

Vieillesse cellulaire, vieillissement et cancer

Malek Djabali, Hanane Agherbi

> La division cellulaire est essentielle pour la survie des organismes multicellulaires qui contiennent des tissus renouvelables. Cependant, la division cellulaire met aussi les organismes en danger de développer tous types de cancers. La sénescence cellulaire est en partie maintenant considérée comme un mécanisme anti-tumoral. Nous discuterons ici de la fonction et de la régulation des protéines suppresseurs de tumeurs INK4a/ARF en relation avec la sénescence répliative, le cancer et le vieillissement. <



M. Djabali : Chef d'équipe, Équipe Chromatine et mémoire cellulaire du CIML, Directeur de Recherche au CNRS, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Parc scientifique de Luminy, Case 906, 13288 Marseille Cedex 9, France. djabali@ciml.univ-mrs.fr
H. Agherbi : étudiante en thèse, CIML, Marseille, France.

La sénescence répliative *in vitro*

La sénescence cellulaire a été décrite, il y a plus de 40 ans, comme un processus qui empêche des fibroblastes humains normaux de se diviser indéfiniment en culture. La décennie passée nous a appris que ce processus, connu maintenant sous le nom de sénescence répliative, est induit par le raccourcissement des télomères. Cependant, il a été montré récemment que des stimulus n'ayant peu ou pas d'impact sur les télomères induisent aussi des cellules normales à arrêter leur croissance avec un phénotype de sénescence. Ces stimulus incluent des dommages de l'ADN, le remodelage de la chromatine et des signaux mitogènes forts. Ainsi, la sénescence répliative est un exemple d'un processus physiologique plus général, que nous appellerons ici « sénescence cellulaire ». La sénescence cellulaire entraîne de profonds changements de l'expression des gènes, dont seuls quelques-uns sont impliqués dans l'arrêt de la prolifération. Ainsi, quelques cellules (fibroblastes et lymphocytes T humains) deviennent aussi résistantes à la mort apoptotique. De plus, toutes les cellules montrent des changements de fonction quand elles deviennent sénescents et restent métaboliquement actives.

Les acteurs moléculaires de la sénescence

Au plan moléculaire, on sait qu'un locus particulier dans le génome des mammifères, le locus Ink4a/ARF, lorsqu'il

Les génomes sont continuellement endommagés par des stress environnementaux, et, dans des cellules se divisant, par des erreurs de la réplication de l'ADN. Selon le niveau et le type de dégâts, les cellules peuvent tenter de réparer le génome, ou mourir. Dans des cellules se divisant, l'un des risques majeurs est l'apparition de mutations, qui sont produites par des échecs ou des erreurs de la réparation. Si une mutation confère un avantage de survie/prolifération, ou induit une instabilité génomique, alors les risques de développer des cancers sont très élevés.

Les organismes complexes ont développé au moins deux mécanismes cellulaires pour inhiber la prolifération de cellules présentant des risques de transformation : l'apoptose ou mort cellulaire programmée et la sénescence cellulaire. La sénescence cellulaire arrête de façon irréversible la croissance cellulaire et est une barrière majeure que les cellules doivent surmonter pour progresser vers un état tumoral.

Cependant, tandis que l'apoptose élimine des cellules potentiellement cancéreuses, la sénescence répliative bloque irréversiblement leur prolifération. Les cellules sénescents peuvent être identifiées par plusieurs caractéristiques : (1) elles expriment spécifiquement la β -galactosidase endogène à pH 6 [1, 2] ; (2) elles sont bloquées en phase G1 du cycle ; (3) leur nucléole est fragmenté [3, 4].

Des découvertes récentes ont permis de nouvelles avancées sur les causes de sénescence cellulaire, la complexité du phénotype de sénescence et les conséquences potentielles de la sénescence cellulaire pour l'organisme.

est exprimé, induit l'état de sénescence *via* un certain nombre de *pathways* qui conduisent au blocage du cycle cellulaire.

Lorsque le locus *Ink4a/ARF* est exprimé, la phase G1 du cycle va progressivement s'allonger et finalement induire l'arrêt du cycle cellulaire. Ainsi au cours de la prolifération de fibroblastes embryonnaires, après une dizaine de passages, l'accumulation de la protéine p16 va induire un blocage du cycle cellulaire.

Le locus *ink4a/b* inclut 3 gènes, *p15*, *p16* et *p19* (ou *ARF*), chacun induisant une voie particulière : La protéine p16, un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines (CDK4 et CDK6) de la phase G1 du cycle cellulaire, est impliquée dans l'activité transcriptionnelle de la cellule à plusieurs titres :

1. Inhibition de la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb), inhibition directe de NfκB.

2. Régulation de l'activité de l'oncogène *Myc* et inhibition de CDK7.

L'activité de suppresseur de tumeur de *ARF* est principalement attribuée à sa capacité de régulation de la protéine p53 en réponse à une prolifération aberrante ou un stress oncogénique tel que l'activation de c-MYC. *ARF* se lie à la protéine MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*), et MDM2 régule négativement p53. Un des mécanismes proposé pour expliquer cette fonction est que MDM2 agit comme une E3 ubiquitine ligase et cible p53 vers la dégradation protéasomique. Bien qu'*ARF* et p53 soient très fortement liés biochimiquement et génétiquement dans leur fonction de suppresseurs de tumeurs, des fonctions de *ARF* p53-indépendantes ont été également rapportées. Par exemple, l'expression de la protéine *ARF* est nécessaire pour induire la régression vasculaire au cours du développement de l'œil, et ce indépendamment de l'expression de p53 [5]. De plus, la surexpression d'*ARF* induit un arrêt de cycle cellulaire des fibroblastes d'embryon murin (MEF) présentant une délétion du gène *p53* [6-8].

Un certain nombre de cancers humains présentent fréquemment une délétion homozygote du locus *INK4a/ARF/INK4b* qui inactive l'expression des trois gènes. Ce point a animé le débat sur le rôle suppresseur de tumeur de chacune de ces protéines. Les études d'inactivation de souris spécifiquement déficientes pour *ARF*, *p15INK4b*, ou *p16INK4a* ont révélé que chacune de ces trois lignées mutantes développe des cancers plus fréquemment que les souris sauvages mais que les doubles mutants (*p16/arf*, par exemple) sont encore plus fréquemment atteints de cancer démontrant ainsi une synergie entre ces deux protéines. Cette synergie peut expliquer que certains cancers (entre autres, les leucémies aiguës lymphoblastiques à cellules T) présentent avec une fréquence très élevée des délétions homozygotes complètes du locus *INK4ab*. Cependant, des mutations somatiques de *ARF* seul ont été décrites dans certains cas de cancer du côlon [9].

Des résultats récents ont démontré que la réactivation de la protéine p53 dans des hépatocarcinomes murins (dans lesquels p53 était inactivée) est suffisante pour bloquer la prolifération des cellules tumorales. De plus, cette réactivation de p53 n'induit pas l'apoptose des cellules tumorales mais, au contraire, l'induction du programme de sénescence associé à la différenciation des cellules et à l'expres-

sion de cytokines déclenchant une réponse immune permettent l'élimination des cellules tumorales [10, 11]. Ce résultat démontre l'importance de la sénescence répllicative dans l'arrêt du potentiel de prolifération d'une tumeur et souligne que l'induction de la sénescence induite par la protéine p53 peut interagir avec le système immunitaire pour bloquer la progression tumorale.

Vieillesse et sénescence

Des résultats récents de plusieurs groupes suggèrent un rôle des mécanismes de sénescence dans le vieillissement des mammifères. Ces expériences ont été motivées par l'observation en 1977 du groupe de Sherr *et al.* [12, 13], confirmée plus tard par plusieurs groupes [14, 15], qui démontre que l'expression de p16INK4a augmente nettement avec le vieillissement dans beaucoup de tissus humains et murins. Plusieurs résultats suggèrent que l'expression de p16INK4a participe aux mécanismes cellulaires de vieillissement, en particulier dans les cellules souches hématopoïétiques humaines (CSH). Des expériences de transplantation ont clairement établi un déclin du potentiel d'autorenouvellement des CSH avec le vieillissement, et que l'expression de p16 en est l'une des causes en inhibant les capacités d'auto renouvellement et de prolifération des cellules souches de nombreux organes.

Polycomb et la répression épigénétique du locus *Ink4a*

La régulation transcriptionnelle de l'expression de *p16/p19* constitue le pivot essentiel lors du vieillissement cellulaire et de la réponse au stress, oncogénique en particulier. La régulation épigénétique Polycomb (Pc-G)-dépendante a émergé comme une fonction majeure dans le contrôle de la prolifération au cours du développement. Chez les mammifères, les complexes Pc-G régulent les capacités d'auto renouvellement des cellules souches embryonnaires ou adultes et sont directement impliqués dans de très nombreux cancers. Les protéines Pc-G ont d'abord été caractérisées comme des régulateurs de l'expression des gènes homéotiques. Les Pc-G agissent sur la chromatine pour réprimer de manière stable l'expression de leurs cibles au cours des divisions cellulaires et au cours du développement. Du point de vue moléculaire, l'une des fonctions des complexes Pc-G est de modifier spécifiquement (par méthylation) la queue amino-terminale des histones. Les protéines Pc-G

forment au moins deux groupes de complexes multimériques fixés à la chromatine : les complexes PRC1 et PRC2/3/4 (complexe EZH2-Eed chez les mammifères). Ces différents complexes sont recrutés séquentiellement à la chromatine des gènes cibles. PRC2/3/4 a une fonction histone méthyltransférase spécifique de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27) *in vivo*. Le complexe PRC1 contenant entre autres les protéines Pc-G M33 et BMI peut être recruté par H3K27 grâce au chromodomaine de la protéine M33. Ce recrutement permet alors au complexe de réprimer la transcription en inhibant la fonction de remodelage des nucléosomes par le complexe SWI/SNF (pour revue, voir [16]). La fonction répressive des Pc-G sur le locus INK4a/ARF a été décrite initialement grâce à l'analyse des souris mutantes pour deux membres du complexe PRC1, BMI-1 et M33. La perte de Bmi-1 induit chez la souris la perte de la capacité d'autorenouvellement de diverses cellules souches (comme les CSH et les CSN [cellules souches neurales]). Cette déficience peut être corrigée si ces souris sont croisées avec des souris déficientes pour Ink4a/Arf, ce qui démontre le rôle déterminant de Bmi-1 sur la répression du locus INK4a. Ce résultat génétique vient d'être confirmé puisque les protéines du groupe PRC1 et PRC2 ont été localisées par des expériences de ChIP (*chromatin immunoprecipitation*) sur le locus INK4a dans des MEF lorsque les cellules prolifèrent [17, 18]. Lorsque les cellules sont sénescents, les protéines du groupe Pc-G ne sont plus retrouvées fixées au locus ; EZH2 est significativement réprimé dans les cellules sénescents ou stressées, ce qui coïncide avec une perte de la méthylation en lysine 27 de l'histone H3, et l'expression de p16 et de p19. Ces résultats établissent que l'expression du locus Ink4a/ARF est directement contrôlée par des mécanismes épigénétiques, et démontrent le rôle fondamental des PC-G dans le développement de cancers [18].

Répression du locus INK4a/Arf/INK4b par cdc6

Des résultats récents sur la régulation du locus INK4 suggèrent une coordination de la transcription du locus et de la réplication de l'ADN, bien que transcription et réplication soient considérées comme des mécanismes distincts (cette association n'ayant été décrite que chez la levure). Gonzalez *et al.* [19] ont décrit un mécanisme similaire liant la répression du locus Ink4a/Arf/Ink4b et la réplication de l'ADN. Ces auteurs ont identifié une origine de réplication à proximité immédiate du locus INK4, qui permet la répression de p16, p19 et p15 et qui est dépendante du recrutement de cdc6 associée aux autres protéines de la réplication. Ils démontrent également que la surexpression de CDC6 induit la répression du locus grâce au recrutement d'histones désacétylases au niveau de l'origine de réplication mais aussi sur les promoteurs des gènes p16 et p19. Cette nouvelle connexion entre la réplication et la transcription du locus INK4 est particulièrement intéressante au regard de CDC6 dont la surexpression est retrouvée dans certains cancers. Il reste maintenant à comprendre comment ce mécanisme de régulation interagit avec les autres répresseurs du locus et en particulier avec les protéines du groupe Polycomb. ♦

SUMMARY

Cellular ageing, ageing and cancer

Cellular division is essential for the survival of the multicellular organisms which contain renewable tissues. However, cellular division also puts the organisms in danger to develop any types of cancers. Cellular senescence has emerged in part as a tumor suppressor mechanism. Here we discuss the function and regulation of the tumor suppressor proteins INK4a/ARF in connection with replicative senescence, cancer and aging. ♦

RÉFÉRENCES

1. Dimri GP, Campisi J. Molecular and cell biology of replicative senescence. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994; 59 : 67-73.
2. Dimri GP, Testori A, Acosta M, Campisi J. Replicative senescence, aging and growth-regulatory transcription factors. *Biol Signals* 1996; 5 : 154-62.
3. Guarente L. Aging. What makes us tick? *Science* 1997; 275 : 943-4.
4. Guarente L. Chromatin and ageing in yeast and in mammals. *Ciba Found Symp* 1997; 211 : 104-11.
5. McKeller RN, Fowler JL, Cunningham JJ, *et al.* The Arf tumor suppressor gene promotes hyaloid vascular regression during mouse eye development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 : 3848-53.
6. Groth A, Weber JD, Willumsen BM, *et al.* Oncogenic Ras induces p19ARF and growth arrest in mouse embryo fibroblasts lacking p21Cip1 and p27Kip1 without activating cyclin D-dependent kinases. *J Biol Chem* 2000; 275 : 27473-80.
7. Weber GF, Ashkar S. Molecular mechanisms of tumor dissemination in primary and metastatic brain cancers. *Brain Res Bull* 2000; 53 : 421-4.
8. Weber GF, Ashkar S. Stress response genes : the genes that make cancer metastasize. *J Mol Med* 2000; 78 : 404-8.
9. Burri N, Shaw P, Bouzourene H, *et al.* Methylation silencing and mutations of the p14ARF and p16INK4a genes in colon cancer. *Lab Invest* 2001; 81 : 217-29.
10. Kastan MB. Wild-type p53 : tumors can't stand it. *Cell* 2007; 128 : 837-40.
11. Xue W, Zender L, Miething C, *et al.* Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 2007; 445 : 656-60.
12. Zindy F, Quelle DE, Roussel MF, Sherr CJ. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* 1997; 15 : 203-11.
13. Zindy F, Soares H, Herzog KH, *et al.* Expression of INK4 inhibitors of cyclin D-dependent kinases during mouse brain development. *Cell Growth Differ* 1997; 8 : 1139-50.
14. Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, *et al.* Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 2004; 114 : 1299-307.
15. Melk A, Schmidt BM, Takeuchi O, *et al.* Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney Int* 2004; 65 : 510-20.
16. Campisi J. Aging and cancer : the double-edged sword of replicative senescence. *J Am Geriatr Soc* 1997; 45 : 482-8.
17. Bracken AP, Kleine-Kohlbrecher D, Dietrich N, *et al.* The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes Dev* 2007; 21 : 525-30.
18. Dietrich N, Bracken AP, Trinh E, *et al.* Bypass of senescence by the polycomb group protein CBX8 through direct binding to the INK4A-ARF locus. *EMBO J* 2007; 26 : 1637-48.
19. Gonzalez S, Klatt P, Delgado S, *et al.* Oncogenic activity of Cdc6 through repression of the INK4/ARF locus. *Nature* 2006; 440 : 702-6.

TIRÉS À PART

M. Djabali