au sein d'un organisme entier. Une molécule différente présente dans le milieu extracellulaire et reconnaissable par un récepteur, pourrait activer une autre voie qui bloquerait partiellement ou totalement la voie étudiée. C'est donc la résultante d'un système global d'interactions entre diverses voies d'activation qui détermine le comportement final des cellules dans une situation donnée. Nous allons voir ci-dessous comment une théorie globale telle que la théorie des systèmes ouverts loin de l'équilibre peut être appliquée à la biologie cellulaire dans le but de modéliser les effets de ces interactions multiples sur le comportement cellulaire.

L'apport de la thermodynamique des systèmes ouverts

La biologie moléculaire nous indique quels sont les mécanismes qui permettent à la cellule de résister à des conditions défavorables. Elle nous montre aussi que ces régulations impliquent une modification de l'expression génique de ces cellules. On peut donc comprendre qu'après un *stress*, la synthèse de certaines protéines puisse être changée de manière irréversible. Cependant, qu'est-ce qui fait que des changements reproductibles et permanents se produisent lors de *stress* qui n'ont que peu de rapport entre eux et que ces changements apparaissent comme identiques ou très semblables à ceux observés au cours du vieillissement normal en culture à la suite de sous-cultures successives ?

Une des approches consiste à considérer la cellule globalement, c'est-à-dire comme un système auto-organisé qui répond à des critères de stabilité particuliers donnés par la thermodynamique des systèmes irréversibles loin de l'équilibre, thermodynamique qui étudie précisément les systèmes ouverts autorégulés [35]. Les systèmes ouverts loin de l'équilibre se maintiennent grâce aux transformations physico-chimiques ou biochimiques qui s'y produisent, donnant lieu à une production d'entropie dont le niveau est le reflet direct de l'intensité de ces transformations. Cette production d'entropie dans le système est totalement exportée sous forme de produits, déchets, échanges ioniques ou de chaleur si bien que le système se trouve à un moment précis dans un état stationnaire. La théorie de la thermodynamique nous apprend que ce système fonctionne avec un minimum de production d'entropie mais qu'il peut exister, pour un même système, divers niveaux de production d'entropie qui représentent tous des minima, apparaissant selon les paramètres internes et externes au système.

Quelle est la signification de ces concepts thermodynamiques pour la cellule ? D'abord, comme nous l'avons déjà signalé, la production

d'entropie dans un système ouvert, et donc dans la cellule, résulte de l'ensemble des transformations qui s'y produisent. Elle représente donc en première approximation le niveau du métabolisme cellulaire, vu ici comme l'ensemble des réactions métaboliques de production et d'utilisation d'énergie libre sous toutes ses formes, qu'il s'agisse de nucléotides triphosphates, potentiel rédox, etc. [35]. Cette notion de niveau de production d'entropie recouvre la notion d'efficacité métabolique dans la cellule : plus cette efficacité baisse, plus la production d'entropie, tout d'abord interne puis exportée à l'extérieur du système, diminue.

La théorie du vieillissement fondée sur la thermodynamique des systèmes ouverts loin de l'équilibre permet de prévoir ce qui arrive au système cellulaire lorsqu'il est soumis à des variations de paramètres de l'environnement, comme un *stress* ou une stimulation, ou internes, comme l'accumulation de modifications irréversibles dans le système, des mutations ou des délétions dans l'ADN, par exemple. Ces modifications irréversibles sont regroupées ici sous le terme générique d'erreurs [35]. L'accumulation d'erreurs peut aussi être la cause d'une diminution de l'interconnectivité des composants subcellulaires modifiant le flux d'informations chimiques et, de ce fait, la rapidité et l'intensité d'une réponse à un *stress* ou à une stimulation [36].

La situation obtenue dans ces conditions serait simple si la cellule était un système proche de l'équilibre : lors de tout changement externe ou interne, la cellule verrait sa production d'entropie augmenter momentanément, le temps de rééquilibrer ses paramètres internes : la concentration en tel ou tel métabolite qui aurait été perturbée, ou la concentration en une molécule stressante donnée. Malheureusement, la situation réelle est bien plus complexe car la cellule est un système ouvert loin de l'équilibre. En effet, il existe des boucles de rétroaction dans le métabolisme, dues à la présence d'enzymes finement réglées. Ces boucles peuvent engendrer des variations de type sinusoïdal de la concen-

tration des métabolites de plusieurs voies métaboliques, rendant impossible la description du système cellulaire à l'aide de lois linéaires. On sait, en outre, que l'existence même de toute structure autorégulée ne peut être possible que dans un système ouvert loin de l'équilibre (pour revue, voir [37]). Que se passe-t-il alors dans un système tel qu'une cellule vivante, lorsqu'il est confronté à des modifications de paramètres externes ou internes ? Autrement dit, que se passe-t-il lors de fluctuations de paramètres extra- ou intracellulaires, d'accumulation d'erreurs, ou de la perte d'interconnectivité entre les multiples constituants cellulaires ? Deux facteurs régissent ici le comportement cellulaire. D'une part, la nécessité d'obéir aux critères de stabilité émis par la thermodynamique des systèmes ouverts loin de l'équilibre lorsque le système cellulaire est soumis à des fluctuations [35]. D'autre part, un type cellulaire donné dans une espèce particulière est un système finement réglé qui exerce des fonctions bien définies dans des conditions d'environnement définies elles aussi [36].

Effet des stress : point de vue de la thermodynamique des systèmes ouverts

Si des modifications de ces conditions d'environnement surviennent, le système cellulaire s'en trouve immédiatement perturbé, et ses principales voies métaboliques perdent alors leur caractère optimisé, donnant lieu à une baisse de leur activité par unité de substrat disponible et par unité de temps, donc à une baisse de leur production d'entropie. Les cellules vont réagir face à cette perte d'optimisation [36]. Elles disposent d'abord de mécanismes « senseurs » de *stress* : l'activité de certains facteurs de transcription augmente lors de *stress* oxydatifs, des kinases (comme les Jun-kinases) sont activées lorsque les membranes plasmiques sont altérées par un *stress* UV ou osmotique [38]. Viennent ensuite les mécanismes d'induction de défense *via* la transcription et la traduction protéique et, enfin, la réparation ou l'élimination des dommages

suivis de la néosynthèse des constituants endommagés (par exemple, la protéolyse de protéines altérées). Ces processus demandent une consommation importante d'énergie. Un schéma reprenant ces diverses étapes de la réponse globale de la cellule est présenté sur la *figure 7*.

Les critères de stabilité des systèmes ouverts soumis à des fluctuations entrent alors en ligne de compte. Selon l'efficacité plus ou moins bonne des systèmes de défense, selon le niveau des dommages engendrés par la perturbation, le système sera capable ou non de revenir à son niveau de départ. S'il en est incapable, soit il va disparaître (mort cellulaire), soit le système va se réorganiser et réoptimiser son fonctionnement malgré un niveau d'erreurs plus élevé ou une moindre interconnexion entre les constituants cellulaires [35].

Ces considérations théoriques sont importantes car elles expliquent que, lors d'une perturbation, la cellule consomme plus d'énergie pour contrecarrer les effets de ce *stress*, et tente de revenir à son état initial.

En conclusion, le système peut, au cours du temps ou à la suite de perturbations, passer d'un état à un autre, ce passage correspondant à une réorganisation de l'autorégulation et de la consommation d'énergie du système qui se produit toujours avec diminution de la production d'entropie, c'est-à-dire avec une capacité moindre pour la cellule de convertir son énergie libre en travail (diminution de la capacité de transformer des substrats énergétiques en énergie libre dont une partie serait utilisée pour les synthèses ou les échanges avant d'être transformée en entropie). Cette diminution peut correspondre à une diminution

des fonctions cellulaires du fait d'une régulation moins stricte, d'erreurs dans l'ADN, d'erreurs dans les synthèses de protéines, de découplage des mitochondries, de l'accumulation de molécules endommagées ou à réparer, etc. Cette approche thermodynamique des systèmes ouverts peut aussi s'appliquer à l'évolution des cellules au cours du temps et rendre compte de certains aspects du vieillissement des cellules [9, 35].

Comment cette manière de considérer la cellule peut-elle être utilisée pour expliquer l'apparition des différents morphotypes au cours des passages en culture? Nous avons proposé que le passage des fibroblastes d'un morphotype à l'autre correspond à une réorganisation du comportement des cellules entraînant la synthèse de protéines particulières. Cette réorganisation se produirait au cours du vieillissement normal ou de manière accélérée à la suite des effets du *stress* [39]. Ainsi chaque morphotype fibroblastique fonctionnerait bien à un niveau stable de production d'entropie tel que proposé par la thermodynamique mais il pourrait, après réorganisation de son fonctionnement, passer au stade suivant [35]. Cette approche thermodynamique ne donne pas d'informations sur les causes ou les mécanismes qui conduisent d'un système d'organisation à l'autre. Elle permet cependant de fournir un cadre général qui inclut les divers mécanismes moléculaires de régulation et d'interpréter le comportement des cellules face aux *stress*. Si le passage d'un morphotype cellulaire à l'autre est bien le résultat d'une déstabilisation qui dépend de l'énergie, il est théoriquement possible de moduler l'intensité de ce passage en agissant sur l'énergie dont la cellule peut disposer [39]. Nous avons montré sur le *Tableau 1* que la présence de D-glucose ralentit fortement le passage des fibroblastes vers des morphotypes plus âgés. En cas de *stress* cytotoxiques, une protection est aussi observée avec le D-glucose, le pyruvate et le malate sur la survie cellulaire de fibroblastes et de cellules de neuroblastomes différenciées à l'aide de *nerve growth factor* [40], de même qu'avec le naftidrofuryl oxalate [27] ou le bilobalide qui agissent

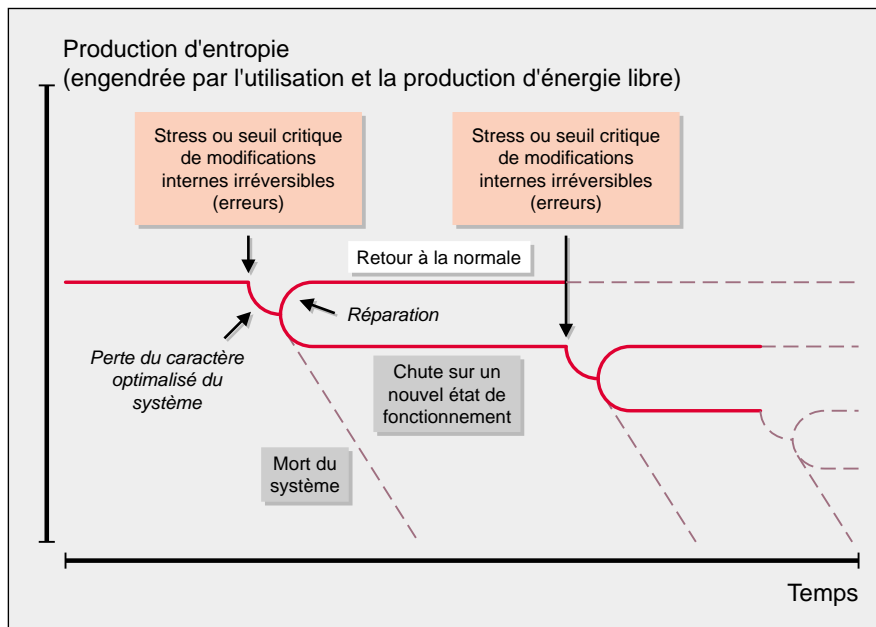


Figure 7. Effets de stress ou de l'accumulation de modifications internes irréversibles (ou erreurs) sur l'intensité du métabolisme cellulaire, estimée par la production d'entropie cellulaire. Une perte d'optimisation du fonctionnement cellulaire a lieu lors d'une perturbation. Si le système cellulaire réagit en réparant les dommages, cette perte d'optimisation ne sera que transitoire. En revanche, si la cellule n'est pas capable de réparer rapidement ses dommages, elle chutera de manière irréversible à un niveau plus bas de production et/ou d'utilisation d'énergie où elle devra réoptimiser ses fonctions tenant compte d'un niveau plus élevé d'erreurs. De stress en stress (vieillesse accélérée), ou à chaque seuil critique de modifications internes irréversibles (vieillesse normale), le système chutera à des niveaux de production et/ou d'utilisation d'énergie de plus en plus faibles, rendant la cellule chaque fois plus vulnérable aux stress.

comme stimulants du métabolisme mitochondrial. La concentration en ATP chute rapidement, dans les quelques minutes qui suivent le début du *stress*, sauf en présence de métabolites énergétiques qui maintiennent un certain niveau d'ATP. Les concentrations en ATP résiduelles mesurées au cours du *stress* semblent déterminer la proportion de cellules survivantes lors de *stress* cytotoxiques [27].

On peut comprendre facilement la nécessité de disposer d'une quantité accrue d'énergie au moment du *stress*. Comme on l'a vu, la cellule met en route des cascades de réactions aboutissant à la synthèse de protéines de défense, de protection ou de réparation des dommages à l'ADN, aux lipides membranaires ou aux protéines. Ces processus demandent bien sûr de l'énergie, par exemple lors de la transcription, de la traduction, de l'activité des protéines chaperons chargées de donner aux protéines leur structure tridimensionnelle, ou de l'acheminement de ces protéines vers leur organite cible. Utilisant une analyse tout à fait différente fondée sur une modélisation des erreurs qui peuvent survenir dans des processus indispensables à la vie de l'organisme, Kowald et Kirwood (Manchester, GB) [41] montrent une corrélation positive entre la consommation d'énergie liée à la survie et la durée de vie. Ainsi, une des familles de protéines fortement activées par les différents types de *stress* sont les transporteurs de glucose qui permettent à la cellule de faire face à ce besoin accru en énergie, tel GLUT-1 qui fait partie d'un ensemble de protéines dont les gènes sont sensibles au glucose ou GRP (*glucose-regulated proteins*). Ce transporteur, ainsi que d'autres protéines comme les GRP 78, 94 et 170, sont induits ou activés par des *stress* aussi différents que le manque de glucose et les situations d'ischémie mais aussi par la stimulation par un ionophore de calcium, la présence de tunicamycine, de 2-mercaptoéthanol, d'arsenite ou d'azide [42].

En résumé, on pourrait schématiser la réponse cellulaire au *stress* de la manière suivante (figure 8). Les *stress* provoquent des altérations ou modifications qui mettent en route une

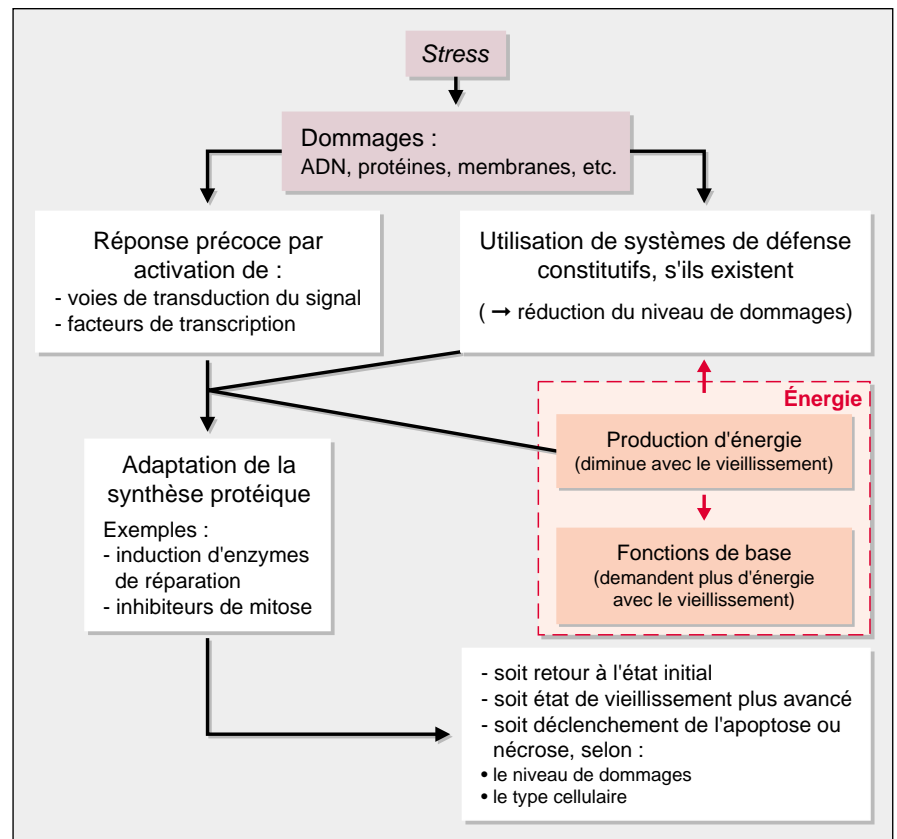


Figure 8. **Représentation schématique de la réponse cellulaire aux stress, indiquant comment une diminution de l'énergie affecte la résistance des cellules.** Face à des conditions défavorables, la cellule met en place une réponse qui peut toucher le métabolisme mais également l'ensemble de la régulation de l'expression génique avec la synthèse d'enzymes de réparation, d'adaptation ou de défense. L'énergie nécessaire pour cette adaptation est l'un des facteurs qui va contribuer à la résistance aux stress. En finale, soit la cellule reviendra à son état initial, soit elle dégénérera en nécrose ou entrera en apoptose, soit elle se stabilisera dans un état plus avancé de « vieillissement ».

réponse et une adaptation de la cellule. Ces dernières prennent la forme de modifications du métabolisme, d'activation de voies de régulation aboutissant à l'activation de facteurs de transcription et à la synthèse de nouvelles protéines permettant la défense, la réparation ou l'adaptation aux nouvelles conditions. Tous ces changements requièrent de l'énergie mais restent fortement réglés notamment pour maintenir les fonctions vitales nécessaires à la survie de la cellule. Cette vue schématique permet de comprendre quelles les conséquences de ce processus. Soit le *stress* est de faible intensité, la cellule peut réagir de

manière adéquate et reviendra à son état initial. Soit le *stress* est très important et/ou la cellule ne parvient pas à résister aux dommages subis, dans ce cas la cellule va dégénérer, ce qui va entraîner sa mort par nécrose, mais l'apoptose n'est pas exclue, par exemple lorsque la cellule peut encore passer par la phase G1 du cycle cellulaire, ou qu'elle a subi un niveau de dommages lui permettant encore de lancer un programme de mort par apoptose. Enfin, dans le cas intermédiaire, la cellule a bien répondu aux conditions de *stress* mais les modifications sont telles qu'elle est forcée de se réorganiser et de se stabiliser dans un autre état de fonc-

tionnement comme explicité ci-dessus. Ce schéma indique aussi clairement le rôle des facteurs énergétiques dans cette réponse cellulaire. Il s'agit d'un modèle hypothétique mais il répond bien aux observations réalisées sur les fibroblastes en culture. Il s'applique cependant aussi à d'autres situations comme la résistance des cellules nerveuses à de fortes concentrations en glutamate (pour revue, voir [43]).

Réponse des cellules endothéliales en situation d'hypoxie

Une des situations physiopathologiques dans laquelle se produit une diminution de la production énergétique sans compromettre la survie cellulaire est l'hypoxie. Cette hypoxie peut donc être considérée comme une situation défavorable pour la cellule et donc comme un *stress*.

La cellule va répondre à cette situation de *stress* par une induction de la synthèse de protéines particulières comme les HAP (*hypoxia-associated proteins*) [44]. A côté de ces protéines, qui constituent une réponse spécifique à l'hypoxie, se retrouvent les HSP70, les GRP (*glucose-regulated proteins*) et les ORP (*oxygen-regulated proteins*) [45]. Les protéines GRP78 et ORP80, induites respectivement dans des conditions d'absence de glucose et d'hypoxie sont, en fait, les mêmes protéines, ce qui indique que ces deux situations de *stress* induisent une réponse cellulaire en partie identique. La situation d'hypoxie, comme la plupart des situations de *stress*, conduit à une diminution du contenu en ATP par inhibition de la respiration mitochondriale, en partie compensée par une augmentation de la glycolyse et du transport de glucose. Cet apport supplémentaire de glucose est réalisé dans les cellules endothéliales de la veine par un symport glucose/Na⁺. L'entrée de Na⁺ conduit *via* un échange Na⁺/Ca²⁺ à une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca²⁺. La présence de Ca²⁺ est le point de départ d'une cascade d'activation de cette cellule qui stimule, entre autres, une phospholipase A₂ et aboutit à la synthèse du PAF, des prostaglandines et, par ailleurs, à la sécrétion

de facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF). Le PAF et la prostaglandine F PGF_{2α} recrutent alors les polymorphonucléaires neutrophiles et permettent leur adhérence à l'endothélium de la veine [46]. Ceux-ci, activés à leur tour, libèrent des molécules pro-inflammatoires telles que le LTB₄, des radicaux superoxydes et des collagénases. Ces molécules sont responsables de la dégradation du collagène et de la matrice extracellulaire de l'intima et de la média de la veine. La prostaglandine PGF_{2α} et le bFGF ont, quant à eux, une action pro-proliférative sur les cellules musculaires lisses [47]. L'ensemble de ces processus moléculaires et cellulaires a été décrit dans un précédent numéro de *médecine/sciences* [48]. Il se produit lorsque des stases veineuses sont répétées, expliquant ainsi les modifications qui apparaissent progressivement dans la paroi des veines variqueuses. La mention de ce processus est intéressante ici car elle illustre bien une réponse cellulaire à un *stress* au cours duquel il n'y a pas mort mais activation cellulaire, dans ce cas la cellule endothéliale, puis interaction avec les cellules environnantes, ce qui désorganise progressivement le tissu et aboutit à une situation pathologique typique d'une maladie chronique.

Conclusion

Les conditions de *stress* induisent des réponses cellulaires qui peuvent entraîner des modifications irréversibles du comportement des cellules. En particulier, l'étude fondamentale des processus cellulaires et moléculaires liés à ces modifications dues à l'effet de *stress* non létaux peut être replacée dans le contexte des affections liées au vieillissement, qu'elles soient vasculaires, comme nous l'avons suggéré sur base des effets de l'hypoxie sur le tissu veineux, ou neurodégénératives. Pour certaines maladies neurodégénératives liées au vieillissement, un seul changement parmi tous les changements qui ont lieu au cours du vieillissement normal semble accéléré [49]. Par exemple, dans la maladie d'Alzheimer, l'accumulation de peptide β-amyloïde est augmentée par rapport aux sujets sains, et dans la maladie de Parkinson, on a mis en évidence une exacerbation

de certains dommages mitochondriaux, de même qu'une surproduction de dérivés actifs de l'oxygène moléculaire (pour une revue, voir [50]).

C'est dans cette perspective que les études sur le processus de vieillissement cellulaire normal ou accéléré dans des situations de *stress* trouvent leur place, en essayant d'identifier les voies sur lesquelles nous pourrions agir pour modifier la réponse cellulaire observée lors des pathologies liées au vieillissement ■

Remerciements

Les auteurs remercient le FNRS, le FRIA et le programme Biomed and Health Research Programme, Action concertée «Molecular Gerontology», BMH1 CT94 1710. Ce texte présente des résultats de recherche du programme Pôles d'attraction interuniversitaire mis en œuvre à l'initiative de l'État belge, Service du Premier ministre, Programmation de la Politique scientifique.

RÉFÉRENCES

1. Burton M, Gillon B, Eliaers F, Remacle J, Raes M. Inhibitory effects of cyclic AMP and prostaglandin E₂ on PDGF-induced human lung fibroblast proliferation. *J Exp Clin Cancer Res* 1995; 14: 180-1.
2. Renard P, Zachary MD, Bougelet C, Mirault ME, Haegeman J, Remacle J, Raes M. Effects of antioxidant enzyme modulations on interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation. *Biochem Pharmacol* 1997; 53: 149-60.
3. Carrel A. On the permanent life of tissue outside the organism. *J Exp Med* 1912; 15: 516-26.
4. Hayflick L. Antecedents of cell aging research. *Exp Gerontol* 1989; 24: 355-69.
5. Hayflick L, Moorehead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25: 585-621.
6. Hayflick L. The cellular basis for biological aging. In: Hayflick L, Flinch CE, eds. *Handbook of the biology of ageing*. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1977: 159-86.
7. Martin GM, Sprague CA, Epstein CJ. Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue and genotype. *Lab Invest* 1970; 23: 86-92.
8. Bayreuther K, Rodeman HP, Hommel R, Dittman K, Albiez M, Franz P. Human skin fibroblasts *in vitro* differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 5112-6.
9. Toussaint O, Houbion A, Remacle J. Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. II. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture. *Mech Ageing Dev* 1992; 65: 65-83.

RÉFÉRENCES

10. Bruce SA. Ultrastructure of dermal fibroblasts during development and aging: relationship to *in vitro* senescence of dermal fibroblasts. *Exp Gerontol* 1991; 26: 1-16.
11. Rodemann HP, Bayreuther K, Francz PI, Dittmann K, Albiez M. Selective enrichment and biochemical characterization of seven skin fibroblasts cell types *in vitro*. *Exp Cell Res* 1989; 180: 84-93.
12. Campisi J, Dimri G, Hara E. Control of replicative senescence. In: Holbrook, ed. *Handbook of the biology of aging*. 4th ed; San Diego: Academic Press, 1996: 121-48.
13. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279: 349-52.
14. Macieira Coelho A. Chaos in DNA partition during the last mitoses of the proliferative life-span of human fibroblasts. *FEBS Lett* 1995; 358: 126-8.
15. Pang JH, Chen KY. Global change of gene expression at late G1/S boundary may occur in human IMR-90 diploid fibroblasts during senescence. *J Cell Physiol* 1994; 160: 531-8.
16. Farnham PJ, Slansky JE, Kollmar R. The role of E2F in the mammalian cell cycle. *Biochem Biophys Acta* 1993; 1155: 125-31.
17. Afshari CA, Vojta PJ, Annab LA, Futreal PA, Willard TB, Barrett JC. Investigation of the role of G(1)/S cell cycle mediators in cellular senescence. *Exp Cell Res* 1993; 209: 231-7.
18. Dulic V, Drullinger LF, Lees E, Reed SI, Stein GH. Altered regulation of G1 cyclins in senescent human diploid fibroblasts: accumulation of inactive cyclin E-Cdk2 and cyclin D1-Cdk2 complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11034-8.
19. Yamamoto M, Yoshida M, Ono K, Fujita T, Ohtanifujita N, Sakai T, Nikaido T. Effect of tumor suppressors on cell cycle-regulatory genes - Rb suppresses P34(Cdc2) expression and normal p53 suppresses cyclin A expression. *Exp Cell Res* 1994; 210: 94-101.
20. Vaziri H, West MD, Allsopp RC, Davison TS, Wu YS, Arrowsmith CH, Poirier GG, Benchimol S. ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly (ADP-ribose) polymerase. *EMBO J* 1997; 16: 6018-33.
21. Toussaint O, Houbion A, Eliaers F, Saint-Auret J, Remacle J. The role of energetic metabolism in cell death and cellular ageing in stressfull conditions. Applications to WI-38 human fibroblasts and SK-NSH-SY5Y human neuroblastoma cells and testing of pharmacological molecules. *Arch Int Physiol Biochem Biophys* 1995; 103: B 26.
22. von Zglinicki T, Saretzki G, Docke W, Lotze C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res* 1995; 220: 186-93.
23. Chen Q, Ames BN. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4130-4.
24. Toussaint O, Dumont P, Remacle J. Effect of successive stimulations with TNF- α and IL-1 on the *in vitro* ageing of WI-38 fibroblasts. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 535.
25. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991; 10: 2247-58.
26. Remacle J, Raes M, Toussaint O, Renard P, Rao G. Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function. *Mutat Res* 1995; 316: 103-22.
27. Toussaint O, Houbion A, Remacle J. Effects of modulations of the energetic metabolism on the mortality of cultured cells. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1186: 209-20.
28. Holbrook NJ, Fornace AJ. Response to adversity: molecular control of gene activation following genotoxic stress. *New Biol* 1991; 3: 825-33.
29. Davis RJ. MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 470-3.
30. Wang X, Ron D. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP kinase. *Science* 1996; 272: 1347-9.
31. Anderson CW. DNA damage and the DNA-activated protein kinase. *Trends Biochem Sci* 1993; 18: 433-7.
32. Enoch T, Norbury C. Cellular responses to DNA damage: cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 426-30.
33. Shafman T, Khanna KK, Kedar P, Spring K, Kozlov S, Yen T, Hobson K, Gatei M, Zhang N, Watters D, Egerton M, Shiloh Y, Kharbanda S, Kufe K, Lavin MF. Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage. *Nature* 1997; 384: 520-3.
34. Brown L, McCarthy N. A sense-abl response? *Nature* 1997; 387: 1321-2.
35. Toussaint O, Raes M, Remacle J. Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. *Mech Ageing Dev* 1991; 61: 45-64.
36. Toussaint O, Schneider ED. The thermodynamics and evolution of complexity in biological systems (part A). *J Comp Physiol Biochem* 1998 (sous presse).
37. Babloyantz A. *Molecules, dynamics and life. Nonequilibrium problems in the physical science and biology: an introduction to self-organisation of matter*, vol. 4. New York: Wiley Interscience, 1986.
38. Rosette C, Karin M. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* 1996; 274: 1194-7.
39. Toussaint O, Michiels C, Raes M, Remacle J. Cellular aging and the importance of energetic factors. *Exp Gerontol* 1995; 30: 1-22.
40. Toussaint O, Houbion A, Saint-Auret J, Remacle J. Effects of modulations of the energetic metabolism on cell death in stressfull conditions: applications to SK-NSH-SY5Y neuroblastoma cells differentiated with NGF and stresses under tert-butylhydroperoxyde. *J Exp Clin Cancer Res* 1995; 14: 177-9.
41. Kowald A, Kirkwood TB. Towards a network theory of ageing: a model combining the free radical theory and the protein error theory. *J Theor Biol* 1994; 168: 75-94.
42. Wertheimer E, Sasson S, Cerasi E, Ben-Neriah Y. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 belongs to the glucose-related protein family of stress-inducible proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2525-9.
43. Toussaint O, Remacle J. Stress and energy metabolism in age-related processes. In: Rattan SIS, Toussaint O, eds. *Molecular gerontology: research status and strategies*. New York: Plenum Press, 1996: 87-109.
44. Zimmerman GA, McIntyre TM, Mehra M, Prescott SM. Endothelial cells-associated platelet-activating factor: a novel mechanism for signalling intercellular adhesion. *J Cell Biol* 1990; 110: 529-40.
45. Benjamin IJ, Hories S, Greenberg ML, Alpern RJ, Williams RS. Induction of stress proteins in cultured myogenic cells. Molecular signals for the activation of heat shock transcription factor during ischemia. *J Clin Invest* 1992; 89: 1685-9.
46. Arnould T, Michiels C, Remacle J. Hypoxic human umbilical vein endothelial cells induce activation of adherent polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 1994; 83: 3705-16.
47. Arnould T, Michiels C, Janssens D, Delaive E, Remacle J. Hypoxia induces PMN adherence to umbilical vein endothelium. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 1009-16.
48. Michiels C, Arnould T, Remacle J. Rôle-clé de l'hypoxie et des cellules endothéliales dans le développement des veines variqueuses. *Med Sci* 1994; 10: 845-53.
49. Tranchant C. Protéines TAU et maladies neurologiques. *Med Sci* 1997; 13: 989-97.
50. Wolozin B, Luo Y, Wood K. Neuronal loss in aging and disease. In: Holbrook NJ, Martin GR, Lockshin RA, ed. *Cellular aging and cell death*. New York: Wiley-Liss, 1996.

Olivier Toussaint

Docteur ès sciences, collaborateur scientifique du FNRS.

Martine Raes

Professeuse de biologie cellulaire.

Carine Michiels

Docteur ès sciences, chercheur qualifié du FNRS.

José Remacle

Professeuse de biochimie.

Laboratoire de biochimie et de biologie cellulaire, FUNDP, 61, rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgique.

Summary

Cellular response to stress : relationship with ageing and pathology

In vitro replicative senescence is characterized by an irreversible growth arrest of proliferative cells. Different regulatory processes briefly described herein have been discovered which can at least in part explain the occurrence of replicative senescence. The question is to know how stress and stimulations can influence these regulatory processes. Different groups have proposed that sublethal stress can accelerate the process of cellular ageing since the main biomarkers of cellular ageing appear irreversibly after sublethal stress such as a morphology typical of old cells, an irreversible loss of the proliferative capacity, the appearance of senescence-associated β -galactosidase activity, the shortening of telomeres, the accumulation of the senescence specific lipofuscin pigment, or the continuous expression of growth inhibitors. A global interpretation based on the theory of far from equilibrium thermodynamical systems can explain how different kinds of physico-chemical stress lead to the process of accelerated ageing. This theory can also explain why the presence of substrates of the energy metabolism or pharmacological molecules enhancing the energy metabolism protect cells against accelerated ageing and cell death. Stress induces cellular responses which can generate irreversible modifications of the cell behaviour. The basic study of the cellular and molecular processes related to the irreversible modifications occurring particularly after sublethal stress, as described herein, could help to identify the pathways involved in age-related pathologies.

TIRÉS À PART

O. Toussaint.

m/s n° 5, vol. 14, mai 98