

La sénescence dans les cellules humaines : un obstacle au développement tumoral ?

Véronique Gire
David Wynford-Thomas

Le processus de « sénescence répliquative », dans de nombreux types cellulaires, est conditionné par l'érosion progressive des extrémités spécialisées du chromosome – les télomères – qui constituent une « horloge » mitotique. Une voie de signalisation majeure liant le raccourcissement des télomères à l'arrêt de la prolifération s'opèrerait *via* l'activation du produit du gène suppresseur de tumeurs, p53, lui-même inducteur de l'inhibiteur du cycle cellulaire, p21^{waf-1/cip-1/sdi-1}. Au moins une des autres voies implique un gène suppresseur de tumeurs qui code pour l'inhibiteur du cycle cellulaire, p16^{INK4a}. L'inactivation de ces voies par des mutations des gènes suppresseurs de tumeurs supprime l'entrée en sénescence, mais ce gain de prolifération est éventuellement limité par la mort cellulaire (« crise ») à la suite de la perte critique de la fonction télomérique. Pour devenir immortelle, une tumeur doit subir non seulement des mutations des gènes suppresseurs de tumeurs, mais aussi échapper à la crise après stabilisation de la taille des télomères grâce à la réactivation (ou l'augmentation de l'activité) de l'enzyme télomérase.

ADRESSE

V. Gire, D. Wynford-Thomas : Cancer Research Campaign Laboratories, Department of Pathology, University of Wales College of Medicine, CF4 4XN Cardiff, Royaume-Uni.

Les cellules somatiques humaines normales en culture cessent progressivement de se diviser même dans des conditions idéales de croissance. Cette limitation du potentiel prolifératif dépend du nombre de divisions cellulaires écoulé et non du temps que la cellule a passé en culture. Ce phénomène a donc été appelé « sénescence répliquative » ou *mortality stage one* (M1) [1, 2]. L'état de sénescence a été à l'origine décrit dans les fibroblastes humains normaux [3], puis a été observé dans divers types de cellules humaines [4] et dans des fibroblastes d'autres espèces [5]. La sénescence est un phénotype dominant dans les cellules humaines qui sont rarement susceptibles de transformation maligne en culture.

De nombreuses observations ont établi un lien entre le phénomène de sénescence des cellules décrit en culture et le vieillissement *in vivo*: la capacité de prolifération des cellules est corrélée à l'espérance moyenne de vie de l'espèce [5]; elle décroît en culture avec l'augmentation de l'âge du donneur et les cellules issues de patients atteints du syndrome de Werner (affection génétique caractérisée par un vieillissement prématuré) possèdent un potentiel prolifératif plus réduit que celles issues de donneurs normaux du même âge [6]. Ces données suggèrent la présence d'une horloge mitotique génétique qui enregistre le nombre de divisions cellulaires, plutôt que l'âge chronologique ou métabolique. De plus, des similitudes dans l'expression de gènes ont été observées entre les cellules sénescents *in vitro* et les cellules de tissus âgés *in vivo* [7], confortant l'idée que le processus de sénescence constitue un événement directement lié au vieillissement *in vivo*.

Comment se définit le phénotype sénescents? L'état classique de sénescence dans les fibroblastes humains normaux représente un phénotype dans lequel, bien que les cellules soient arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire, elles restent biologiquement actives et viables pour de longues périodes à condition que le milieu de culture soit changé régulièrement [8]. La sénescence est un état stable et les cellules sont résistantes au phénomène d'apoptose [9]. L'arrêt de la prolifération associé au processus de sénescence a été très étudié dans les fibroblastes humains en culture. Il ressort de ces études que beaucoup de gènes, incluant au moins trois proto-oncogènes, demeurent inductibles par les agents mitogènes, bien que les cellules aient perdu leur capacité de mettre en route la réplication de leur ADN en réponse à toute combinaison physiologique optimale d'agents mitogènes [10]. Donc, les cellules sénescents n'auraient pas perdu leur capacité de proliférer à cause d'une défaillance générale des voies de transmission des signaux empruntées par les facteurs de croissance. En revanche, il est maintenant connu que le processus de sénescence provoque la répression sélective de gènes régula-

teurs positifs de la croissance, gènes dont l'expression est importante pour la transition G1/S et pour la synthèse d'ADN. Dans les fibroblastes, ces gènes comprennent le proto-oncogène *c-Fos* [10], membres de la famille des protéines nucléaires contenant un motif hélice-boucle-hélice ID-1 et ID-2 [11], les facteurs de transcription E2F-1 et E2F-5, et le gène de susceptibilité au rétinoblastome (*pRb*). La protéine pRb, qui est constitutivement déphosphorylée dans les cellules sénescents, exercerait une action antiproliférative par sa liaison au facteur E2F et l'empêcherait ainsi de transactiver des gènes nécessaires à la réplication de l'ADN (*m/s 1996, n° 10, p. 1115*).

Le maintien des gènes qui sont des régulateurs positifs de la progression du cycle cellulaire dans un état réprimé pourrait être la cause immédiate de l'échec des cellules sénescents à débiter la synthèse d'ADN. Toutefois, ce déficit d'expression des gènes ne peut pas être la cause première de l'arrêt de croissance associé à la sénescence. Des expériences de fusion de cellules somatiques ont très clairement montré que la limite de la durée de vie et l'arrêt de la croissance associé à l'état de sénescence sont des phénotypes dominants [12]. Il semble donc que la présence d'un ou de plusieurs inhibiteur(s) joue(nt) un rôle majeur dans le contrôle de la sénescence.

L'hypothèse évoquée pour expliquer l'arrêt de la prolifération accompagnant la sénescence (et qui sera retenue ici), est l'existence d'une horloge moléculaire qui garde une trace du nombre de divisions cellulaires écoulées [13] et non pas, comme proposé précédemment, une accumulation croissante de mutations. Bien que de nombreux travaux aient été consacrés à l'étude des mécanismes impliqués dans la sénescence, la signification biologique qui sous-tend ce processus reste encore mal comprise. Différents gènes ont été décrits et leurs rôles dans l'arrêt de la prolifération associé à la sénescence commencent à être élucidés. Certains des mécanismes de la sénescence impliqueraient l'activation d'anti-oncogènes. Dans cet article, nous ferons une synthèse de nos résultats et de ceux d'autres groupes qui relie le concept de sénescence,

reflet d'une réaction physiologique se produisant durant le vieillissement des organismes, au mécanisme suppresseur de tumeurs.

La longueur des télomères constituerait l'horloge mitotique

Les télomères sont les structures terminales des chromosomes et sont constitués de la séquence non codante -TTAGGG- répétée en tandem [14]. Les télomères et les protéines qui leur sont associées remplissent une fonction vitale dans le maintien de l'intégrité structurale des chromosomes, particulièrement en empêchant les associations et les fusions bout à bout. La réplication des extrémités 3' des molécules d'ADN double-brin par les mécanismes conventionnels est incomplète, entraînant un raccourcissement inévitable de la séquence télomérique à chaque division cellulaire. Chez certaines cellules eucaryotes, les télomères sont synthétisés par une transcriptase inverse particulière, la télomérase. Dans certaines cellules somatiques telles que les fibroblastes, du fait de l'absence de la télomérase, les télomères sont progressivement perdus au cours des divisions cellulaires. Il a été postulé qu'une longueur minimale critique du télomère déclencherait un signal d'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence [14]. L'entrée en sénescence (ou M1) peut être contrecarrée par l'activation d'oncogènes cellulaires ou viraux. Les cellules ayant bénéficié d'un allongement de leur capacité proliférative, par exemple par l'expression de la protéine T du virus oncogène *simian virus 40* (SV40), entrent éventuellement dans une phase appelée « crise » ou *mortality stage two* (M2), caractérisée par la mort cellulaire et l'apparition d'aberrations chromosomiques importantes (*m/s 1992, n° 7, p. 738*) [15] (*figure 1*). De telles cellules présentent une grande réduction dans la taille moyenne de leurs télomères, ce qui est en accord avec la perte de la fonction protectrice effective des bouts d'au moins une classe de télomères dans chaque cellule. En outre, l'échappement à la crise, s'il se produit, est presque toujours associé à la réactivation de la télomérase (ou à

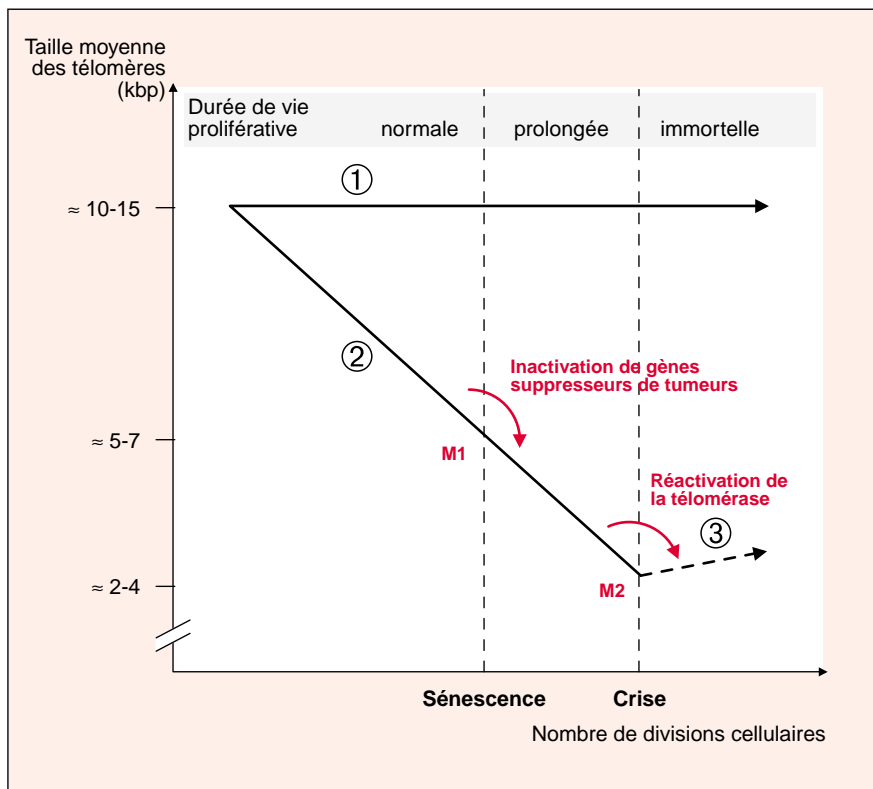


Figure 1. **L'hypothèse de l'horloge télomérique dans la sénescence.** L'enzyme télomérase est requise pour le maintien de la taille des télomères. La télomérase est active dans les cellules germinales et dans certaines cellules souches de l'organisme adulte (1) contribuant à la stabilité de la taille de leurs télomères. Selon le type de cellules somatiques, les niveaux de télomérase sont variables et le raccourcissement de leurs télomères s'effectue à une vitesse différente. Dans les cellules tels les fibroblastes (2), les télomères se raccourcissent à chaque cycle de réplication jusqu'à atteindre une taille critique qui provoquerait un signal d'arrêt des divisions cellulaires, phénotype appelé (M1) ou sénescence. L'entrée en sénescence peut être supprimée à la suite de la perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeurs. Cependant, les télomères de ces cellules transformées diminuent au fur et à mesure des divisions contribuant à une instabilité des chromosomes. Les cellules vont alors entrer en crise (M2), caractérisée par la mort d'un grand nombre de cellules. Certaines cellules (3) ayant développé un moyen de stabiliser la longueur de leurs télomères (par réactivation de la télomérase par exemple) vont survivre à la crise et devenir immortelles. (D'après [2].)

un mécanisme équivalent) qui empêche le raccourcissement des télomères de se poursuivre [15-17] et peut même restaurer la longueur des télomères. La perte de la séquence télomérique peut alors constituer la barrière physique ultime à l'immortalisation des cellules somatiques normales. La stabilisation de la taille des télomères pourrait être indispensable à la progression de très nombreuses tumeurs; en d'autres termes, le raccourcissement des télomères est un mécanisme suppresseur de tumeur. Il

n'est alors pas surprenant de détecter une activité télomérase dans plus de 90 % des tissus cancéreux, alors que les tissus sains correspondants en sont dépourvus ou possèdent une activité insuffisante pour assurer le maintien de la taille de leurs télomères.

Des travaux récents ont apporté de forts arguments en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'érosion des télomères n'est pas simplement un enregistreur passif du vieillissement clonal, mais joue en réalité un rôle

direct dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Le gène de la sous-unité catalytique de la transcriptase inverse de la télomérase humaine (hTERT) a récemment été cloné [18]. La plupart des cellules humaines somatiques n'expriment pas la transcriptase inverse, mais contiennent tous les autres composants du complexe enzymatique de telle sorte que l'expression de la hTERT manquante confère à la cellule l'activité télomérase [18]. Bodnar *et al.* de la Société Geron (Menlo Park, CA, USA) ont testé l'effet d'une activation inappropriée de l'enzyme télomérase sur la durée de vie des fibroblastes humains normaux. La surexpression de l'activité télomérase conduisant à l'élongation artificielle des télomères augmente considérablement leur potentiel prolifératif normal [19] et les rend probablement immortels (W. Wright, communication personnelle). Ces cellules ont retrouvé une morphologie et un temps de doublement semblables à ceux des populations de cellules jeunes; elles présentent également un caryotype normal, indiquant qu'elles ne sont pas identiques aux cellules immortalisées issues d'événements se produisant lors de la crise. Ces résultats ont été obtenus avec trois différents types de cellules primaires (cellules épithéliales de la rétine, fibroblastes de la peau, cellules endothéliales vasculaires) attestant du caractère quasi universel du rôle du raccourcissement des télomères dans le processus de sénescence des cellules humaines. En accord avec l'hypothèse de « l'horloge télomérique », il existe une très bonne corrélation entre le raccourcissement de l'ADN télomérique qui est estimé à 50-100 bp par division cellulaire et la diminution de la taille des télomères observée dans les fibroblastes humains sénescents (la longueur des télomères dans les fibroblastes humains jeunes est de 9-10 kbp tandis qu'elle n'est plus que d'environ 6 kbp dans les fibroblastes sénescents) [15, 20, 21]. Naturellement, il reste à comprendre par quels mécanismes le maintien d'une longueur de télomères à 6 kbp rend les fibroblastes humains normaux sénescents. L'utilisation de la technique quantitative d'hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes a permis d'individuali-

ser des chromosomes avec des télomères de taille significativement plus courte que la valeur moyenne trouvée dans la population de cellules sénescents. Un télomère anormalement court pourrait donc être à l'origine d'un arrêt du cycle cellulaire avant que toutes les répétitions télomériques ne soient perdues. Cependant, il n'apparaît pas clairement comment les télomères raccourcis provoquent un signal anti-prolifératif. Les télomères des cellules transformées par des oncogènes continuent de diminuer au fur et à mesure de leurs divisions; ce ne serait donc pas en soi les télomères raccourcis qui régleraient l'entrée en sénescence, mais plutôt un mécanisme actif de reconnaissance par la cellule des télomères raccourcis conduisant au blocage du cycle cellulaire en phase G1. Selon le modèle qui paraît actuellement le plus probable, un seul (ou plusieurs) télomère(s) particulièrement court(s) pourra(en)t déclencher un signal semblable à celui contrôlant la prolifération en réponse aux dommages de l'ADN [22]. Effectivement, la protéine p53 ainsi que ses effecteurs en aval jouent un rôle prépondérant dans la sénescence cellulaire et constituent vraisemblablement des intermédiaires de la voie de signalisation en réponse à la longueur des télomères (*m/s 1994, n° 8/9, p. 912*). Il faut souligner ici une importante différence entre les cellules humaines et celles d'autres espèces étudiées jusqu'à présent [23]. Chez la souris *M. musculus*, par exemple, l'entrée en sénescence répliquative se produit après un nombre de divisions (de l'ordre de 10 à 15) bien inférieur à celui observé chez l'homme, alors que leurs télomères ont une taille moyenne supérieure à celle des télomères de fibroblastes sénescents humains. Par ailleurs, le comportement en culture de cellules issues de souris transgéniques déficientes en télomérase indique que la durée de vie proliférative avant l'entrée en sénescence est largement indépendante de la longueur initiale des télomères. Ces observations suggèrent que, dans ces cellules, l'entrée en sénescence est réglée par une horloge autre que la taille des télomères dont la nature est à ce jour inconnue. Il sera très intéres-

sant de définir si cette voie alternative à la télomérase existe chez l'homme et, si tel est le cas, elle joue un rôle secondaire ou limité à certains types cellulaires.

Relations entre gènes suppresseurs du cancer et sénescence

L'hypothèse de la participation des gènes suppresseurs de tumeurs dans le déroulement de la sénescence est étayée par l'observation que l'entrée en sénescence peut être abolie par les effets d'oncoprotéines de virus à ADN qui ciblent des protéines régulatrices cellulaires spécifiques, en particulier, les produits des gènes suppresseurs de tumeurs.

Un certain nombre de travaux initiaux ont souligné l'importance de pRb et p53 dans le processus de sénescence, comme par exemple, l'extension du potentiel prolifératif des fibroblastes humains en culture ou l'immortalisation de certaines cellules épithéliales après transformation par des vecteurs qui codent pour l'antigène T de SV40 ou pour les oncoprotéines E6 et E7 de HPV (*human papilloma virus*). Ces données indiquaient que l'échappement à l'entrée en sénescence requerrait l'inactivation fonctionnelle de p53 et de pRb [24]. Par ailleurs, ces résultats ont été confortés par l'utilisation d'oligonucléotides antisens pour bloquer p53 et/ou pRb. L'inactivation de pRb par l'expression de l'oncoprotéine E7 de HPV [25], ou par introduction d'oligonucléotides antisens [26], a abouti à un rallongement de la durée de vie proliférative des fibroblastes humains normaux et d'autres types cellulaires. Cependant, il ressort de l'ensemble de ces études que l'inactivation de p53, à elle seule, ne serait pas suffisante pour échapper au contrôle normal de la sénescence (*m/s 1994, n° 8/9, p. 912*).

Nous avons réanalysé la question en utilisant une population de cellules proches de la sénescence, dans lesquelles la plus grande partie de la variabilité du potentiel prolifératif a été éliminée par la synchronisation de l'effet de la croissance jusqu'à quelques doublements de population avant la sénescence. La protéine p53 joue un rôle crucial: on observe un rallongement du potentiel proliféra-

tif (de l'ordre d'une vingtaine de doublements de population) des fibroblastes quasi sénescents, surexprimant le gène *TP53* muté de façon dominante négative ou le produit du gène *E6* (qui interagit avec p53 en induisant sa dégradation protéolytique) après infection par un vecteur rétroviral amphotrope [27]. Le rôle de l'inactivation de p53 est d'autant plus évident que son action apparaît dans un très bref délai, réduisant ainsi au minimum l'apparition spontanée d'événements supplémentaires. De tels résultats sont parfaitement en accord avec l'observation selon laquelle les fibroblastes des patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni (maladie autosomique dominante associée à des mutations germinales du gène *TP53*) présentent en culture un prolongement de leur potentiel prolifératif d'au moins 20-30 doublements de population lorsque l'allèle sauvage restant a été perdu [17, 28].

Ces données expérimentales utilisant des cellules proches de la sénescence suggèrent donc que l'établissement du phénotype sénescents peut être supprimé par l'inactivation, soit de p53, soit de pRb. Toutefois, il convient de souligner que, d'une part, ces résultats ont été pour la plupart fondés sur l'utilisation de techniques de transfert de gènes ou de transfection qui ciblent uniquement les cellules en cours de division et que, d'autre part, ces études ont essentiellement abordé le problème du délai de l'entrée en sénescence. Il est surprenant de constater que des résultats tout à fait différents ont été rapportés dans les tentatives visant à inverser le phénotype sénescents, c'est-à-dire lorsque les cellules ne se divisent plus. Le redémarrage de la synthèse d'ADN dans les cellules sénescents requiert l'inactivation fonctionnelle de p53 et de pRb, l'expression de l'oncoprotéine E6 de HPV ou de mutants de SV40 T défectueux dans l'une ou l'autre de ces fonctions, ne donnant qu'une réponse réduite ou indétectable [29]. Étant donné l'importance de ces résultats pour notre conception du rôle de ces gènes dans la sénescence, il nous a paru intéressant de reconsidérer ces données en utilisant la technique de micro-injection, pour introduire dans les fibroblastes

humains sénescents des anticorps monoclonaux connus pour neutraliser l'activité de p53. En opposition avec les résultats précédents, nous avons montré que l'inactivation de l'activité de p53, sans inhibition de la voie pRb, suffit à elle seule pour restimuler la synthèse d'ADN et induire la division cellulaire [30]. Cette réponse proliférative s'accompagne d'un retour vers une morphologie plus jeune et d'une réduction de l'activité SAβgal (une activité de l'enzyme β-galactosidase associée à la sénescence cellulaire qui peut être détectée à pH 6). Ces résultats apparemment contradictoires s'expliqueraient par le fait que l'inactivation de p53 par l'expression de vecteurs codant pour le gène *TP53* muté de façon dominante négative ou l'antigène T de SV40 n'est que partielle [30].

L'ensemble de ces données constitue la démonstration la plus convaincante que la fonction de p53 normale apparaît comme un élément déterminant dans le contrôle de la mise en route et/ou le déroulement du phénotype sénescence dans les fibroblastes humains normaux. Par ailleurs, bien que moins approfondies, des études sur d'autres types cellulaires ont confirmé pour la plupart d'entre eux l'intervention de p53 dans l'apparition du phénomène de sénescence. Il existe des exceptions, notamment les cellules épithéliales du sein et de la thyroïde, pour lesquelles la durée de vie proliférative semble dépendre de pRb et non pas de p53 [22].

Le fait que l'entrée en sénescence dépende de p53 conduit à une nouvelle conception du rôle de p53 dans les cancers humains. Jusqu'à présent, l'hypothèse proposée pour expliquer la fréquence des mutations inactivatrices du gène *p53* dans les cancers humains ne reposait que sur son rôle d'inhibiteur de la prolifération induit par l'ADN endommagé. L'absence de signal antiprolifératif permettrait à la cellule tumorale dépourvue de p53 fonctionnelle de répliquer son ADN, même en présence de brins endommagés, entraînant une instabilité génétique et un risque élevé de mutations. Cette notion de « gardien du génome » [31] explique bien l'instabilité génomique qui suit une mutation de *p53*. Mais cela

n'explique pas pourquoi la perte de fonction de p53 ne devient significative que dans les stades tardifs d'un cancer, alors qu'il n'y a aucune raison évidente pour s'attendre à une augmentation du taux d'endommagement de l'ADN. Les résultats décrits ci-dessus suggèrent que le signal qui survient dans les stades tardifs des tumeurs, et qui rend nécessaire la mutation de *p53*, ne serait autre que le raccourcissement des télomères. Autrement dit, la pression sélective qui rend compte de la fréquence aussi élevée de ces mutations est la nécessité d'échapper à la sénescence cellulaire. L'instabilité génomique n'en est que la conséquence (*m/s* 1994, n° 8/9, p. 912).

Plusieurs groupes ont récemment mis en évidence un phénomène de sénescence dite « prématurée » déclenchée dans les fibroblastes humains normaux par l'activation inappropriée de la voie de transmission du signal Ras → Raf → MAPK [32-34]. Cet état ressemble à la sénescence « classique » et est associé à l'accumulation et/ou à l'activation des mêmes protéines inhibitrices du cycle cellulaire, notamment p53, mais survient après un ou deux doublings de population. Ainsi, ce phénotype de sénescence « prématurée » a suscité un intérêt particulier car il pourrait constituer un mécanisme physiologique de défense contre le début de la tumorigenèse par l'activation d'oncogènes *Ras* et il a été suggéré que la perte de ce contrôle constitue une pression sélective conduisant à la mutation de *p53*. Pourtant, cette hypothèse nous apparaît peu convaincante étant donné que le phénotype de sénescence « prématurée » survient très rapidement. Par conséquent, le développement d'un clone de cellules poussant sous l'influence d'un gène *Ras* muté est si limité que la probabilité qu'une de ses cellules subissent une mutation de *p53* reste minime.

Mécanisme d'action de p53 dans la sénescence

La protéine p53 présente un domaine spécifique de liaison à l'ADN cellulaire et elle agit comme facteur de transcription pour transactiver des gènes dont les produits ont une fonction de contrôle du cycle

cellulaire. La protéine p53 a également un effet direct inhibiteur de la réplication de l'ADN. Étant donné que la contribution de la p53 normale apparaît nécessaire à l'accomplissement normal de l'arrêt prolifératif dans la sénescence, il est important de déterminer si elle agit comme un inducteur direct du processus ou si elle est simplement nécessaire à un niveau constant en tant que facteur permissif pour permettre à d'autres inducteurs d'opérer.

La comparaison de l'expression d'un vecteur rapporteur contenant des sites de liaison de p53 endogène dans son promoteur, introduit par micro-injection dans des fibroblastes humains normaux jeunes et sénescents, a fourni les premiers indices d'une augmentation de l'activité de transactivation de p53 associée à la sénescence [35]. L'induction de l'activité de transactivation de p53 a été confirmée dans un sous-clone de fibroblastes humains normaux transfectés de façon stable par un vecteur rapporteur exprimant le gène *LacZ* codant pour l'enzyme β-galactosidase bactérienne sous le contrôle d'un promoteur inducible par p53 [36]. Lorsque les cellules approchent la sénescence, nous avons observé une relation inverse entre l'activité de l'enzyme β-galactosidase bactérienne et le taux de prolifération mesuré par incorporation de bromodésoxyuridine (*figure 2*). Le niveau d'induction de la synthèse de la β-galactosidase est comparable au maximum qui peut être obtenu par l'irradiation des cellules aux ultraviolets, qui est un activateur de p53 bien établi. Ces résultats suggèrent que l'activation de la fonction de p53 est une étape essentielle pour l'engagement de la cellule vers le processus de sénescence, ce qui n'exclut pas, bien sûr, l'implication d'une de ses autres fonctions.

Curieusement, à la différence de la cellule exposée à certains stimulus activateurs de la fonction p53 (notamment aux dommages de l'ADN provoqués par le traitement des cellules aux ultraviolets), dans laquelle la protéine p53 s'accumule dans le noyau des cellules et peut être ainsi aisément détectée en immunocytochimie, l'activation transcriptionnelle de p53 dans les fibroblastes sénescents ne semble pas

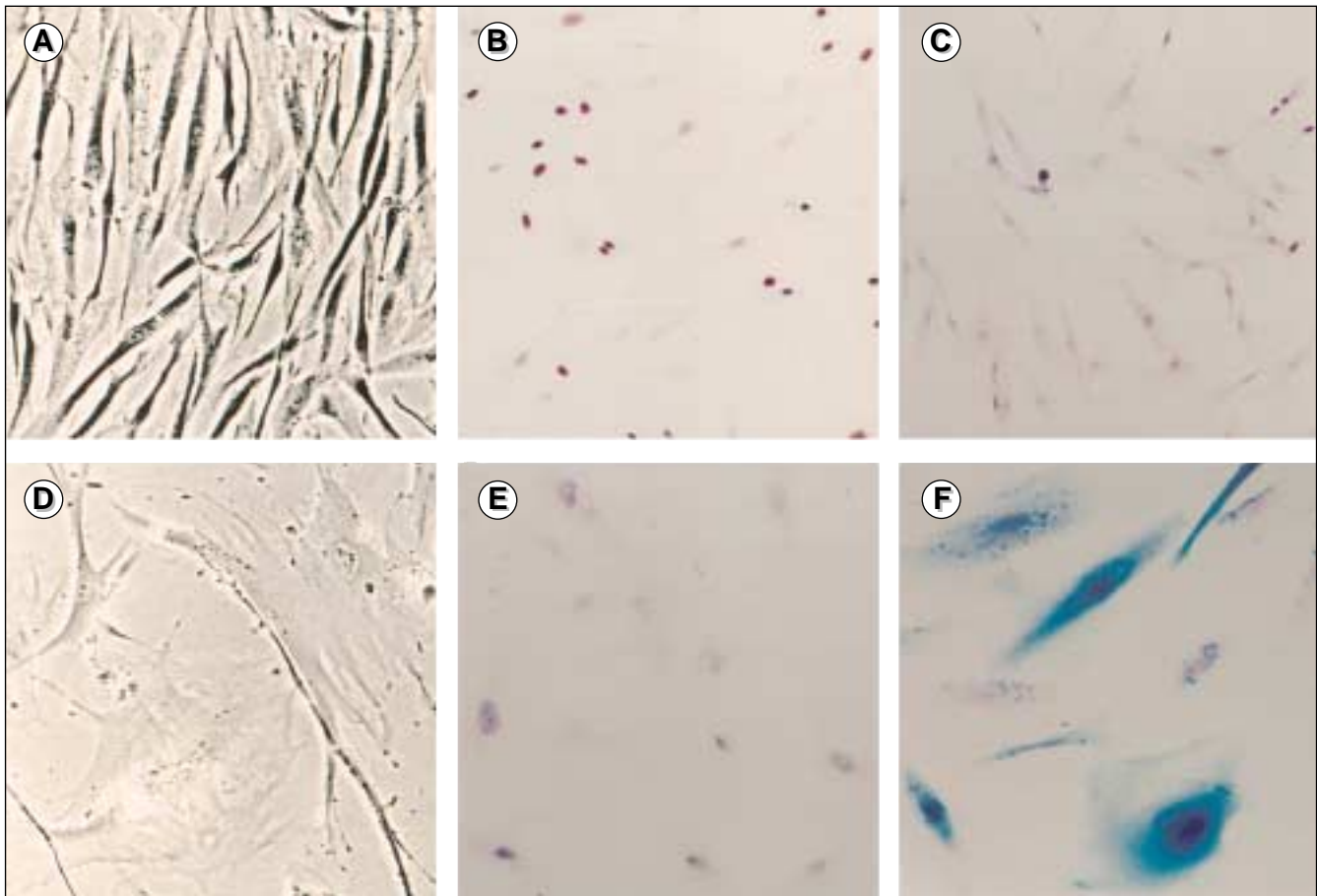


Figure 2. **L'induction de l'activité de transactivation de p53 est corrélée à la diminution de l'index prolifératif qui accompagne l'entrée en sénescence.** Des fibroblastes humains normaux jeunes ont été transfectés de façon stable par un vecteur rapporteur exprimant le gène LacZ sous le contrôle d'un promoteur inductible par p53. Les cellules ont été analysées après 24 (A, B, C) et 32 (D, E, F) doublements de population (dp) (dp 32 correspond à la fin de la durée de vie proliférative et le nombre de divisions déterminé à partir du clone est équivalent à > 60 dp pour la culture non clonée d'origine). Photographies en contraste de phase soulignant le grand changement de morphologie entre les fibroblastes jeunes (A) et sénescents (D). La synthèse d'ADN a été mesurée par incorporation de bromodésoxyuridine pendant 24h (B, E) et mise en évidence par immunocytochimie au moyen d'anticorps (noyaux bruns). L'induction transcriptionnelle de p53 a été déterminée par l'activité β -galactosidase révélée par le colorant X-gal (précipités bleus) dans C, F. Contre-coloration par l'hématoxyline. (D'après Bond et al. [36] avec la permission des auteurs.)

être accompagnée par une stabilisation notable de la protéine. En effet, bien que quelques études aient rapporté une augmentation modérée (2-3 fois), la plupart [35, 36] n'ont pas réussi à démontrer une augmentation reproductible en protéine p53 dans les fibroblastes humains normaux sénescents. Ce n'est peut-être pas surprenant, puisqu'il apparaît maintenant clair que la stabilisation de p53 n'est pas un prérequis à son activation [37].

Cependant, les mécanismes responsables de l'induction de l'activité transcriptionnelle de p53 dans la sénescence restent encore inconnus.

Elle pourrait résulter, soit d'une modification directe post-traductionnelle de p53 vraisemblablement par phosphorylation, soit d'une augmentation de l'activité d'un co-facteur transcriptionnel, tel que p33ING1 [38] ou de la répression de l'activité d'un inhibiteur.

Les effecteurs fonctionnels de p53 et de pRb

L'effet de p53 pourrait passer, au moins en partie, par l'activation de gènes fortement exprimés dans les cellules sénescents qui contiennent un domaine de liaison à p53 dans

leurs séquences régulatrices et dont la transcription est induite par p53 (*m/s* 1994, n° 6/7, p. 744).

Le gène *WAF-1/CIP-1/SDI-1* s'avère être le candidat évident (*m/s* 1998, n° 8/9, p. 973). La protéine p21^{waf-1/cip-1/sdi-1} est un inhibiteur de l'activité des complexes kinases dépendantes des cyclines (cdk)/cyclines nécessaires à la transition G1/S du cycle cellulaire. Il existe une série d'arguments qui sont très favorables au rôle de p21^{waf-1/cip-1/sdi-1} dans l'arrêt de la division cellulaire associé à la sénescence.

Les fibroblastes humains sénescents expriment fortement la protéine p21^{waf-1/cip-1/sdi-1} [39]. Une implication

directe de p21^{waf-1/cip-1/sdi-1} dans l'entrée en sénescence a été confirmée récemment dans des fibroblastes humains normaux ne produisant pas la protéine, les deux allèles du gène ayant été invalidés par recombinaison homologue (*m/s* 1997, n°11, p. 1344) [40]. Le déficit en p21^{waf-1/cip-1/sdi-1} suffit à conférer aux cellules une extension de leur potentiel prolifératif. En revanche, les fibroblastes contraints à proliférer au-delà de leur point normal d'entrée en sénescence sous l'influence de p53 mutée ne présentent pas de réduction significative de leur contenu en p21^{waf-1/cip-1/sdi-1} [41]. Cela signifie que : (1) l'absence d'expression du gène p21^{waf-1/cip-1/sdi-1} n'est pas nécessaire pour que les cellules échappent à la sénescence; (2) ce n'est pas uniquement par l'intermédiaire de p21^{waf-1/cip-1/sdi-1} que p53 joue son rôle d'inducteur de la sénescence. Un autre gène candidat à l'origine de l'effet inhibiteur de la prolifération cellulaire associé à la sénescence serait le gène *p16^{INK4a}* [42]. Il est possi-

sible que, dans les cellules sénescents, l'augmentation de l'expression de p21^{waf-1/cip-1/sdi-1} et p16^{INK4a} soit responsable de l'accumulation des complexes cdk inactifs [43] et donc de la forme déphosphorylée de pRb [44] (*figure* 3). De plus, étant donné que p21^{waf-1/cip-1/sdi-1} peut inhiber E2F par un mécanisme dépendant et indépendant de pRb, la surexpression de p21^{waf-1/cip-1/sdi-1} peut également être responsable du manque d'activité de E2F dans les cellules sénescents. Toutefois, la réintroduction de l'activité E2F-1 dans les cellules sénescents n'est pas suffisante pour déclencher la synthèse d'ADN. Les mécanismes responsables de l'augmentation, associée à la sénescence, du contenu en protéines et en transcrits ARNm du gène *p16^{INK4a}* sont encore tout à fait inconnus. Néanmoins, il est peu probable que p16^{INK4a} et p21^{waf-1/cip-1/sdi-1} soient les seuls inhibiteurs de la prolifération exprimés par les cellules sénescents.

Conclusions

Les données présentées dans cet article valident l'hypothèse selon laquelle la durée de vie proliférative de la plupart des cellules humaines est limitée par une horloge biologique fondée sur l'érosion des télomères qui déclenche un signal d'arrêt du cycle cellulaire relayé par les protéines p53 et p21^{waf-1/cip-1/sdi-1}. Il s'ensuit que l'échappement à cette barrière naturelle contre l'expansion tumorale reposerait sur « l'arrêt de l'horloge » à la suite d'une expression inappropriée de l'enzyme télomérase ou de la perte de fonction de l'un de ses effecteurs primordiaux, notamment p53. En accord avec cette prédiction, ces deux altérations sont les plus fréquemment retrouvées dans les cancers humains et, de façon intéressante, sont très souvent détectées dans la même tumeur. Cette dernière observation est surprenante puisqu'on pourrait s'attendre à ce que des mutations au niveau des effecteurs en aval soient redondantes dès que la télomérase est activée. La réponse à ce paradoxe réside probablement dans la capacité des cellules de régler de façon très étroite l'expression de la télomérase, rendant statistiquement plus probable la mutation des effecteurs en tant que premier mécanisme de contournement de l'entrée normale en sénescence. La réactivation de la télomérase assurant le maintien des fonctions télomériques serait alors nécessaire pour contrecarrer le phénomène de crise.

En dehors du fait de fournir une explication satisfaisante à la pression sélective conduisant à la mutation de p53 et à l'activation des télomérases dans les cancers humains, ces observations ouvrent la voie à de nouvelles approches thérapeutiques anticancéreuses. Les tentatives visant à rétablir la fonction de p53 par surexpression du gène sauvage ont déjà donné des résultats très prometteurs chez les modèles animaux et les stratégies de transfert de ce gène au moyen de vecteurs adénoviraux commencent à être utilisées en clinique [45]. De même, des efforts de recherche et de développement d'inhibiteurs spécifiques de l'activité télomérase (pharmacologiques et génétiques) se sont déployés récemment. En effet, leur

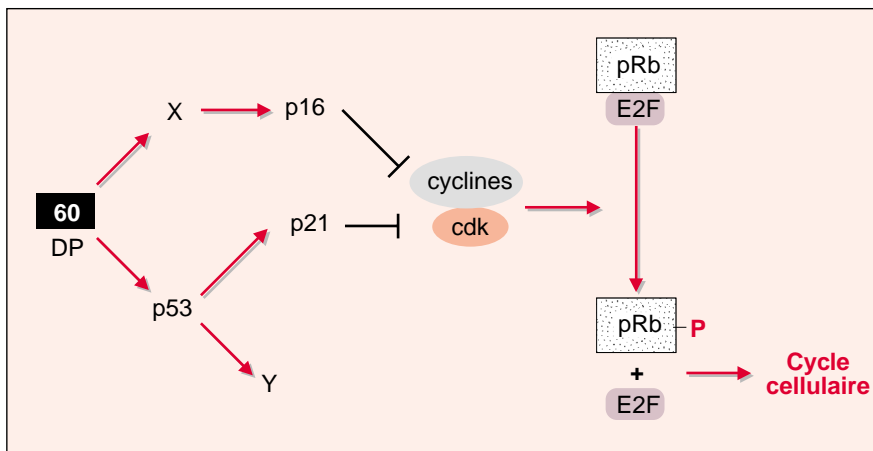


Figure 3. Interrelations entre les voies de signalisation contrôlant l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire dans les fibroblastes humains sénescents. L'arrêt de prolifération serait sous la dépendance de deux voies de signalisation majeures activées par l'horloge répllicative. L'une implique p53, inducteur de la surexpression de p21^{waf-1/cip-1/sdi-1} et d'au moins un autre médiateur (Y) non encore identifié. L'autre met en jeu un composant inconnu (X) qui stimule l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p16^{INK4a}. L'action majeure des protéines p21^{waf-1/cip-1/sdi-1} et p16^{INK4a} serait d'empêcher la phosphorylation de pRb en inhibant l'activité des complexes cyclines/kinases dépendantes des cyclines (cdk). La pRb constitutivement déphosphorylée se fixerait au facteur E2F et l'empêcherait ainsi d'activer la transcription des gènes nécessaires à la progression G1/S du cycle cellulaire. Les flèches indiquent les actions positives alors que les barres indiquent les actions négatives. DP: nombre de doublements de population.

exploitation en clinique présente aujourd'hui un intérêt majeur. Ces deux approches offrent l'espoir d'induire la mort des cellules cancéreuses avec une bien plus grande spécificité que les agents conventionnels endommageant l'ADN ■

Remerciements

Les travaux effectués dans le laboratoire ont été financés par l'organisme anglais, *Cancer Research Campaign*.

RÉFÉRENCES

1. Wright WE, Pereira-Smith O, Shay JW. Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 3088-92.
2. Harley C, Vaziri H, Counter C, Allsopp R. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol* 1992; 27: 375-82.
3. Hayflick L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; 37: 614-36.
4. Medrano EE, Yang F, Boissy R, et al. Terminal differentiation and senescence in the human melanocyte: repression of tyrosine-phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase 2 selectively defines the two phenotypes. *Mol Cell Biol* 1994; 5: 497-509.
5. Rohme D. Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts *in vitro* and erythrocytes *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 5009-13.
6. Martin GM, Sprague CA, Epstein CJ. Replicative lifespan of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype. *Lab Invest* 1970; 23: 86-92.
7. West MD. The cellular and molecular biology of skin aging. *Arch Dermatol* 1994; 130: 87-95.
8. Campisi J, Dimri GP, Hara E. Control of replicative senescence. In: Schneider E, Rowe J, eds. *Handbook of the biology of aging*. New York: Academic Press, 1996: 121-49.
9. Wang E. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res* 1995; 55: 2284-92.
10. Seshadri T, Campisi J. c-fos repression and an altered genetic program in senescent human fibroblasts. *Science* 1990; 247: 205-9.
11. Hara E, Yamaguchi T, Nojima H, et al. Id related genes encoding helix loop helix proteins are required for G1 progression and are repressed in senescent human fibroblasts. *J Biol Chem* 1994; 269: 2139-45.
12. Norwood TH, Pendergrass WR, Spargue CA, Martin GM. Dominance of the senescent phenotype in heterokaryons between replicative and post-replicative human fibroblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 2231-5.
13. Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 1991; 256: 271-82.
14. Marcand S, Brun B, Ancelin K, Gilson E. Les télomères: du normal au pathologique. *Med Sci* 1997; 13: 1250-8.
15. Counter CM, Avillion AA, Lefevre CE, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 1992; 11: 1921-9.
16. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-5.
17. Rogan EM, Bryan TM, Hukku B, et al. Alterations in p53 and p16^{INK4} expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 4745-53.
18. Koering C, Gilson E. Contrôle télomérique de la sénescence. *Med Sci* 1998; 14: 748-53.
19. Bodnar A, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279: 349-52.
20. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10114-8.
21. Klingelhutz AJ, Barber SA, Smith PP, Dyer K, McDougall JK. Restoration of telomeres in human papillomavirus-immortalized human anogenital epithelial cells. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 961-9.
22. Wynford-Thomas D. Cellular senescence and cancer. *J Pathol* 1998; 187: 100-11.
23. Wynford-Thomas D, Kipling D. Telomeres, cancer and the knockout mouse. *Nature* 1997; 389: 551-2.
24. Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE. A role for both Rb and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res* 1991; 92: 33-9.
25. Shay JW, Van der Haegen BA, Ying Y, Wright WE. The frequency of immortalization of human fibroblasts and mammary epithelial cells transfected with SV40 large T-antigen. *Exp Cell Res* 1993; 209: 45-52.
26. Hara E, Tsuru H, Shinozaki S, Oda K. Cooperative effect of antisense-Rb and antisense-p53 oligomers on the extension of life span in human diploid fibroblasts, TIG-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179: 528-34.
27. Bond JA, Wyllie FS, Wynford-Thomas D. Escape from senescence in human diploid fibroblasts induced directly by mutant p53. *Oncogene* 1994; 9: 1885-9.
28. Bischoff FZ, Yim SO, Pathak S, et al. Spontaneous abnormalities in normal fibroblasts from patients with Li-Fraumeni cancer syndrome: aneuploidy and immortalisation. *Cancer Res* 1990; 50: 7979-84.
29. Campisi J. Replicative senescence: an old lives tale? *Cell* 1996; 84: 497-500.
30. Gire V, Wynford-Thomas D. Reinitiation of DNA synthesis and cell division in senescent human fibroblasts by microinjection of anti-p53 antibodies. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 1611-21.
31. Lane DP. p53, gardien of the genome. *Nature* 1992; 358: 151-6.
32. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic *ras* provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16^{INK4a}. *Cell* 1997; 88: 593-602.
33. Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop MJ. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic *Raf*. *Genes Dev* 1998; 12: 2997-3007.
34. Lin AW, Baradas M, Stone JC, Van Aelst, Serrano M, Lowe SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK signaling. *Genes Dev* 1998; 12: 3008-19.
35. Atadja P, Wong H, Garkavtsev I, Geillette C, Riabowol K. Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8348-52.
36. Bond JA, Haughton M, Blaydes J, Gire V, Wynford-Thomas D, Wyllie FS. Evidence that transcriptional activation by p53 plays a direct role in the induction of cellular senescence. *Oncogene* 1996; 13: 2097-104.
37. Hupp TR, Sparks A, Lane DP. Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. *Cell* 1995; 83: 237-45.
38. Garkavtsev I, Riabowol K. Extension of the proliferative life span of human diploid fibroblasts by inhibition of the p33^{ING1} candidate tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 2014-9.
39. Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 1994; 211: 90-8.
40. Brown JP, Wei W, Sedevy JM. Bypass of senescence after disruption of p21^{CIP1/WAF1} gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 1997; 277: 831-4.
41. Bond JA, Blaydes JP, Rowson J, Haughton MF, Smith JR, Wynford-Thomas D. Mutant p53 rescues human diploid cells from senescence without inhibiting the induction of *SDI1/WAF1*. *Cancer Res* 1995; 55: 2404-9.
42. Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G. Regulation of p16^{CDKN2} expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 859-67.

RÉFÉRENCES

43. 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-cdk and cyclin D-cdk complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11034-8.
44. Stein GH, Beeson M, Gordon L. Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts. *Science* 1990; 249: 666-9.
45. Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD, *et al.* Retrovirus-mediated wild type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat Med* 1996; 2: 985-91.

TIRÉS À PART

D. Wynford-Thomas.

Summary

Senescence in human cells: an obstacle to tumour development?

The proliferative life span of most normal human cells, even in ideal growth conditions, is limited by intrinsic inhibitory signals which induce cell cycle arrest after a pre-set number of cell divisions. There is now good evidence that this process of «replicative senescence» is driven in many cell types by the progressive erosion of the specialised ends of chromosomes – telomeres – which act as a molecular «clock». Although many details are still to be elucidated, one major signal pathway linking telomere shortening to growth arrest operates via activation of the tumour suppressor gene (TSG) product, p53, which in turns induces the cell cycle inhibitor p21^{WAF1/CIP-1/SDI-1}. At least one other pathway involves another TSG-encoded cell cycle inhibitor, p16^{INK4a}, although in this case the link to the senescence clock is still unclear. Loss of these pathways by TSG mutation results in escape from senescence, but proliferative life span is still eventually limited by cell death («crisis») resulting from critical loss of telomere function. To acquire immortality therefore a developing tumour must undergo not only TSG mutation (*e.g.* p16^{INK4a} and p53) but also evade crisis by stabilization of telomere length, which is most often achieved by reactivation (or upregulation) of the enzyme telomerase. The need to circumvent successive proliferative life span «barriers» fits well with the concept of clonal evolution in tumourigenesis and the existence of multiple genetic abnormalities in nearly all types of human cancer.