

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le vendredi 28 octobre 2022 à 18h15, à la Faculté
de Pharmacie de Lille, Amphithéâtre Pauling
Par M. François ROSE**

**La sénescence cellulaire : ses différents contextes et propriétés en vue
d'une perspective clinique**

Membres du jury :

Président : PAUMELLE-LESTRELIN Réjane, Professeure des universités à la faculté de pharmacie de Lille de l'UFR3S.

Directeur, conseiller de thèse : ABBADIE Corinne, Professeure à l'Université de Lille

Assesseurs : CAZIN Jean-Louis, Professeur de Pharmacologie et Pharmacie Clinique à la Faculté de Pharmacie (UFR3S, Université de Lille), - Directeur du Centre de Pharmacologie et Pharmacie Clinique en Cancérologie au Centre Oscar Lambret de Lille (Centre de Lutte Contre le Cancer des Hauts de France), - Président du Conseil Scientifique de la Société Française de Pharmacie Oncologique Oscar Lambret

BOUKHLEF Samir, Radiopharmacien au Centre Hospitalier de Valenciennes

Remerciements :

Je remercie Madame la Professeure ABBADIE Corinne d'avoir accepté d'encadrer ma thèse ; ses conseils, ses connaissances et ses commentaires sur un sujet qui fait partie de son thème de prédilection ont été des plus précieux dans la rédaction de ce mémoire.

Je remercie particulièrement les membres du jury : la présidente, Mme la Professeure PAUMELLE-LESTRELIN Réjane, Monsieur le Professeur CAZIN Jean-Louis et Monsieur BOUKHLEF Samir d'avoir pris sur leur temps pour lire et juger ce travail.

Merci à Madame la Professeure DUPONT Annabelle, coordonnatrice du DES Biologie Médicale.

Je remercie ma famille et mes amis, mes parents évidemment et mes co internes (particulièrement AC, BP, DL, GD, KB, LF) qui m'ont apporté leur soutien et leurs conseils dans cette aventure.

Faculté de Pharmacie de Lille
3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille
03 20 96 40 40
<https://pharmacie.univ-lille.fr>

Université de Lille

Président
Premier Vice-président
Vice-présidente Formation
Vice-président Recherche
Vice-présidente Réseaux internationaux et européens
Vice-président Ressources humaines
Directrice Générale des Services

Régis BORDET
Etienne PEYRAT
Christel BEAUCOURT
Olivier COLOT
Kathleen O'CONNOR
Jérôme FONCEL
Marie-Dominique SAVINA

UFR3S

Doyen
Premier Vice-Doyen
Vice-Doyen Recherche
Vice-Doyen Finances et Patrimoine
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires
Vice-Doyen RH, SI et Qualité
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie
Vice-Doyen Territoires-Partenariats
Vice-Doyenne Vie de Campus
Vice-Doyen International et Communication
Vice-Doyen étudiant

Dominique LACROIX
Guillaume PENEL
Éric BOULANGER
Damien CUNY
Sébastien D'HARANCY
Hervé HUBERT
Caroline LANIER
Thomas MORGENROTH
Claire PINÇON
Vincent SOBANSKI
Dorian QUINZAIN

Faculté de Pharmacie

Doyen
Premier Assesseur et Assesseur en charge des études
Assesseur aux Ressources et Personnels
Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement
Assesseur à la Vie de la Faculté
Responsable des Services
Représentant étudiant

Delphine ALLORGE
Benjamin BERTIN
Stéphanie DELBAERE
Anne GARAT
Emmanuelle LIPKA
Cyrille PORTA
Honoré GUISE

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques	87
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85

Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bioinorganique	85
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques	87
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie	86
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BLONDIAUX	Nicolas	Bactériologie - Virologie	82

Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique	85
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie	87
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	85
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie	87
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87

Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie	87
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85

Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85
M.	PIVA	Frank	Biochimie	85
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86

Maitres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques	85

Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	GEORGE	Fanny	Bactériologie - Virologie / Immunologie	87
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	RUEZ	Richard	Hématologie	87
M.	SAIED	Tarak	Biophysique - RMN	85
M.	SIEROCKI	Pierre	Chimie bioinorganique	85

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière

Sommaire

SOMMAIRE 11

TABLE DES ILLUSTRATIONS 13

INTRODUCTION ET RAPPELS : 14

[Introduction générale sur la sénescence cellulaire](#) 14

[Les mécanismes de réparation de l'ADN](#) 15

Prise en charge des cassures double brin ou DSB (double strand break) : 15

Le système de réparation des cassures simple brin ou SSBR (Single Strand Break Repair) : 24

La voie NER (Nucléotide Excision Repair) : 36

La voie MMR (Mismatch Repair) : 36

[Le cycle cellulaire](#) 39

Rôle central de la protéine du rétinoblastome dans le cycle cellulaire 39

Les inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines ou CKI (Cyclin-dependent Kinase Inhibitor) 43

LES SOUS-TYPES DE SENESCENCE ET LEUR CONTEXTE 47

[Introduction](#) 47

[La sénescence répllicative](#) 47

Pourquoi les extrémités des chromosomes ne sont-elles pas signalées et réparées comme des cassures double brin ? 48

Le télomère forme une boucle grâce au complexe shelterine 48

Le complexe shelterine et l'organisation en boucle protègent le télomère d'une signalisation par la voie DDR et d'une réparation 50

Comment est induit, malgré cela, la sénescence répllicative ? 50

[La sénescence prématurée](#) 53

[SIPS ou Stress-Induced Premature Senescence](#) 53

Découverte en 1995 53

La destinée cellulaire varie selon certains paramètres 53

Les types de stress induisant la SIPS sont nombreux 54

Mécanismes de mise en place de la SIPS 54

[OIS ou sénescence induite par les oncogènes](#) 57

OIS induite par l'oncogène RAS 57

OIS induite par l'oncogène BRAF V600E 59

Mécanismes de mise en place de l'OIS 60

[La TIS ou sénescence induite par la thérapie](#) 61

Inducteurs de TIS 62

Mécanismes d'induction de la TIS 62

Devenir des cellules sénescents dans une TIS 63

CARACTERISTIQUES DES CELLULES SENESCENTES ET IDENTIFICATION DE MARQUEURS 64

[Un profil sécrétoire différent : le SASP ou Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence](#) 64

Les composants du SASP 64

Les effets du SASP(59) 65

Modulation du SASP 66

[L'arrêt de prolifération](#) 66

[Résistance à l'apoptose](#) 67

[La \$\beta\$ -galactosidase associée à la sénescence \(SA- \$\beta\$ -gal\)](#) 67

[La diminution de la lamine B1](#) 68

[Les SAHF \(senescence-associated heterochromatin foci\)](#) 69

PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES 69

[La sénescence en physiopathologie](#) 69

[Premiers résultats pré cliniques par l'équipe de Baker, publiés en 2011\(69\) : 71](#)

Modèle de souris BubR1^{HH} INK-ATTAC 71

Clairance inductible des cellules sénescents 71

Résultats lorsque le traitement démarre au sevrage 72

Résultats lorsque le traitement démarre plus tard dans la vie 73

Conclusion : 73

Limites de l'étude 73

La suite des travaux de Baker *et al.* publiée en 2016 73

[La recherche de sénolytiques](#) 74

Contexte historique 74

Le dasatinib 75

La quercétine 75

[Des résultats cliniques avec les travaux d'Hickson et al. publiés en 2019](#) 76

Contexte historique	76
Rationnel pour l'étude d'Hickson <i>et al.</i>	76
L'étude clinique (87)	77
Perspectives thérapeutiques dans les traitements anti-cancéreux	77
Résultats <i>in vitro</i> de couplage chimiothérapie + sénolytique	78
Le traitement du cancer ovarien de haut grade par l'olaparib	78
Rationnel	79
Résultats (51)	79
Discussion(51):	79
CONCLUSION-DISCUSSION	80
RESUME	: 88

Table des Illustrations

Figure 1 : Schéma général de la mise en place de la sénescence cellulaire.....	14
Figure 2: Branches ATM et ATR de la voie DDR (DNA Damage Response)	17
Figure 3 : Réparation d'une DSB par c-NHEJ(7)	21
Figure 4 : Réparation d'une DSB par HDR (7).....	23
Figure 5 : Cassures simple brin (SSB) et le cycle d'ADP-ribosylation (9).....	26
Figure 6 : Réparation des cassures simple brin (SSB) directes induites par l'oxydation et la désintégration du désoxyribose (9).	29
Figure 7 : Réparation des cassures simple brin (SSB) induites par la topoisomérase 1 (TOP1) (9)	31
Figure 8 : Réparation des cassures simple brin (SSB) indirectes survenant lors de la réparation par excision des bases de l'ADN (BER) (9)	33
Figure 9 : Réparation de grande taille ("long patch") des cassures simple brin (SSB) (9).	35
Figure 10 : Illustration du système MMR eucaryote (15)	38
Figure 11 : Le cycle cellulaire (16).....	41
Figure 12 : La protéine du rétinoblastome RB et le cycle cellulaire (17)	42
Figure 13 : La signalisation p53-p21-RB (17)	44
Figure 14 : voie p16-RB.....	46
Figure 15 : Schéma d'un chromosome mitotique et le zoom sur un de ses quatre télomères.....	48
Figure 16 : Complexe shelterine lié au télomère (24)	49
Figure 17: Les complexes shelterine et le télomère (24)	50
Figure 18: Le stress oxydant entraîne l'activation de p53 par l'intermédiaire de la cavéoline-1	56
Figure 19 : la cascade de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK	58
Figure 20 : Rôle des espèces réactives de l'oxygène dérivées de NOX4 dans les lésions de l'ADN induites par RAS.....	61
Figure 21 : Représentation schématique de la distribution des maladies liées à l'âge et d'autres pathologies dans l'organisme où les cellules sénescents jouent un rôle important dans leur développement (77).	70
Figure 22: Schéma de la construction INK-ATTAC et du mécanisme d'activation de l'apoptose (69).....	72

Introduction et rappels :

Introduction générale sur la sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire correspond à un arrêt stable de la prolifération : les cellules sénescents sont arrêtées en permanence au stade G1 du cycle cellulaire en réponse au stress génotoxique. Les cellules sénescents présentent généralement les caractéristiques suivantes : elles ont une plus grande taille, parfois plus du double de celle de leurs homologues non sénescents ; elles expriment une β -galactosidase associée à la sénescence qui est le reflet de l'augmentation de la masse lysosomale ; majoritairement, elles expriment p16, un inhibiteur de la CDK4/6 (cyclin-dépendent kinase 4/6) et/ou p21 qui est aussi un inhibiteur de plusieurs CDK ; elles subissent une reprogrammation de leur phénotype sécrétoire, avec une sécrétion de cytokines inflammatoires et de protéases induisant un effet propagatoire et amplificateur autocrine et paracrine de la sénescence, ainsi qu'un effet protumoral sur les cellules cancéreuses éventuellement présentes dans l'environnement (1) (Figure 1).

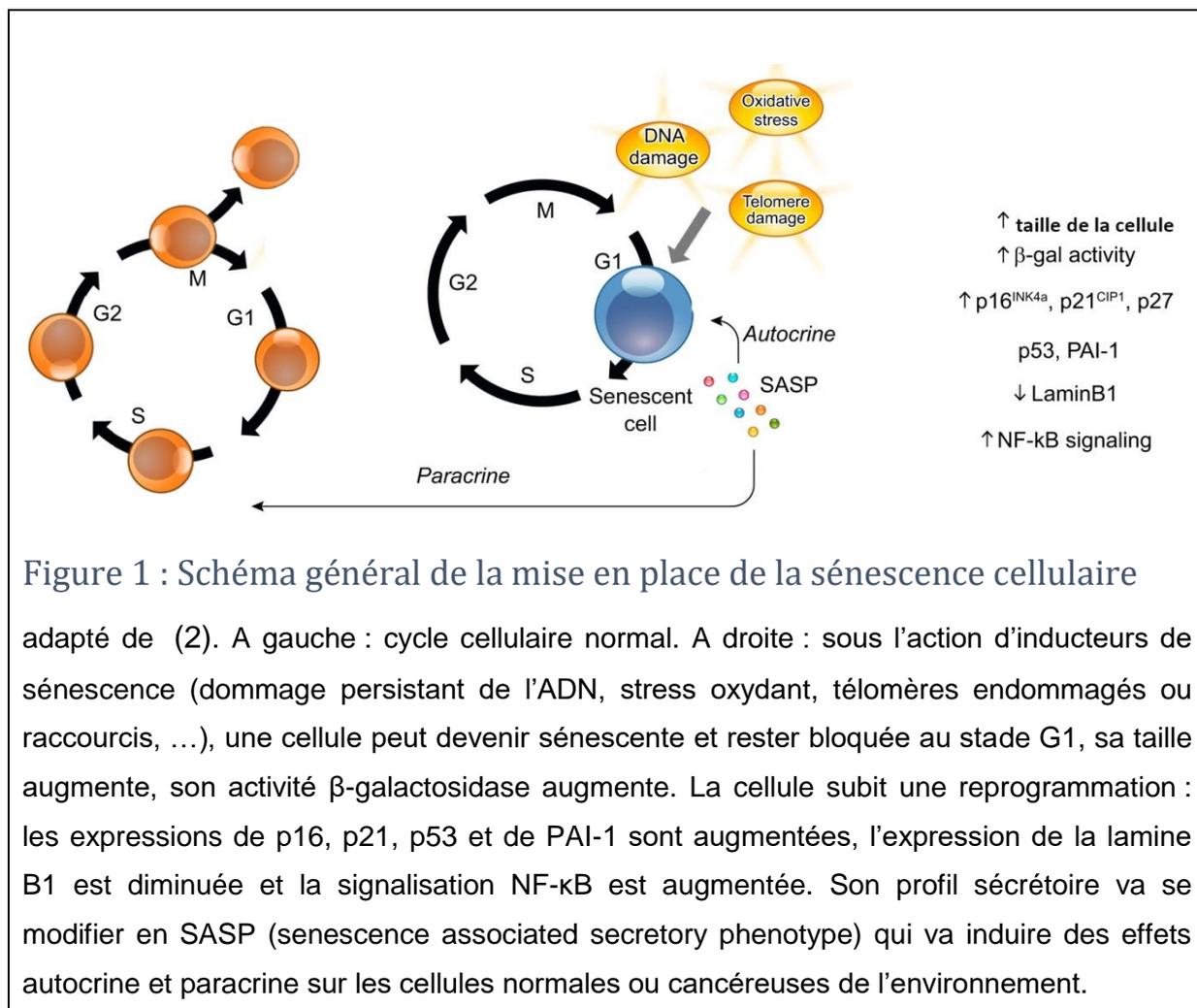


Figure 1 : Schéma général de la mise en place de la sénescence cellulaire

adapté de (2). A gauche : cycle cellulaire normal. A droite : sous l'action d'inducteurs de sénescence (dommage persistant de l'ADN, stress oxydant, télomères endommagés ou raccourcis, ...), une cellule peut devenir sénescente et rester bloquée au stade G1, sa taille augmente, son activité β -galactosidase augmente. La cellule subit une reprogrammation : les expressions de p16, p21, p53 et de PAI-1 sont augmentées, l'expression de la lamine B1 est diminuée et la signalisation NF- κ B est augmentée. Son profil sécrétoire va se modifier en SASP (senescence associated secretory phenotype) qui va induire des effets autocrine et paracrine sur les cellules normales ou cancéreuses de l'environnement.

Historiquement, la sénescence cellulaire a été découverte *in vitro* en 1961 par Léonard Hayflick (3). Il a, par la suite, été montré que la sénescence cellulaire intervenait comme processus physiologique et pathologique dans divers mécanismes. Si l'induction de la sénescence peut initialement avoir des effets bénéfiques en empêchant la transformation maligne et en limitant les dommages tissulaires, la présence à long terme de cellules sénescents dans les tissus peut favoriser les maladies liées au vieillissement et la formation de cancers (4).

L'élimination des cellules sénescents semble montrer des perspectives thérapeutiques prometteuses. Je présenterai quelques résultats en ce sens, *in vitro*, pré cliniques et cliniques.

Avant d'entrer dans le vif du sujet, je vais exposer deux rappels, le premier concerne les mécanismes de réparation de l'ADN, le second portera sur le cycle cellulaire. Je pourrai ainsi m'appuyer sur ces éléments lorsque j'aborderai le cœur du sujet.

Les mécanismes de réparation de l'ADN

La sénescence cellulaire s'établit le plus souvent suite à l'activation de certaines voies de signalisation des dommages à l'ADN. Je vais donc d'abord présenter succinctement différents mécanismes de réparation de l'ADN.

Prise en charge des cassures double brin ou DSB (double strand break) :

Lorsque l'ADN subit des cassures double brin ou DSB, ces dernières sont signalées par la voie DDR (DNA Damage Response), puis éventuellement réparées par cNHEJ (classical Non Homologous End Junction) et par HDR (Homology Directed Repair).

La voie DDR (DNA Damage Response)

La voie DDR correspond à une réponse cellulaire à une cassure double brin de l'ADN, des télomères raccourcis ou des fourches de réplication bloquées exposant des portions d'ADN simple brin.

Les ruptures du squelette sucre-phosphate de l'ADN qui peuvent conduire à l'exposition d'ADN simple brin et/ou à la génération de cassures double brin (DSB ou double strand break) de l'ADN sont des activateurs puissants de la voie DDR (5). Ce sont des événements dangereux car ils compromettent la stabilité structurelle des chromosomes. L'ADN simple brin et les cassures double brin sont détectés par des complexes spécialisés qui recrutent et activent deux protéines kinases, respectivement ATR (Ataxie Telangiectasie et reliée à Rad3) ou ATM (ataxie

télangiectasie mutée), au site de la lésion de l'ADN (Figure 2). Le recrutement de l'une ou l'autre de ces kinases au niveau de la lésion provoque la phosphorylation locale en cis de l'histone H2AX, qui est une étape clé dans la nucléation de la DDR. Au niveau des DSB, γ H2AX (la forme phosphorylée de H2AX) recrute des complexes ATM supplémentaires dans une boucle de rétroaction positive, augmentant ainsi l'activité ATM locale et alimentant par conséquent la propagation de γ H2AX le long de la chromatine. Le médiateur 1 du point de contrôle des dommages à l'ADN (MDC1) et la protéine 1 de liaison à p53 (53BP1) sont essentiels à l'établissement de cette boucle de rétroaction positive ; ce sont donc des médiateurs de la voie DDR qui facilitent le recrutement des complexes ATM par γ H2AX.

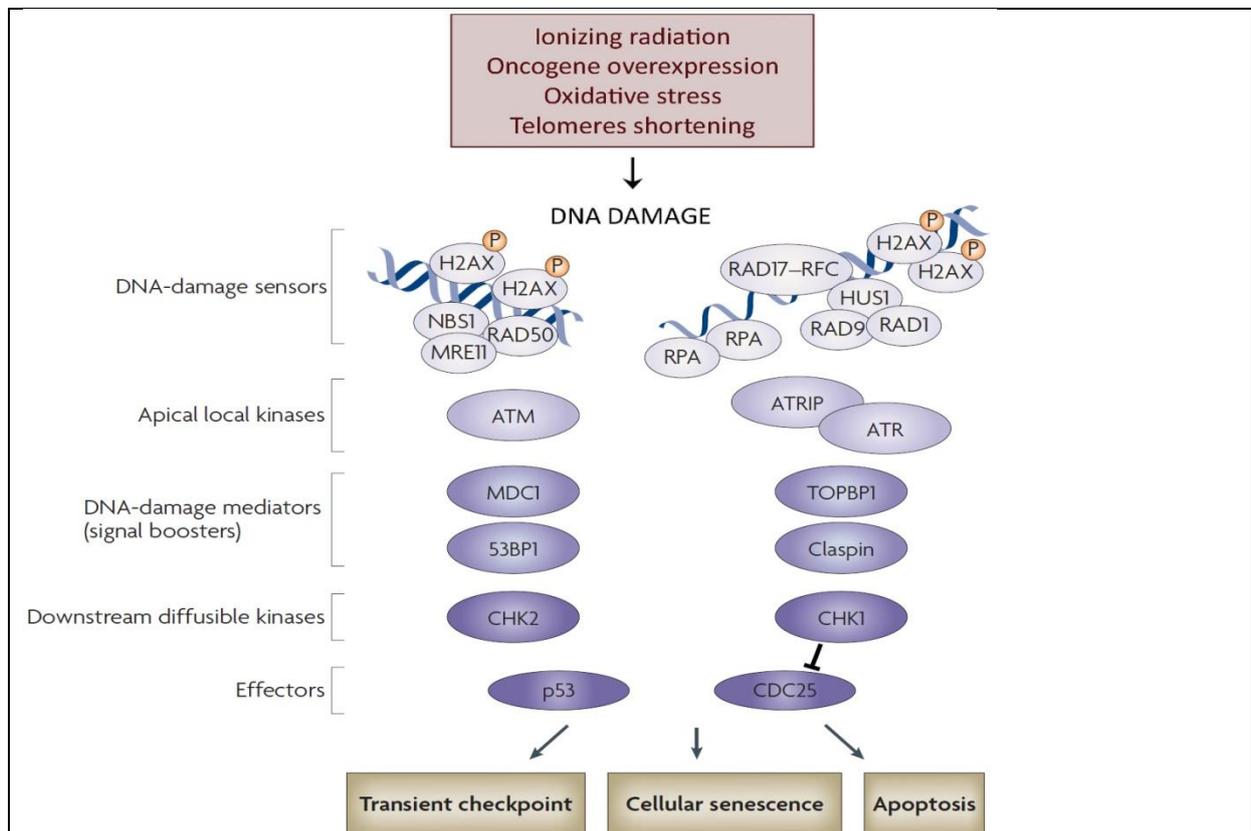


Figure 2: Branches ATM et ATR de la voie DDR (DNA Damage Response)

adapté de (5) et (6)

La voie DDR est activée de manière robuste par les DSBs et/ou l'exposition d'ADN monocaténaire recouvert de RPA.

Branche ATM (à gauche) : les DSB sont détectées par le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1) qui recrute la protéine kinase ATM. ATM subit une autophosphorylation et l'ATM ainsi activée phosphoryle le variant d'histone H2AX au niveau du site de la lésion de l'ADN. L'histone γ H2AX (H2AX phosphorylée) est reconnue par MDC1. Le recrutement de MDC1 sur γ H2AX alimente l'accumulation supplémentaire de MRN (à laquelle MDC1 se lie), ce qui conduit à une activité ATM locale amplifiée et à la propagation de γ H2AX le long de la chromatine à partir de la DSB. MDC1 recrute 53BP1.

Branche ATR (à droite) : une fois que l'ADN simple brin est revêtu de RPA, le recrutement du complexe hétérodimérique qui comprend ATR (un paralogue d'ATM) et sa sous-unité de liaison à l'ADN ATRIP est favorisé. Bien qu'une boucle de rétroaction définie n'ait pas été identifiée pour ATR, son activité est stimulée par des cibles ATR supplémentaires, telles que les complexes RAD9-HUS1-RAD1 (9-1-1) et RAD17-RFC. En outre, l'activité d'ATR est stimulée par TOPBP1, une cible de

phosphorylation d'ATR qui peut également activer ATR en l'absence d'ADN, et par la claspine, qui est nécessaire à la phosphorylation de CHK1.

Tous les facteurs DDR ne s'accumulent pas aux sites de dommages à l'ADN. On pense que la protéine kinase CHK2 se localise de manière transitoire aux sites de lésions de l'ADN, mais seulement pendant un temps suffisant pour être phosphorylée et activée par ATM, un événement qui dépend des médiateurs DDR que sont MDC1 et 53BP1. De même, bien qu'une fraction de CHK1 soit liée à la chromatine dans les cellules non endommagées, la phosphorylation de CHK1 dépendante d'ATR lui permet de diffuser librement dans le noyau. Par conséquent, CHK1 et CHK2 sont toutes deux responsables de la signalisation de la DDR dans des régions nucléaires éloignées du site d'endommagement de l'ADN. Enfin, p53 et les phosphatases CDC25 sont les éléments inférieurs de la cascade de signalisation de la DDR qui assurent l'interface entre cette voie et le cœur de la machinerie de progression du cycle cellulaire. 53BP1, protéine 1 se liant à p53 ; ATM, ataxie-télangiectasie mutée ; ATR, ataxie-télangiectasie et liée à Rad3 ; ATRIP, protéine interagissant avec ATR ; DDR, réponse aux lésions de l'ADN ; CDK, kinase cycline-dépendante ; CHK, Check Point Kinase ; DSB, cassure double-brin de l'ADN ; MDC1, médiateur du point de contrôle 1 des dommages à l'ADN ; MRE11, recombinaison méiotique 11 ; NBS1, syndrome de cassure de Nijmegen 1 ; RPA, protéine de réplication A ; RFC, facteur de réplication C ; TOPBP1, protéine 1 de liaison à l'ADN topoisomérase-II.

Lorsque c'est un ADN simple brin qui est exposé, la protéine de liaison à l'ADN simple brin, RPA (ou Replication Protein A) s'y lie, générant ainsi un signal pour le recrutement d'ATR. L'activité kinase d'ATR est en outre stimulée par le complexe hétérotrimérique dénommé 9-1-1 (composé de RAD9, RAD1 et HUS1) dont la structure est similaire à celle de l'antigène nucléaire de la cellule proliférant (PCNA ; un facteur accessoire de réplication de l'ADN)), et par la protéine 1 de liaison à la topoisomérase II (TOPBP1), un amplificateur de l'activité kinase d'ATR. Par conséquent, les DSB, comme celles générées par les rayonnements ionisants, activent principalement ATM, tandis que l'ADN simple brin enrobé de RPA qui se trouve à côté d'une transition d'ADN simple brin à double brin, comme celle générée lors d'une réplication perturbée de l'ADN, déclenche l'activité d'ATR. Cependant, la résection d'un brin d'ADN au niveau des DSB dans les cellules des phases S et G2

du cycle cellulaire fournit un substrat approprié pour l'activation d'ATR et donc une opportunité pour l'engagement des deux kinases au niveau de la même lésion.

Une augmentation de l'activité locale d'ATM et d'ATR au-delà d'un certain seuil est nécessaire pour engager les facteurs de DDR qui fonctionnent loin du site des lésions de l'ADN. Lorsque les lésions de l'ADN entraînent le dépassement de ce seuil, la kinase de point de contrôle CHK2 est activée par la phosphorylation d'ATM ; CHK2 diffuse ensuite librement dans le nucléoplasme, propageant la signalisation DDR en phosphorylant ses substrats dans tout l'espace nucléaire. De même, une fois que CHK1 est activée par phosphorylation, principalement par ATR mais aussi par ATM, elle n'est pas retenue au niveau des lésions de l'ADN et diffuse dans tout le noyau. En fin de compte, l'exécution du point de contrôle résulte de multiples voies de signalisation, souvent redondantes, qui convergent vers des facteurs de décision clés, tels que p53 et les phosphatases 25 du cycle de division cellulaire (CDC25). L'inactivation des CDC25 induite par un dommage à l'ADN provoque un arrêt rapide du cycle cellulaire, car ces phosphatases sont essentielles à la prolifération ; elles provoquent l'inactivation des CDK par le biais de la DDR, soit par dégradation protéolytique, soit par exclusion du noyau. En revanche, l'induction plus lente de p53 à la suite de sa phosphorylation par les kinases DDR entraîne sa stabilisation et le renforcement de sa capacité à induire la transcription de p21, un inhibiteur de CDK (cyclin dépendant kinase), ce qui entraîne un arrêt stable du cycle cellulaire.

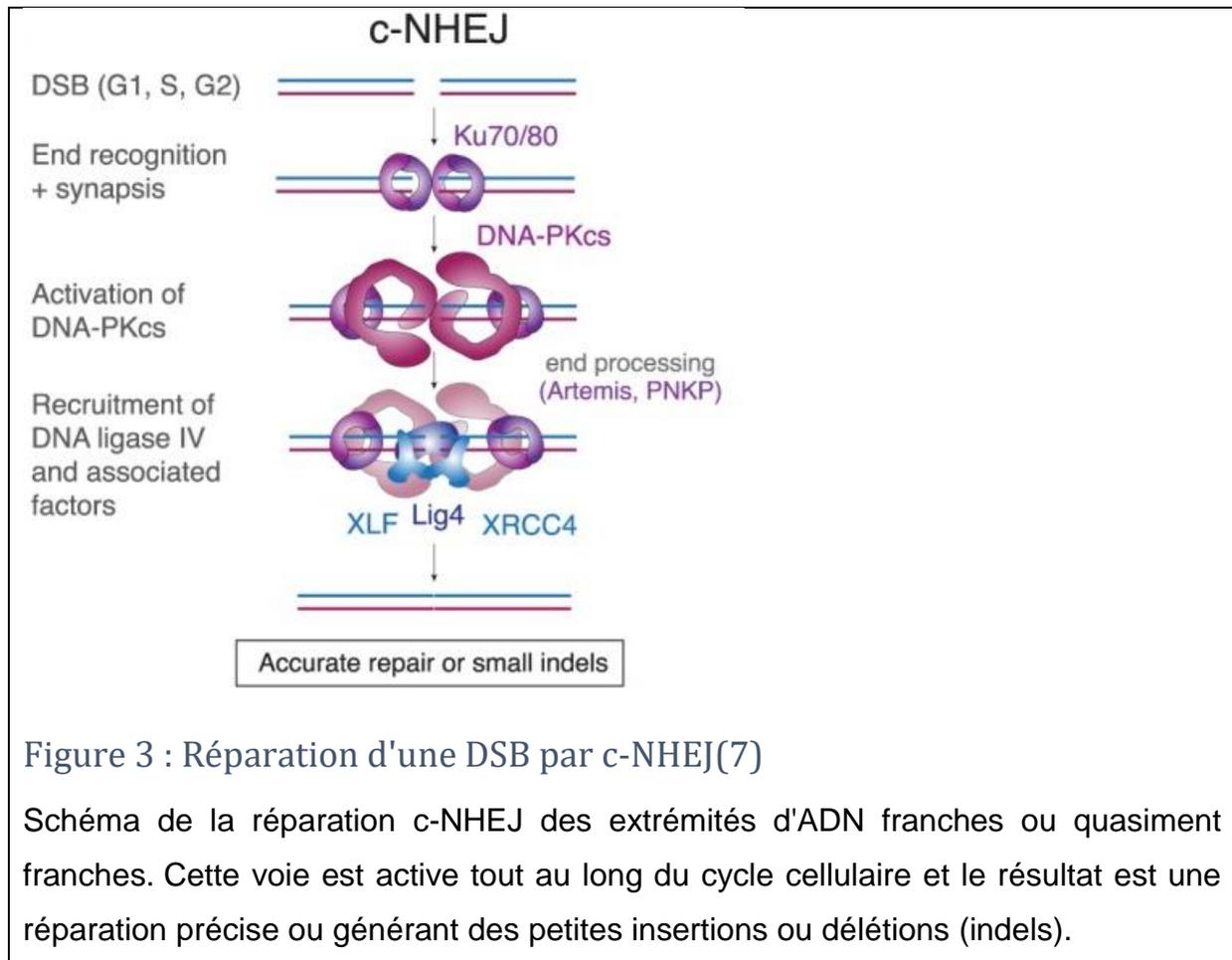
γ H2AX s'étend sur des centaines de kilobases à partir du site d'endommagement de l'ADN, ce qui génère un " velcro " moléculaire qui attire et retient un grand nombre de facteurs DDR et entraîne la formation de foyers nucléaires cytologiquement détectables qui contiennent des copies multiples de la même protéine. Les dimensions des foyers de DDR varient de 0,6 à 1,6 μ m, et leur taille augmente avec le temps. Comme la juxtaposition de plusieurs DSB dans un foyer partagé peut provoquer des réactions de ligature d'ADN erronées et des fusions chromosomiques conséquentes, il semblerait judicieux de séparer les DSB multiples plutôt que de les réunir. Les foyers de DDR représentent des lésions uniques de l'ADN où de fortes concentrations de facteurs sont atteintes, probablement pour favoriser les interactions protéine-protéine et les réactions enzymatiques et établir des boucles de rétroaction. En effet, il a été récemment démontré que la juxtaposition de capteurs DDR suffit à elle seule à déclencher l'arrêt du cycle cellulaire malgré l'absence de lésions physiques de l'ADN.

Une fois la lésion de l'ADN réparée, les foyers de DDR sont désassemblés. Par conséquent, les lésions rapidement réparées devraient conduire à des foyers transitoires et relativement petits, tandis que les cassures d'ADN plus difficiles à réparer et plus persistantes stimuleront une signalisation DDR plus prolongée et une propagation accrue de γ H2AX et produiront par conséquent des foyers visiblement plus grands. La mise en œuvre du point de contrôle est une conséquence directe des événements de signalisation qui se produisent dans les foyers de DDR. Ceci est particulièrement pertinent pour l'étude des mécanismes qui conduisent à l'établissement et au maintien de la sénescence cellulaire, car il semble que la sénescence soit associée à de grands foyers DDR et à une signalisation DDR prolongée (5).

L'arrêt induit par la DDR peut être transitoire, et si les dommages à l'ADN sont efficacement éliminés, les cellules reprennent une prolifération normale. Cependant, si les dommages à l'ADN sont particulièrement graves, les cellules peuvent subir une apoptose ou entrer dans un arrêt prolongé du cycle cellulaire induit par la DDR, appelé sénescence cellulaire.

Réparation des cassures double brin ou DSB (double strand break) par la c-NHEJ (classical Non Homologous End Junction)

La c-NHEJ ligature les extrémités franches de l'ADN ou les DSB avec de courts surplombs (c'est-à-dire lorsque les deux brins de l'ADN ne sont pas cassés exactement au niveau de la même base) (7) (Figure 3). Cette voie est initiée par la liaison aux extrémités de l'ADN de l'hétérodimère Ku70/80 en forme d'anneau (7). La ligature des extrémités nécessite l'ADN Ligase IV (Lig4) et ses facteurs associés (par exemple, XRCC4 et XLF). Ce processus nécessite la sous-unité catalytique de l'ADN protéine kinase ou DNA-PKcs et, dans certains contextes, est favorisé par les nucléases (par exemple, Artemis) et la polynucléotide kinase 3' phosphatase (PNKP). c-NHEJ est rapide, efficace et très précis lorsque les extrémités de l'ADN sont "propres" (ont des extrémités compatibles ou franches non bloquées par des protéines attachées). Bien que la c-NHEJ soit active pendant l'interphase du cycle, elle peut être inhibée en phase S/G2.



Réparation des cassures double brin ou DSB (double strand break) par la HDR (Homology Directed Repair)

Contrairement à la c-NHEJ, la réparation des DSB par la voie HDR nécessite la présence d'un surplomb en 3', c'est-à-dire que la fin du double brin se termine avec une portion simple brin en 3' (7) (Figure 4). La fixation de la recombinaise Rad51 sur le surplomb 3' permet d'initier la voie HDR. La HDR précise utilise la chromatide sœur comme modèle. Cette étape critique vers la HDR de formation du surplomb 3' nécessiterait BRCA1. Le complexe MRN (MRE11, RAD50 et NBS1) va se lier au niveau de la DSB, en association avec CtIP : MRN/CtIP possède à la fois une activité endonucléolytique et exonucléolytique 3' permettant la formation d'un oligonucléotide court qui peut être dégradé à partir de son extrémité 3'. Ce processus crée un court surplomb 3' qui va subir une plus longue résection de l'extrémité 5' soit par l'exonucléase EXO1 soit par l'endonucléase DNA2 agissant sur l'ADNsb formé par l'activité hélicase de BLM ou de WRN. La fixation de Rad51 médiée par BRCA2 sur l'ADNsb va entraîner la recherche d'une homologie. L'invasion de brins qui en résulte génère le substrat pour la néo-synthèse d'ADN, qui allonge le surplomb 3' par

homologie. La capture et la ligature de l'autre extrémité de l'ADN génèrent une double jonction de Holliday (dHJ). Cette double jonction de Holliday peut être dissoute par le complexe BTR (BLM – TOP3A – RMI) pour séparer les chromatides sœurs sans croisement. Cette double jonction de Holliday peut aussi être résolue plus tard dans le cycle cellulaire par des résolvases HJ telles que le complexe SLX4/SLX1/Mus81/EME1 et GEN1, produisant des chromatides sœurs séparées avec ou sans chevauchement. Si la deuxième extrémité n'est pas capturée, le surplomb étendu peut s'anneler aux séquences à la deuxième extrémité (après résection) dans un processus appelé hybridation de brin dépendant de la synthèse ou SDSA (Synthesis-Dependent Strand Annealing). La SDSA conduit à une réparation précise des DSB sans chevauchement. La voie HDR est active durant les phases S/G2.

Nous verrons plus loin que, lorsque la voie DDR est activée de façon persistante et que la réparation (par c-NHEJ ou HDR) n'est pas possible, p53 pourra induire la sénescence (8).

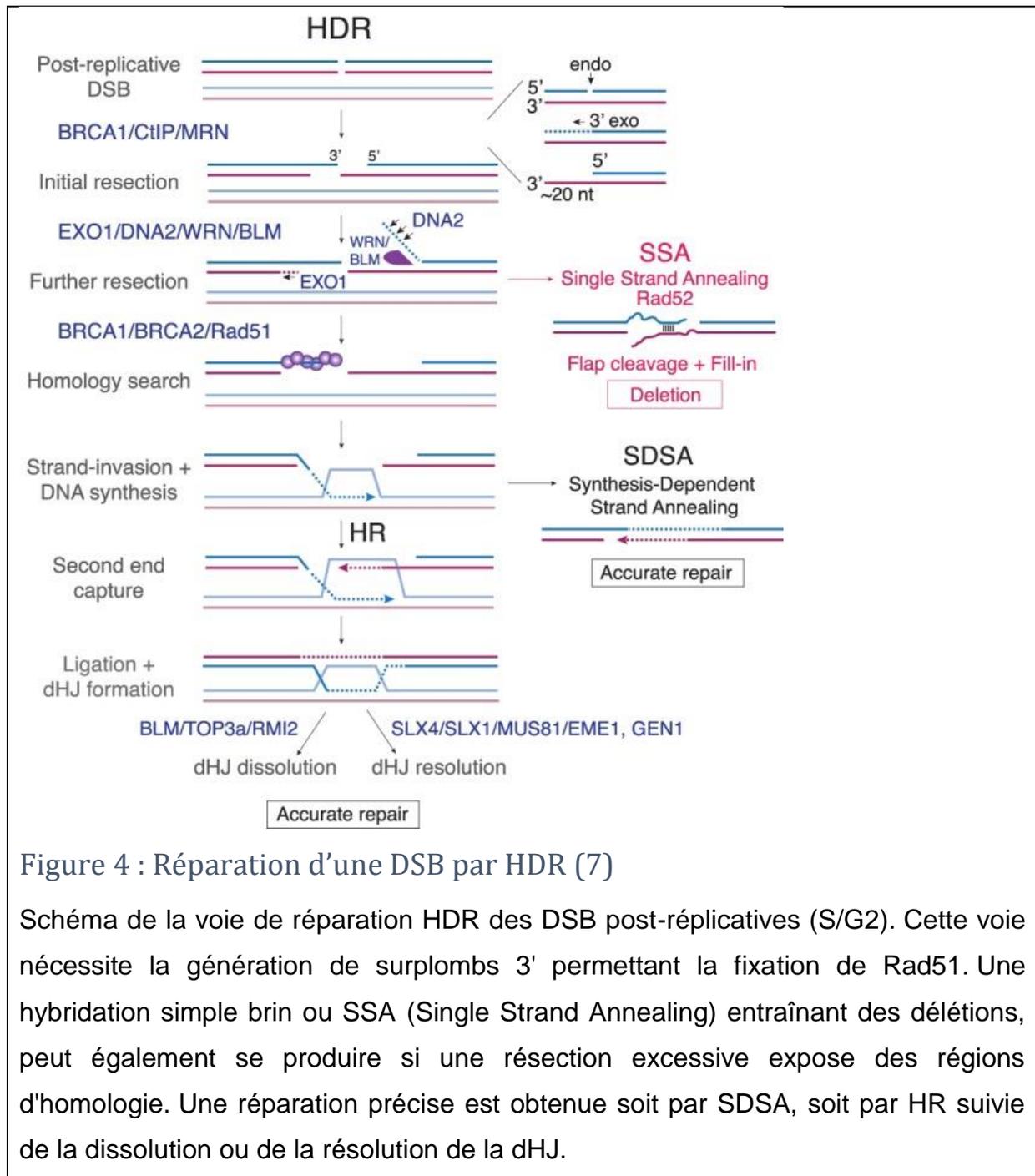


Figure 4 : Réparation d'une DSB par HDR (7)

Schéma de la voie de réparation HDR des DSB post-répliquatives (S/G2). Cette voie nécessite la génération de surplombs 3' permettant la fixation de Rad51. Une hybridation simple brin ou SSA (Single Strand Annealing) entraînant des délétions, peut également se produire si une résection excessive expose des régions d'homologie. Une réparation précise est obtenue soit par SDSA, soit par HR suivie de la dissolution ou de la résolution de la dHJ.

Le système de réparation des cassures simple brin ou SSBR (Single Strand Break Repair) :

Les sources de cassures simple brin (SSB)

Les cassures simple brin (SSB) de l'ADN sont des lésions de l'ADN qui apparaissent très fréquemment dans les cellules, de l'ordre de dizaines à centaines de milliers par cellule et par jour. Cela équivaut à une SSB dans chaque cellule toutes les 1 à 10 s, une fréquence qui, si elle n'est pas compensée par leur réparation rapide, entraînerait une accumulation de SSB et la perturbation de processus critiques tels que la transcription des gènes et la réplication de l'ADN. L'accumulation ou la persistance excessive de SSB peut par ailleurs conduire à l'hyperactivation du capteur de SSB PARP1 amenant à une déplétion excessive de NAD⁺, à la poly(ADP-ribosylation) et à un dysfonctionnement neurologique (9).

Les SSB peuvent apparaître directement, par décomposition/désintégration du squelette sucre-phosphate, ou indirectement comme intermédiaires de réaction ou produits de processus spécifiques de réparation de l'ADN ou de métabolisme de l'ADN. La principale source directe de SSB passe par la formation de désoxyribose oxydé induite par les espèces réactives de l'oxygène. La formation d'une cassure simple brin (SSB) peut aussi provenir du processus BER (Base excision Repair), comme décrit ci-dessous, après le clivage du site abasique par l'endonucléase apurinique/apyrimidinique (APE1) ; la voie BER, dans ce cas, peut être la conséquence d'un site spontanément abasique ou d'une base endommagée. A noter que la voie BER peut aussi être utilisée pour réguler l'état épigénétique de la chromatine en remplaçant la 5-méthylcytosine (5mC) par la cytosine.

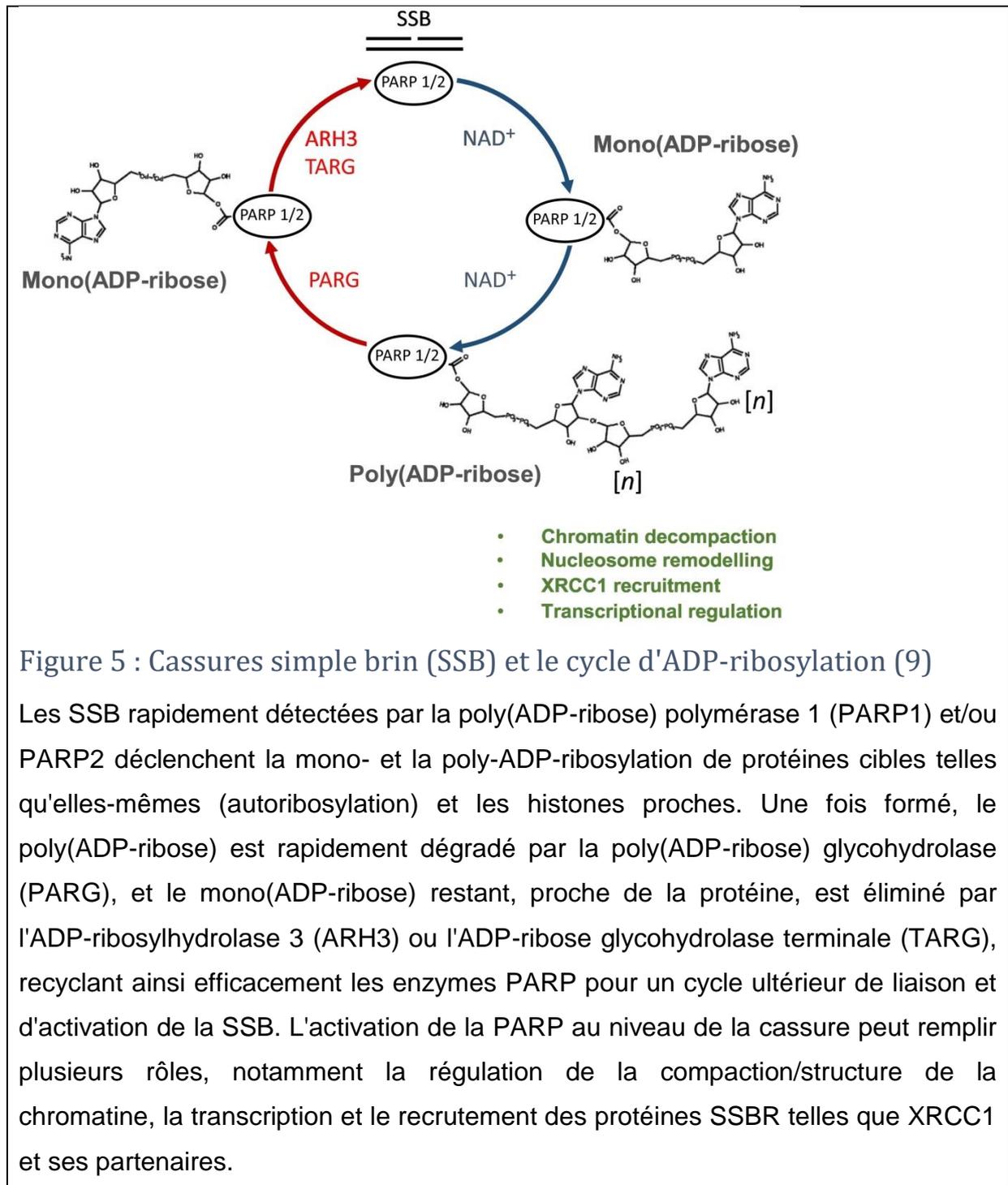
Il est intéressant de noter que d'autres types de réparation par excision de l'ADN induisent également des SSB indirectement, comme par exemple la voie NER (décrite ci-dessous) ou la voie MMR (décrite ci-dessous). Ces voies sont indépendantes de la voie SSBR mais il est possible que les SSB puissent occasionnellement " s'échapper " et nécessiter une détection et une réparation par le mécanisme SSBR. Par exemple, il a été montré que les fragments intermédiaires d'Okazaki, lors de la réplication de l'ADN, s'ils ne sont pas rapidement traités et ligaturés par la machinerie de réplication de l'ADN, peuvent être détectés par la SSBR dépendante de PARP1 (10).

Enfin, une autre source de SSB est l'activité des ADN topoisomérases, si celle-ci est interrompue avant son terme ; les ADN topoisomérases sont une classe d'enzymes qui créent des cassures de l'ADN lors de la suppression de la contrainte de torsion

et/ou des contraintes topologiques pendant la réplication de l'ADN et la transcription des gènes. Les cassures d'ADN induites par les topoisomérases sont donc plus fréquentes pendant la phase S et dans les régions du génome actives sur le plan de la transcription. Ces cassures sont normalement ligaturées par la topoisomérase à la fin de son action mais cette action peut s'interrompre prématurément par collision avec des ARN polymérases ou des ADN polymérases et/ou par la proximité d'autres lésions de l'ADN. La topoisomérase de type I (TOP1) est la principale source de ces SSB, car son mécanisme d'action passe par la création d'une SSB. Cependant, la topoisomérase de type II peut également induire des SSB, car cette enzyme fonctionne comme un homodimère dans lequel chaque monomère va induire une SSB sur un des deux brins d'ADN. L'activité de ces deux sous-unités est étroitement coordonnée, créant ainsi une cassure double-brin (DSB) transitoire mais l'inhibition partielle ou la défaillance d'une seule sous-unité de l'homodimère topoisomérase II peut entraîner une SSB.

Détection des SSB

Les SSB sont rapidement détectées dans les cellules par les enzymes PARP, qui sont à leur tour activées de manière catalytique (Figure 5). Une fois activées, les enzymes PARP transfèrent les sous-unités d'ADP-ribose à elles-mêmes et/ou à d'autres protéines, consommant le cofacteur NAD⁺ au cours du processus. Les PARP1 et PARP2 synthétisent principalement le poly(ADP-ribose), qui comprend des chaînes linéaires et ramifiées d'ADP-ribose comptant jusqu'à plusieurs centaines d'unités d'ADP-ribose. Après leur synthèse, les polymères d'ADP-ribose sont rapidement dégradés par la poly(ADP-ribose) glycohydrolase, et les unités mono(ADP-ribose) résiduelles sont retirées des protéines par l'une des nombreuses mono(ADP-ribose) hydrolases. L'ADP-ribosylation des protéines est donc un mécanisme de signalisation extrêmement rapide, polyvalent et dynamique qui remplit un certain nombre de fonctions au niveau des SSB décrites ci-après.



Les SSB et le remodelage de la chromatine

Un rôle important de l'activité de PARP dans les SSB semble être la décondensation de la chromatine : l'activation de PARP est associée à la décompaction de la chromatine, directement via l'impact de la poly(ADP-ribosylation) sur le repliement de la chromatine et l'assemblage/la stabilité des nucléosomes et/ou indirectement via le recrutement de remodeleurs de chromatine. Le relâchement de la chromatine et/ou

la perturbation des nucléosomes pendant la SSBR peuvent permettre un accès et une réparation plus rapides des cassures de l'ADN.

L'activité PARP et le recrutement de XRCC1 (X-ray repair cross complementing 1)

Un autre rôle clé de l'activité PARP est le recrutement du complexe protéique XRCC1 (X-ray repair cross complementing 1) qui contient la plupart, sinon la totalité, des enzymes nécessaires à la SSBR. Le recrutement de XRCC1 par PARP est particulièrement important dans les SSB directes parce que ces cassures surviennent de manière inattendue et stochastique dans le génome et nécessitent un mécanisme efficace pour leur détection et leur réparation rapides. Le recrutement du complexe protéique XRCC1 est réalisé par l'interaction directe avec le poly(ADP-ribose). Il a aussi été montré que l'activité de PARP était requise lors de la réparation des SSB indirectes survenant comme intermédiaires de BER (Base excision Repair, décrite ci-dessous) mais, en comparaison avec les SSB directes, le recrutement de XRCC1 dans la voie BER, est moins évident ; en effet, dans la voie BER, les SSB sont des intermédiaires prévus, créés par l'activité de l'APE1, qui peuvent être transmises directement à POL β pour être comblées, puis transmis par POL β à l'hétérodimère XRCC1/LIG3 pour la ligature de l'ADN. Ce relais coordonné des intermédiaires SSB d'une enzyme à l'autre au cours de la voie BER, qui a été comparé au " passage du témoin " dans une course de relais, constitue un modèle attrayant permettant d'empêcher les SSB « planifiées » d'être attaquées ou engagées de manière excessive par des enzymes potentiellement dangereuses, y compris par PARP1 elle-même.

Le complexe protéique XRCC1 et la voie SSBR

XRCC1 est une protéine structurante (scaffold) qui interagit directement avec la plupart des composants nécessaires à la réparation des SSB, notamment les protéines de traitement des extrémités de l'ADN que sont PNKP, APTX (aprataxin), POL β et LIG3 (Figure 6). Le complexe protéique XRCC1 fournit donc un mécanisme rapide et efficace pour la réparation de la plupart, voire de toutes les SSB survenant dans une cellule, avec la présence fréquente d'une redondance enzymatique dans ce processus. L'impact de XRCC1 est indiqué par les taux fortement réduits de SSBR observés dans les cellules si cette protéine est absente. Au niveau de l'organisme, XRCC1 est nécessaire à la viabilité embryonnaire, et si elle est mutée chez l'homme, elle est associée à l'ataxie cérébelleuse, une maladie neurologique héréditaire.

La réparation des SSB directes

Au niveau des SSB directes résultant de l'attaque oxydative et de la désintégration du squelette sucre-phosphate, les interactions les plus importantes de XRCC1 sont celles avec le poly(ADP-ribose) décrites précédemment et avec la PNKP (Figure 6, à nouveau). XRCC1 est recruté sur les SSB directes par son interaction avec le poly(ADP-ribose) puis XRCC1 va recruter la PNKP et stimuler son activité, favorisant l'élimination des résidus 3'-P qui sont présents dans ~50-70% des cassures directes. Lorsque la terminaison 3' de la SSB est une 3'-phosphoglycolate (3'-PG), cette terminaison sera transformée en 3'-OH par l'endonucléase apurinique/apyrimidique APE1 ou éventuellement par APE2.

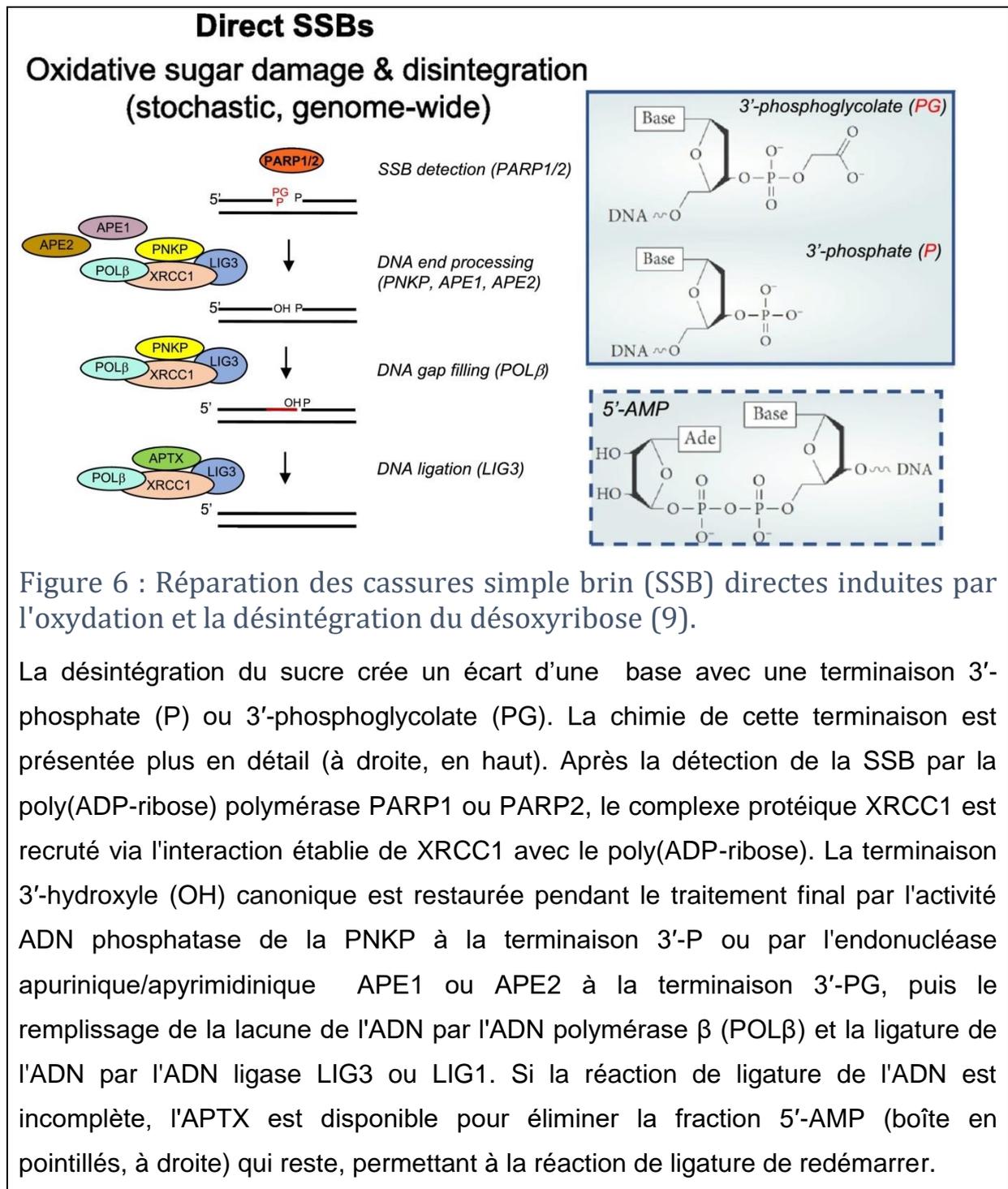


Figure 6 : Réparation des cassures simple brin (SSB) directes induites par l'oxydation et la désintégration du désoxyribose (9).

La désintégration du sucre crée un écart d'une base avec une terminaison 3'-phosphate (P) ou 3'-phosphoglycolate (PG). La chimie de cette terminaison est présentée plus en détail (à droite, en haut). Après la détection de la SSB par la poly(ADP-ribose) polymérase PARP1 ou PARP2, le complexe protéique XRCC1 est recruté via l'interaction établie de XRCC1 avec le poly(ADP-ribose). La terminaison 3'-hydroxyle (OH) canonique est restaurée pendant le traitement final par l'activité ADN phosphatase de la PNKP à la terminaison 3'-P ou par l'endonucléase apurinique/apyrimidinique APE1 ou APE2 à la terminaison 3'-PG, puis le remplissage de la lacune de l'ADN par l'ADN polymérase β (POLβ) et la ligature de l'ADN par l'ADN ligase LIG3 ou LIG1. Si la réaction de ligature de l'ADN est incomplète, l'APTX est disponible pour éliminer la fraction 5'-AMP (boîte en pointillés, à droite) qui reste, permettant à la réaction de ligature de redémarrer.

La réparation des SSB induites par la topoisomérase de type I

Le recrutement de la PNKP par XRCC1 est également important pour la réparation des SSB induites lors de l'interruption inopinée de l'activité abortive de la topoisomérase de type I (TOP1) (Figure 7), qui crée des SSB portant des terminaisons 5'-hydroxyle (5'-OH) et des terminaisons 3'-P qui sont liées à la topoisomérase par une liaison 3'-phosphotyrosyle. La TOP1 est d'abord dégradée

par des mécanismes dépendants et/ou indépendants du protéasome, et le peptide résiduel de TOP1 est ensuite éliminé par TDP1 (tyrosyl DNA phosphodiesterase-1) ou éventuellement APE2. TDP1 interagit également avec le complexe protéique XRCC1, via une interaction directe avec LIG3, et suite à l'élimination de TOP1 laisse des terminaisons 3'-P et 5'-OH qui peuvent être traitées par PNKP. Puis, comme pour les SSB directes, il y a ligature par LIG3 ou LIG1 avec éventuellement l'intervention d'APTX.

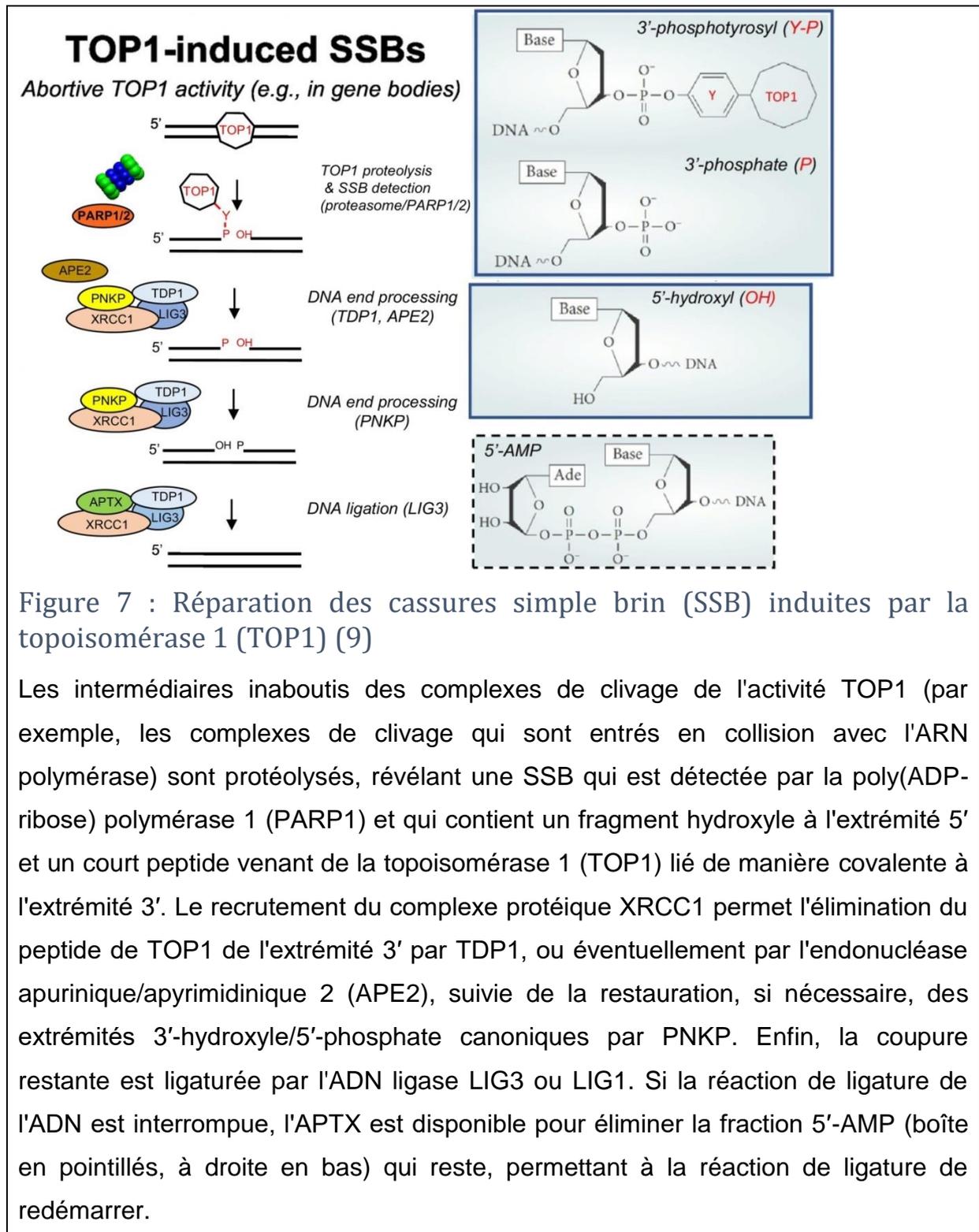


Figure 7 : Réparation des cassures simple brin (SSB) induites par la topoisomérase 1 (TOP1) (9)

Les intermédiaires inaboutis des complexes de clivage de l'activité TOP1 (par exemple, les complexes de clivage qui sont entrés en collision avec l'ARN polymérase) sont protéolysés, révélant une SSB qui est détectée par la poly(ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1) et qui contient un fragment hydroxyle à l'extrémité 5' et un court peptide venant de la topoisomérase 1 (TOP1) lié de manière covalente à l'extrémité 3'. Le recrutement du complexe protéique XRCC1 permet l'élimination du peptide de TOP1 de l'extrémité 3' par TDP1, ou éventuellement par l'endonucléase apurinique/apyrimidinique 2 (APE2), suivie de la restauration, si nécessaire, des extrémités 3'-hydroxyle/5'-phosphate canoniques par PNKP. Enfin, la coupure restante est ligaturée par l'ADN ligase LIG3 ou LIG1. Si la réaction de ligature de l'ADN est interrompue, l'APT-X est disponible pour éliminer la fraction 5'-AMP (boîte en pointillés, à droite en bas) qui reste, permettant à la réaction de ligature de redémarrer.

Les SSB dans le cadre de la voie BER (Base Excision Repair)

Les SSB sont générées indirectement pendant la voie BER en tant qu'intermédiaires obligatoires de l'excision des nucléobases modifiées, endommagées ou manquantes (Figure 8). Les bases endommagées sont éliminées par l'une des 11 ADN

glycosylases différentes ; la découverte de ces glycosylases a notamment été récompensée par le Prix Nobel de Chimie 2015 attribué pour partie à Tomas Lindahl (11). Intervient ensuite, le plus souvent, le clivage du site abasique par l'APE1. Il y aura ensuite recrutement de la protéine XRCC1. XRCC1 a plusieurs rôles dans la voie BER, notamment elle stabilise POL β et LIG3. Ces interactions collectives de POL β et LIG3 avec XRCC1 sont essentielles pour protéger BER d'une interférence excessive de PARP1, très probablement en facilitant le transfert moléculaire des intermédiaires SSB d'une enzyme à l'autre ; dans la voie BER, ce rôle d'inhibition de PARP est bien établi.

BER-induced SSBs

- Stochastic base damage or loss (genome-wide)
- 'Programmed' demethylation of 5-methylcytosine (e.g., gene enhancers)

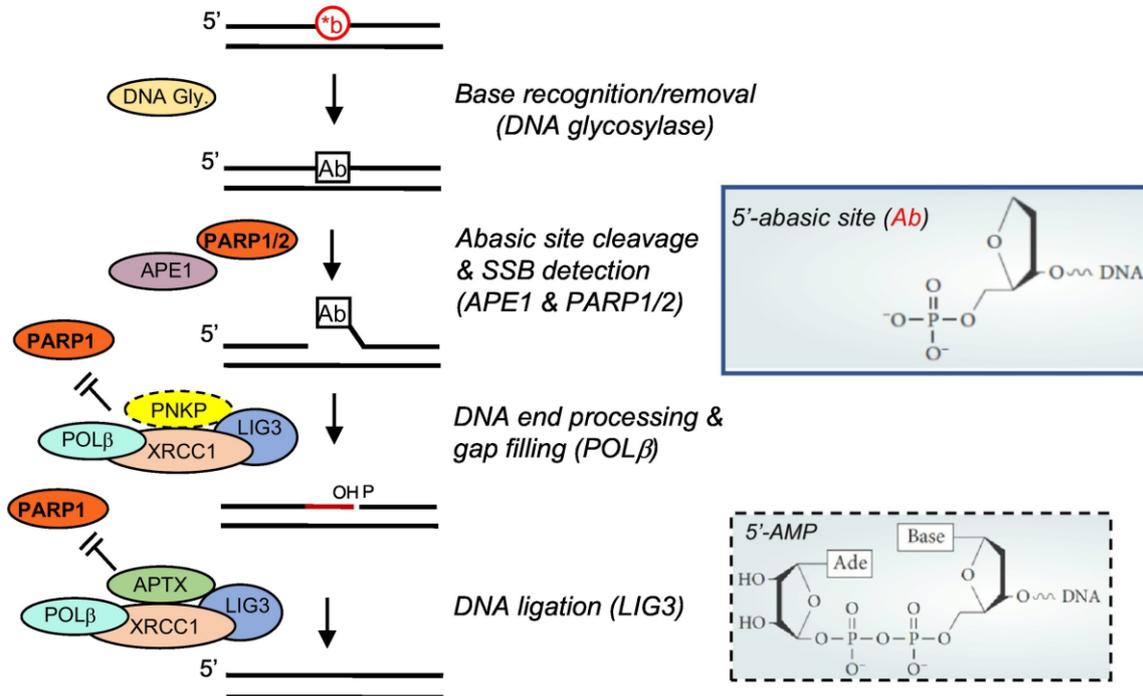


Figure 8 : Réparation des cassures simple brin (SSB) indirectes survenant lors de la réparation par excision des bases de l'ADN (BER) (9)

Les bases endommagées (par exemple, oxydées, alkylées, désaminées) ou les bases modifiées (par exemple, suite à un marquage épigénétique) sont éliminées par une ADN glycosylase et le site abasique (Ab) restant est clivé par l'endonucléase apurinique/apyrimidinique (APE1), laissant un vide de dimension une base avec un désoxyribose 5'-terminal. Le sucre abasique 5'-terminal (boîte, à droite, en haut) est éliminé par l'activité AP lyase de l'ADN polymérase β (POL β) (traitement terminal), qui insère également le nucléotide manquant (remplissage de l'espace). Enfin, la cassure est ligaturée par l'ADN ligase LIG3 ou LIG1. Si la réaction de ligature de l'ADN ne va pas à son terme, l'APT β est disponible pour éliminer la fraction 5'-AMP qui reste (boîte en pointillés, à droite en bas), permettant à la réaction de ligature de redémarrer. Le rôle de la poly(ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1)/PARP2 dans la voie BER n'est pas clair, mais il pourrait s'agir de réengager la machinerie BER au niveau des SSB qui ont été découplées de la voie et/ou de faciliter le remodelage des nucléosomes. Il est à noter que le rôle essentiel de XRCC1 au cours de BER est d'empêcher un engagement excessif/cytotoxique de PARP1 avec les intermédiaires SSB, très probablement en assurant le traitement rapide et coordonné des SSB par APE1 puis POL β et enfin LIG3 au cours de la réaction.

Réparation de grande taille (« long patch ») des SSB

Les mécanismes de réparation des SSB, tels qu'ils ont été décrits précédemment, sont des réparations de petite taille (" short-patch ") dans lesquelles seul le nucléotide unique endommagé ou manquant au site du SSB est remplacé. Cependant, les SSB peuvent être réparées par des mécanismes "long patch" dans lesquels de multiples nucléotides non endommagés en aval et/ou en amont du SSB sont également remplacés (Figure 9). Notamment au cours de la voie BER, la réparation de grande taille est censée se produire si POL β est incapable d'éliminer le sucre abasique de l'extrémité 5', avant la ligature de l'ADN, par exemple si le désoxyribose est oxydé. Cependant, la réparation par patch long peut ne pas être limitée aux situations dans lesquelles la réparation par patch court n'est pas possible, et constitue une voie alternative/de secours pour la plupart, voire la totalité, des SSB.

Le concept de SSBR à patch long a été étendu ces dernières années pour impliquer non seulement le comblement des lacunes en aval (3') de la SSB, mais aussi en amont (5') (Figure 9, gauche). De manière intrigante, des expériences biochimiques utilisant un extrait d'œuf de *Xenopus* ont révélé que la résection de l'extrémité 3' et la formation d'une brèche simple brin par APE1/APE2 déclenchent l'activation de la machinerie du point de contrôle dépendant d'ATR, qui à son tour favorise la SSBR par un mécanisme encore inconnu. Il n'est pas clair dans quelle mesure cela se produit dans les cellules humaines, ou si cette observation est liée à l'idée que le complexe 9-1-1, qui est un régulateur de l'ATR, peut coordonner et stimuler le processus de BER long patch.

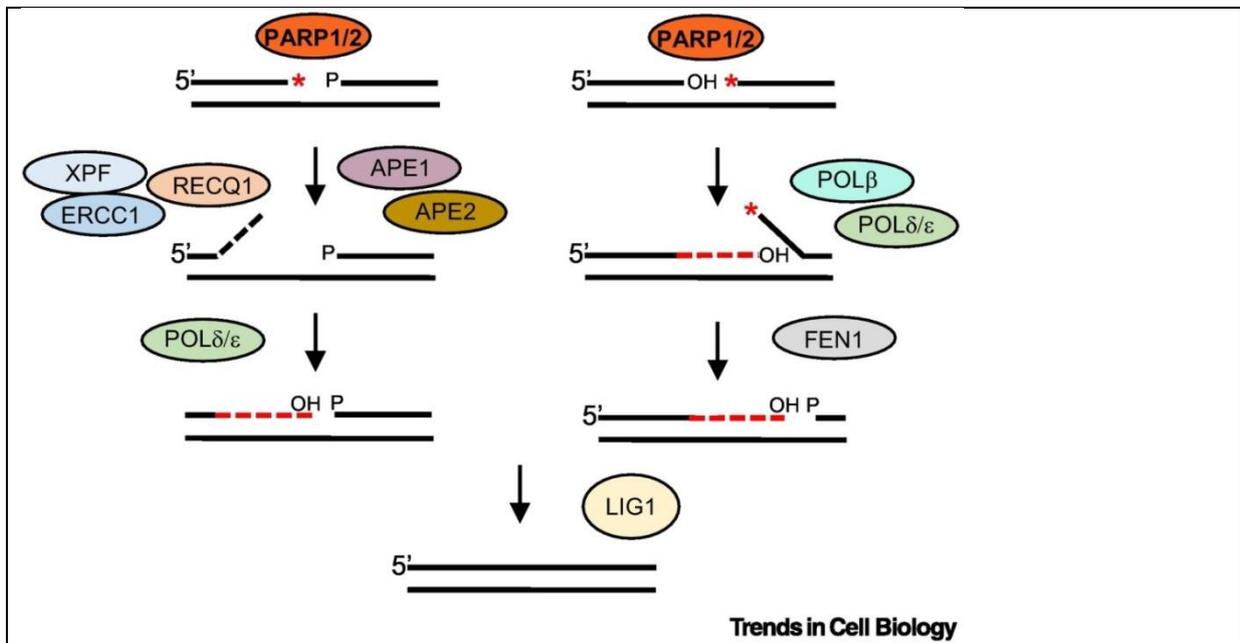


Figure 9 : Réparation de grande taille ("long patch") des cassures simple brin (SSB) (9).

Si la réparation canonique par patch court est indisponible/insuffisante, les SSB peuvent être réparés par une réparation par patch long, dans laquelle deux à 30 nucléotides sont remplacés pendant la réaction de réparation. Dans ces exemples, le comblement étendu des lacunes par POLβ (ou POLδ/ε) déplace l'extrémité 5' pour créer un rabat qui est excisé par FEN1, laissant une cassure résiduelle qui est ligaturée par l'ADN ligase 1 (LIG1) (schéma de droite). Il est à noter que la réparation de grande taille (« long patch ») peut également être employée pour étendre le comblement des lacunes en amont (5') de la SSB (schéma de gauche). On ne sait pas exactement quand et dans quelle mesure cette dernière voie opère dans les cellules humaines, mais si/quand elle opère, cette voie peut employer RECQ1 ou l'endonucléase apurinique/apyrimidinique 1 (APE1)/APE2 pour dérouler ou réséquer l'extrémité 3', respectivement, suivi par la nucléase ERCC1/XPF pour enlever le rabat 3' dans le cas du déroulement médié par RECQ1, suivi par le remplissage de l'espace par POLδ/ε. Enfin, la ligature est probablement effectuée par LIG1. Il est à noter que cette voie peut également impliquer l'enrobage par la protéine de réplication A (RPA) de l'espace simple brin étendu, la signalisation des dommages à l'ADN dépendante de l'ATR, ainsi que le remplissage des espaces et la ligature médiés par l'antigène nucléaire des cellules proliférantes (PCNA) ou me clamp 9-1-1, des acteurs déjà évoqués ci-dessus dans la voie DDR .

Lorsque le mécanisme de réparation SSBR est inefficace ou débordé, la présence de ces SSB non réparées va augmenter l'expression du CKI p16, ce qui va induire la sénescence (12); l'induction de la sénescence par p16 sera exposé plus en détail ci-après.

La voie NER (Nucléotide Excision Repair) :

Très sommairement car peu en rapport avec la sénescence, la voie NER reconnaît et élimine les lésions volumineuses qui déforment les hélices de l'ADN, généralement causées par les rayons UV ou des agents chimiques (par exemple le benzo(a)pyrène ou le cisplatine) (13) (14).

La voie MMR (Mismatch Repair) :

La voie MMR est principalement responsable de la reconnaissance et de la réparation des erreurs d'incorporation de nucléotides générées lors de la synthèse de l'ADN, entraînant soit des mésappariements base-base, soit de petites boucles d'insertion ou de suppression.

Les polymérases qui exécutent la synthèse de l'ADN au niveau des fourches de réplication font régulièrement des erreurs. La fréquence des erreurs commises par les ADN polymérases eucaryotes est estimée à environ une erreur pour 10^5 nucléotides, ce qui signifie que ~100 000 erreurs se produisent au cours de chaque phase S cellulaire. La première ligne de défense contre une fréquence de mutation aussi élevée est l'activité de relecture des enzymes polymérases. Bien que les ADN polymérases assurent cette activité de relecture par leurs propres domaines, certaines mutations introduites peuvent encore passer inaperçues et doivent être corrigées par la deuxième ligne de défense - l'expression des gènes liés à la MMR.

Afin d'assurer la réparation de l'ADN, des protéines polyvalentes appelées collectivement MSH et MLH/PMS ont évolué chez les eucaryotes, y compris chez les mammifères et les humains(15). Toutes ces protéines remplissent leurs fonctions sous forme d'hétérodimères. Leurs noms reflètent leur homologie avec le système d'*E. coli*, c'est pourquoi le nom MSH est l'abréviation de MutS Homolog, tandis que MLH est dérivé de MutL Homolog d'*E. coli*. Notre connaissance des modes de fonctionnement du système MMR des mammifères provient principalement d'études *in vitro* qui ont montré que les mécanismes MMR impliquent les étapes suivantes : reconnaissance des lésions, initiation de la réparation, excision des lésions et resynthèse de l'ADN.

Il a été démontré que MSH6 est exprimé 10 fois plus que MSH3 et, conséquemment, MutS α , l'hétérodimère composé de MSH2 et MSH6 prédomine dans les cellules humaines par rapport à MutS β , hétérodimère composé de MSH2-MSH3. La fixation de l'un ou l'autre des deux hétérodimères dépend aussi du type mismatch (base-base ou petits indels) (Figure 10). Les complexes MSH formés se transforment en pinces coulissantes sur l'hélice d'ADN. Ils glissent jusqu'à ce que les bases mal appariées et autres lésions extra-hélicoïdales soient reconnues. Il y a ensuite fixation de MutL α (hétérodimère MLH1/PMS2) puis d'autres molécules telles que l'antigène nucléaire des cellules proliférantes (PCNA), le facteur de réplication C (RFC) et l'exonucléase 1 (Exo1) sont recrutées dans le complexe, ce qui conduit à la dissociation finale du mismatch. L'ADN polymérase delta (Pol δ) va ensuite resynthétiser la partie manquante du brin qui sera rabouté avec la Ligase 1.

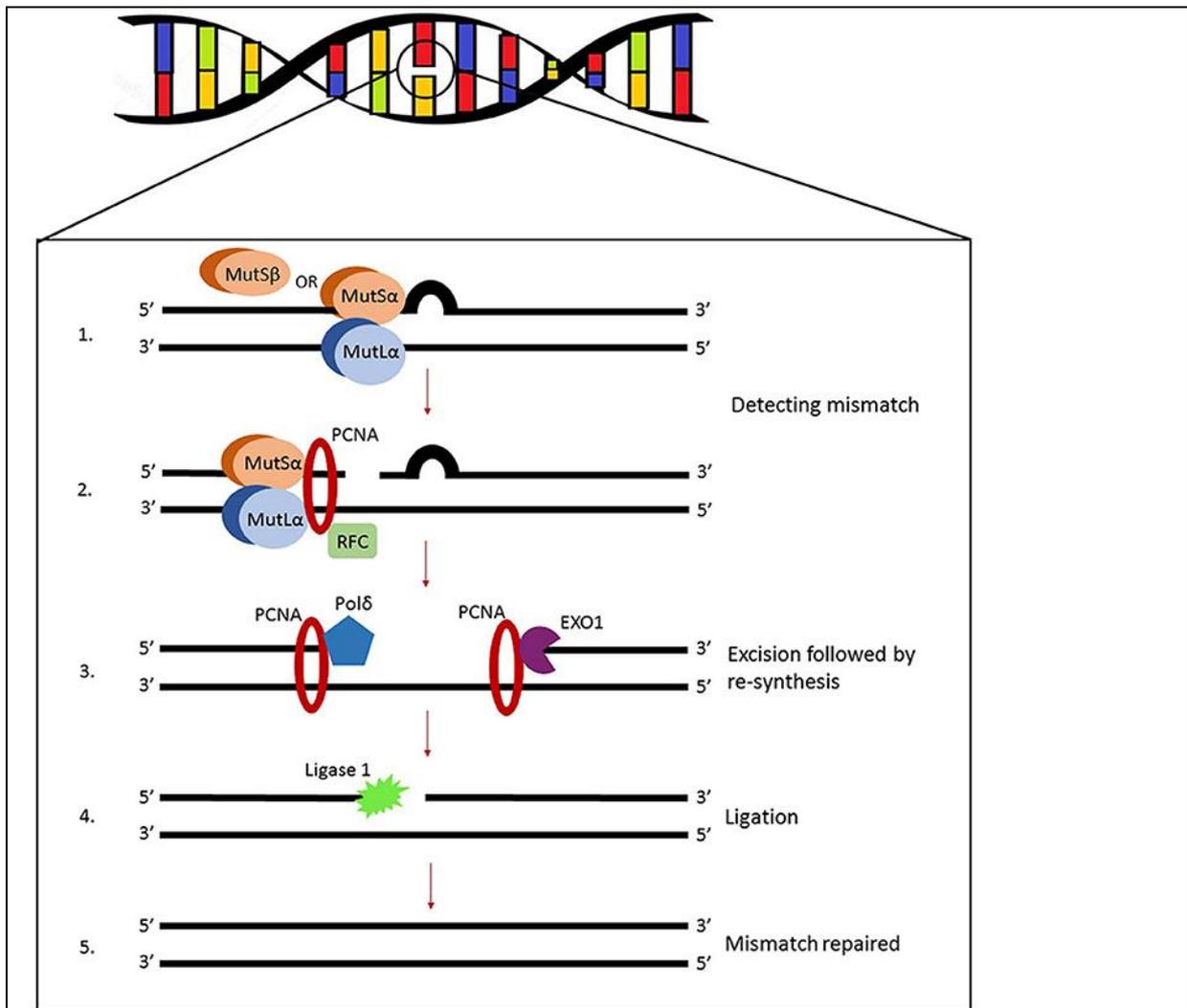


Figure 10 : Illustration du système MMR eucaryote (15)

Code couleur des bases de l'ADN : **A** = Adénine ; **T** = Thymine ; **G** = Guanine ; **C** = Cytosine

Ici exemple d'un mésappariement Cytosine en rouge avec Thymine en jaune.

MutS α (hétérodimère MSH2-MSH6 prédominant dans les cellules humaines) ou MutS β (hétérodimère MSH2-MSH3) commence la réparation de l'ADN en reconnaissant et en se liant aux mésappariements). D'autres molécules sont recrutées dans le complexe, principalement MutL α (hétérodimère MLH1-PMS2) mais aussi l'antigène nucléaire des cellules proliférantes (PCNA) et le facteur de réplication C (RFC). L'assemblage déclenche l'activité endonucléasique de PMS2 (PMS1 Homologue 2) qui provoque des cassures simple brin à proximité du mismatch et ouvre les sites d'entrée de l'exonucléase 1 (EXO1) conduisant à l'élimination à la fois de la base et/ou de la boucle incompatibles et de plusieurs bases en aval des dommages. Les facteurs de réparation PCNA, RFC, RPA, Pol δ/ϵ et l'ADN ligase vont ensuite combler le vide afin de terminer le processus.

Le cycle cellulaire

Une cellule de l'organisme peut avoir différentes destinées, notamment rester quiescente (stade G₀), proliférer (c'est-à-dire entrer et progresser dans le cycle cellulaire), mourir de façon programmée (apoptose), se nécroser et, ce qui nous intéresse plus particulièrement ici, devenir sénescence. L'ensemble de ces devenir cellulaires fait intervenir de nombreux acteurs du cycle cellulaire dont je vais présenter un bref rappel maintenant.

Le cycle cellulaire est dirigé par des complexes protéiques constitués d'une cycline régulant l'activité d'une kinase dénommée kinase dépendante des cyclines (CDK) (Figure 11) (16). Les CDK, à leur tour, tout au long du cycle, phosphorylent et activent une pléthore de protéines qui orchestrent la progression du cycle, de la phase initiale de croissance (G₁), en passant par la synthèse de l'ADN (S), l'achèvement de la synthèse de l'ADN et la poursuite de la croissance (G₂) et la mitose (M).

Rôle central de la protéine du rétinoblastome dans le cycle cellulaire

L'un des acteurs centraux du cycle cellulaire est un gène suppresseur de tumeur appelé le gène du rétinoblastome (*RB*).

Fonctionnellement, *RB* représente un corépresseur transcriptionnel. À l'état non phosphorylé, la protéine *RB* forme des complexes avec les facteurs de transcription de la famille E2F (Figure 12). Il est important de noter que les complexes *RB*-E2F qui en résultent font passer les sites promoteurs d'E2F de sites activateurs à des sites répresseurs ; donc les complexes *RB*-E2F régulent à la baisse la transcription des gènes. Les gènes cibles classiques de *RB*-E2F contrôlent souvent le cycle cellulaire en contribuant à la réplication de l'ADN et à la transition de la phase G₁ à la phase S. Plus précisément, des gènes tels que l'ADN polymérase α (*POLA1*), la cycline A (*CCNA2*), la thymidine kinase (*TK1*), la dihydrofolate réductase (*DHFR*), la kinase cycline-dépendante 1 *CDC2/CDK1* (*CDK1*) et les composants 3 et 5 du complexe de maintenance du minichromosome (*MCM3/5*, facteurs de licence de la réplication de l'ADN) sont considérés comme des cibles authentiques de *RB*-E2F (17). *RB* porte plusieurs sites de phosphorylation qui servent de substrats pour les complexes cycline D-*CDK4/6*, cycline E-*CDK2*, cycline A-*CDK2* et cycline B-*CDK1*.

Lorsqu'une cellule reçoit des signaux pour se diviser, les complexes cycline/CDK sont activés et vont phosphoryler RB, ce qui empêchera la formation des complexes RB-E2F et donc lèvera la répression par ces complexes. D'un point de vue temporel, la phosphorylation de RB se fait dans cet ordre : RB est phosphorylée au début du cycle cellulaire par la cycline D-CDK4/6 et plus tard par la cycline E-CDK2. Puis, la cycline A-CDK2 et la cycline B-CDK1 maintiennent RB dans un état hyperphosphorylé pendant la phase S et plus tard dans le cycle cellulaire.

Des études récentes apportent d'autres explications au rôle de RB que ce simple modèle de répression par les complexes E2F-RB(17). Ainsi, il a été montré que RB exerce des fonctions indépendantes de sa liaison aux protéines E2F. Il n'est pas évident de savoir laquelle des fonctions de RB - la répression transcriptionnelle par la liaison des protéines E2F ou l'interaction avec divers autres facteurs indépendants d'E2F - est essentielle à sa fonction. Ainsi, les protéines reliées à RB, RBL1 et RBL2, qui sont de la même famille ont aussi cette fonction de corépresseur transcriptionnel, avec beaucoup de redondances par rapport aux cibles des complexes E2F-RB. Il a, de plus, été montré que RB pouvait faciliter l'activité de RBL2 ; ceci est un exemple de fonction non classique de RB (17).

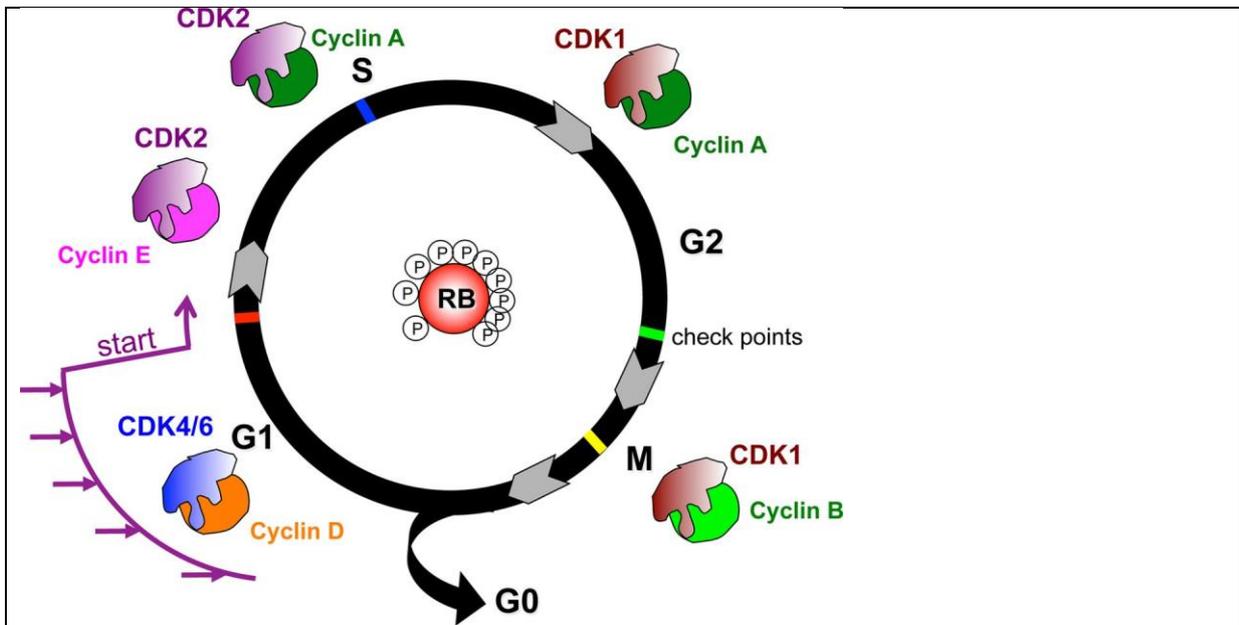


Figure 11 : Le cycle cellulaire (16)

Le cycle cellulaire est représenté sous forme d'un cercle, montrant les phases (divisées par des chevrons) : croissance (Growth) ou Gap 1 (G1), synthèse de l'ADN (S), croissance (Growth) ou Gap 2 (G2) et mitose (M), la sortie du cycle étant représentée par Go. Les points de contrôle du cycle cellulaire sont représentés par des barres, le point de contrôle G1/S (rouge : contrôle des dommages à l'ADN), le point de contrôle de la phase S (bleu : contrôle des dommages à l'ADN et de la fourche de réplication), le point de contrôle G2/M (vert : contrôle des dommages à l'ADN et de l'achèvement de la réplication) et le point de contrôle du fuseau (jaune : assure l'alignement correct des chromosomes sur le fuseau, prêts pour la division). Les complexes cycline-CDK correspondant à chaque phase sont représentés. La protéine Rb est au cœur du contrôle du cycle cellulaire. Elle est de plus en plus phosphorylée par les CDK activées tout au long de la phase G1 (représenté par un nombre de P croissant). Au fur et à mesure que la phase G1 progresse, RB devient hyperphosphorylée, ce qui permet la transition G1/S et la poursuite de la progression. La protéine RB si non phosphorylée bloque la progression du cycle cellulaire. L'entrée dans le cycle peut être initiée par une signalisation mitogénique (flèches violettes) qui permet la transition Go-G1. Une fois le "départ" passé, la cellule est engagée dans le cycle.

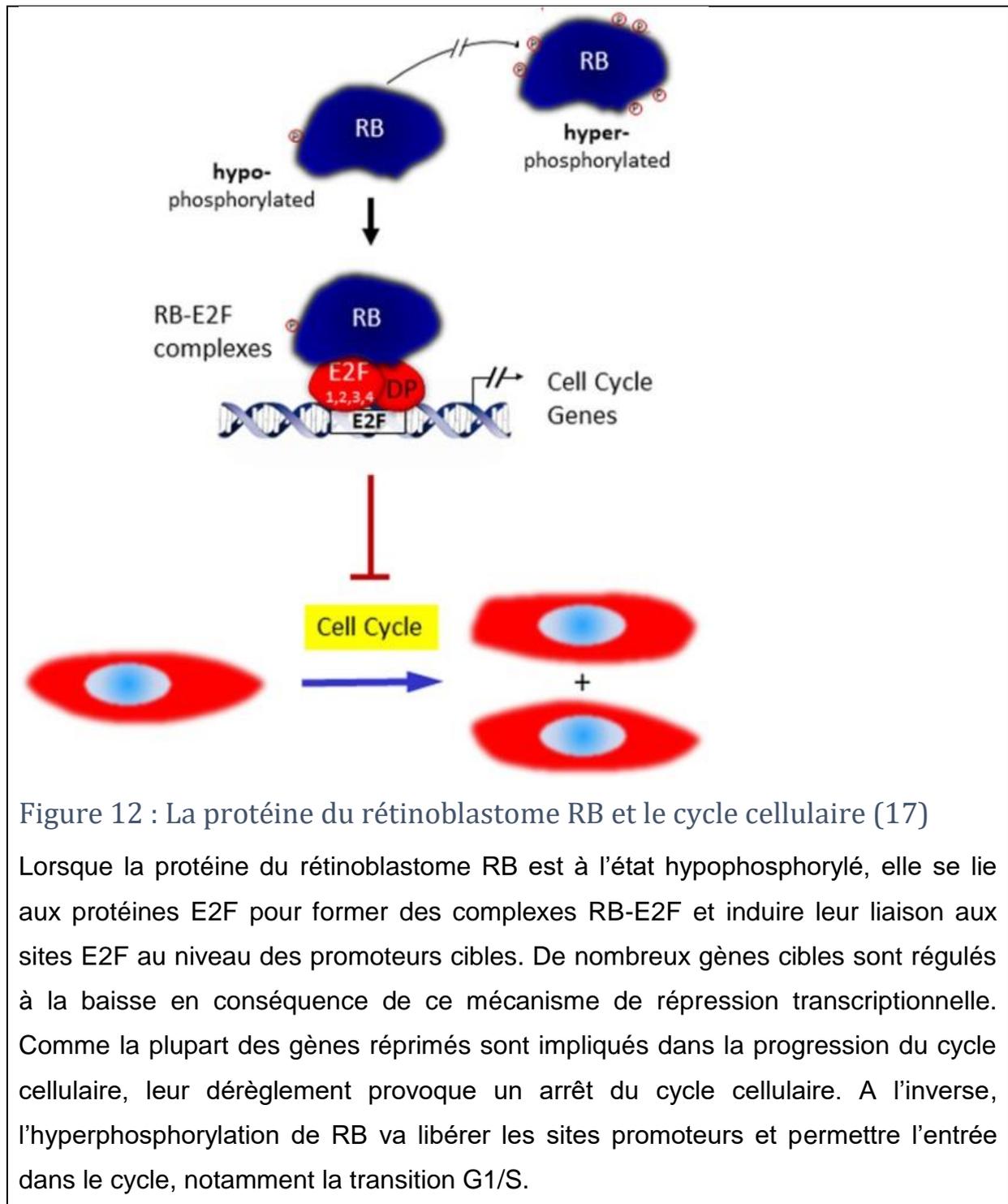


Figure 12 : La protéine du rétinoblastome RB et le cycle cellulaire (17)

Lorsque la protéine du rétinoblastome RB est à l'état hypophosphorylé, elle se lie aux protéines E2F pour former des complexes RB-E2F et induire leur liaison aux sites E2F au niveau des promoteurs cibles. De nombreux gènes cibles sont régulés à la baisse en conséquence de ce mécanisme de répression transcriptionnelle. Comme la plupart des gènes réprimés sont impliqués dans la progression du cycle cellulaire, leur dérèglement provoque un arrêt du cycle cellulaire. A l'inverse, l'hyperphosphorylation de RB va libérer les sites promoteurs et permettre l'entrée dans le cycle, notamment la transition G1/S.

Les détails mécanistiques ne sont pas totalement découverts mais il est établi que l'inactivation de RB provoque l'induction de la division cellulaire, des défauts dans la sortie du cycle cellulaire, une capacité réduite à entrer en sénescence et une compromission du contrôle des points de contrôle du cycle cellulaire, en particulier à la transition G1/S. Dans le développement du cancer, la perte de fonction RB est souvent une étape centrale. Le nom de ce gène vient du fait que ses mutations héréditaires ont été initialement identifiées comme prédisposant au rétinoblastome.

Par la suite, il a été montré que de nombreux types de tumeurs contenaient des RB inactivés provenant également d'altérations spontanées, notamment dans le cancer du poumon à petites cellules, le gliome, le cancer de l'œsophage et les tumeurs du foie. Les mutations inactivatrices ou la délétion du gène RB1 sont des causes de la perte de fonction RB mais elle peut aussi être abrogée par des oncoprotéines virales, comme la protéine E1A de l'adénovirus, le grand antigène tumoral du virus simien SV40 et la protéine E7 du papillomavirus humain. RB peut aussi être inactivé par la liaison à la protéine MDM2, qui est souvent surexprimée dans les tumeurs, cette liaison avec MDM2 entraînant la dégradation protéolytique de RB (17).

Les inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines ou CKI (Cyclin-dependent Kinase Inhibitor)

Certaines protéines cellulaires nommées CKI vont contrôler le cycle par leur action inhibitrice sur les CDK. Je n'évoquerai pas plus le point qu'il existe aussi des CKI pharmacologiques (e.g. palbociclib, abemaciclib, ribociclib) utilisés notamment pour traiter certains cancers.

p53 et le CKI p21

Comme vu ci-dessus dans la voie DDR, p53 arrive en aval de la signalisation d'une DSB par ATM. p53 est aussi un activateur transcriptionnel direct de BAX et de PUMA/BBC3 qui sont des inducteurs d'apoptose (17).

Une autre action importante de p53 est l'induction de p21, aussi appelée WAF1 ou CIP1 ou CDKN1A : p21 est un CKI qui est codé par *CDKN1A*. p21 va inhiber CDK1 (également appelé CDC2), CDK2, CDK3, CDK4 et CDK6, ces différentes CDK faisant partie de complexes avec les cyclines (Figure 13). Comme décrit au-dessus, l'inhibition de ces CDK empêche la phosphorylation de RB ; RB hypophosphorylée va empêcher la transition G1/S.

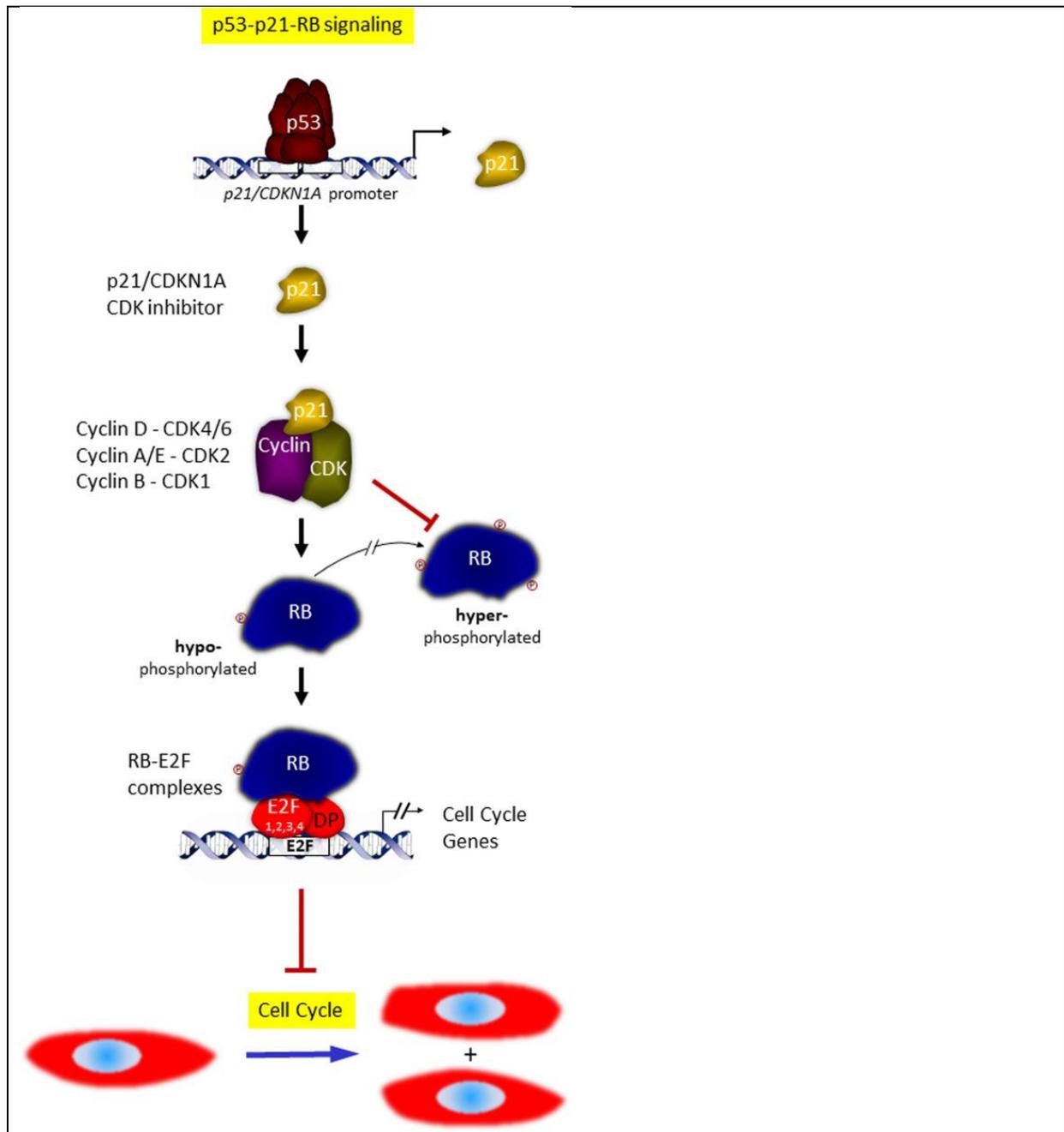


Figure 13 : La signalisation p53-p21-RB (17)

Après l'activation de p53, la transcription de p21/CDKN1A est fortement induite en tant que cible directe de p53. L'inhibiteur de kinase cycline-dépendante p21 bloque ensuite l'activité de plusieurs complexes cycline-CDK. Il en résulte une hypophosphorylation de RB, qui favorise la formation de complexes RB-E2F et leur liaison aux sites E2F dans les promoteurs cibles. De nombreux gènes cibles sont régulés à la baisse en conséquence de ce mécanisme de répression transcriptionnelle indirecte dépendant de p53. Comme la plupart des gènes réprimés sont impliqués dans la progression du cycle cellulaire, leur dérèglement provoque un arrêt du cycle cellulaire.

Des concentrations élevées de p53 entraînent une augmentation de l'activité transcriptionnelle du p53, augmentant, en particulier, l'expression de p21, ce qui déclenche l'arrêt du cycle cellulaire transitoire pour réparer l'ADN ou l'arrêt persistant du cycle ou l'apoptose (17). L'orientation vers l'apoptose ou vers la sénescence dépend du niveau d'expression de p53 ainsi que de sa variation dans le temps: ainsi une expression soutenue et constante de p53 orientera plutôt la cellule vers l'apoptose, une expression moins forte orientera vers la sénescence (18).

La protéine p16 aussi appelée p16^{INK4a} :

La protéine p16 ou p16^{INK4a} est un autre CKI important ; elle est produite par le gène CDKN2A (cyclin dependent kinase inhibitor 2A)(19). INK4 fait référence au fait que p16 INhibe la Kinase CDK4. Ce gène CDKN2A codant pour p16 est muté dans une grande variété de cancers. Les souris déficientes en p16 sont viables mais très sujettes aux tumeurs spontanées et induites par les carcinogènes. La fonction principale du complexe CDK4/6 associée à la cycline D est de phosphoryler la protéine suppresseur de tumeur du rétinoblastome, Rb, permettant la progression du cycle cellulaire vers la phase S. Ainsi, l'expression de p16 inhibe les kinases CDK4/6 et conduit à l'arrêt du cycle en phase G1 (Figure 14). Il a été montré que la présence de RB fonctionnel était nécessaire pour l'action de p16.

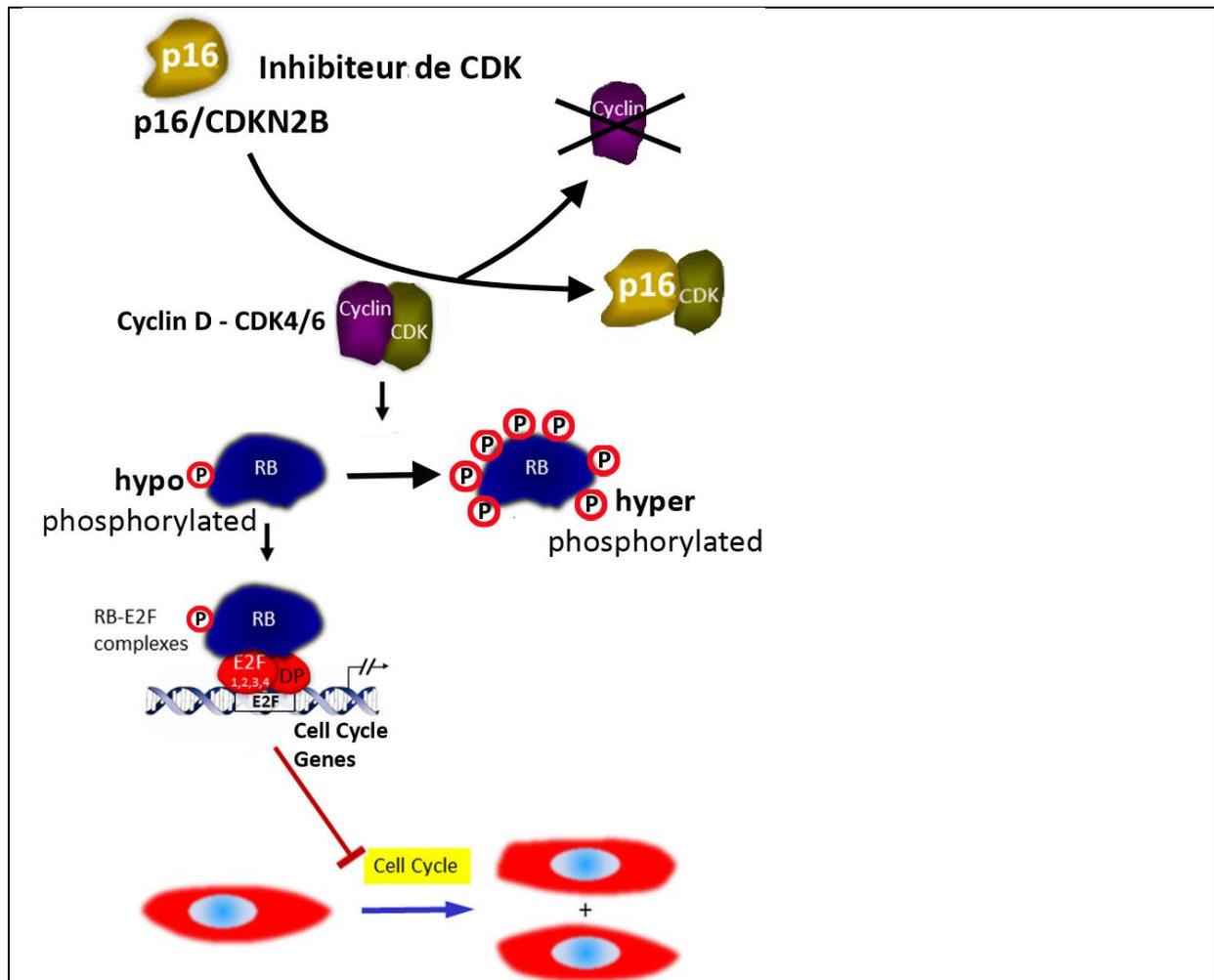


Figure 14 : voie p16-RB

Adapté de (17) et (20)

L'inhibiteur de kinase cycline-dépendante p16 bloque l'activité des complexes incluant CDK4/6 présents au début de la phase G1 en entrant en compétition avec la cycline D pour former un complexe binaire ; la cycline D non complexée est rapidement dégradée(21). Il en résulte une hypophosphorylation de RB, qui favorise la formation de complexes RB-E2F et leur liaison aux sites E2F dans les promoteurs cibles. De nombreux gènes cibles sont régulés à la baisse en conséquence de ce mécanisme de répression transcriptionnelle indirecte dépendant de p53. Comme la plupart des gènes réprimés sont impliqués dans la progression du cycle cellulaire, leur dérèglement provoque un arrêt du cycle cellulaire.

p16 exerce son action inhibitrice uniquement en phase G1 alors que p21 exerce son action CKI pendant une plus grande partie du cycle.

Ceci fait, je vais maintenant décrire les sous types de sénescence, en suivant l'ordre de découverte chronologique.

Les sous-types de sénescence et leur contexte

Introduction

Il existe différents sous-types de sénescence cellulaire qui surviennent dans différents contextes d'induction. Dans ces différents états de sénescence, les cellules partagent néanmoins les principales caractéristiques de la sénescence.

Historiquement, la sénescence a été découverte, en 1961 par Hayflick (3). Pour la distinguer des autres formes de sénescence découvertes par la suite, la sénescence découverte par Hayflick sera nommée sénescence répllicative ou RS.

Ensuite, en 1995, Toussaint *et al.* (22) ont décrit pour la première fois ce qui sera appelée SIPS (ou stress induced premature senescence).

Bien que correspondant à une sénescence prématurée induite par un stress, l'OIS ou sénescence induite par les oncogènes (notamment RAS) est souvent décrite séparément de la SIPS; elle a été découverte par Serrano *et al.* en 1997 (23).

La TIS ou sénescence induite par les thérapies anti-cancéreuses pourrait aussi faire partie de la SIPS ; elle est décrite comme correspondant à l'état de sénescence induit dans les cellules cancéreuses et dans les cellules normales en réponse à de nombreuses chimiothérapies et radiothérapies.

Je vais donc commencer par la première découverte ou décrite : la sénescence répllicative.

La sénescence répllicative

Historiquement, le phénomène de sénescence a été découvert lors d'expériences dites d'« épuisement réplcatif ». En 1961, Leonard Hayflick a découvert que les fibroblastes humains normaux (c'est-à-dire non issus de tumeurs), lorsqu'ils étaient mis en culture, n'étaient capables que d'un nombre limité de divisions, perdant finalement la capacité de se répliquer et devenant sénescents, un phénomène maintenant connu sous le nom de « limite de Hayflick » :

« La survie des souches cellulaires à - 70 ° C avec conservation de toutes les caractéristiques assure un approvisionnement presque illimité de n'importe quelle souche indépendamment du fait qu'**elles dégénèrent après environ 50 repiquages et un an de culture**. La prise en compte de la cause de la dégénérescence finale de ces souches conduit à **l'hypothèse que des facteurs externes non cumulatifs**

sont exclus et que le phénomène est imputable à des facteurs intrinsèques qui se traduisent par une sénescence au niveau cellulaire »(3).

L'explication de cette sénescence répliquative viendra de l'extrémité des chromosomes.

Pourquoi les extrémités des chromosomes ne sont-elles pas signalées et réparées comme des cassures double brin ?

La première question qui pourrait être posée est peut-être celle-ci : vu le nombre de mécanismes différents de réparation des cassures de l'ADN, pourquoi l'extrémité d'un chromosome n'est-elle pas reconnue comme une cassure double brin de l'ADN et « réparée », de façon aberrante, par une des voies de réparation entraînant par exemple une fusion de deux chromosomes ?

Une extrémité d'un chromosome est appelée un télomère ; les télomères des mammifères contiennent plusieurs paires de kilobases de répétitions TTAGGG double brin (db) en tandem se terminant par un simple brin 3' (24).

Le télomère forme une boucle grâce au complexe shelterine

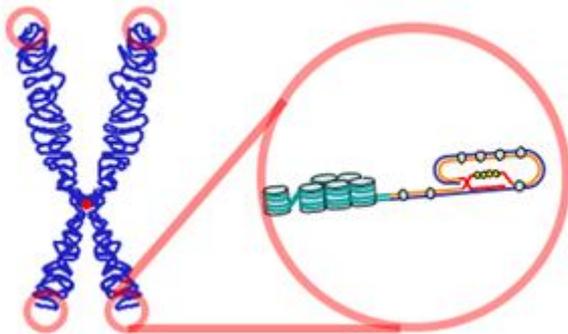
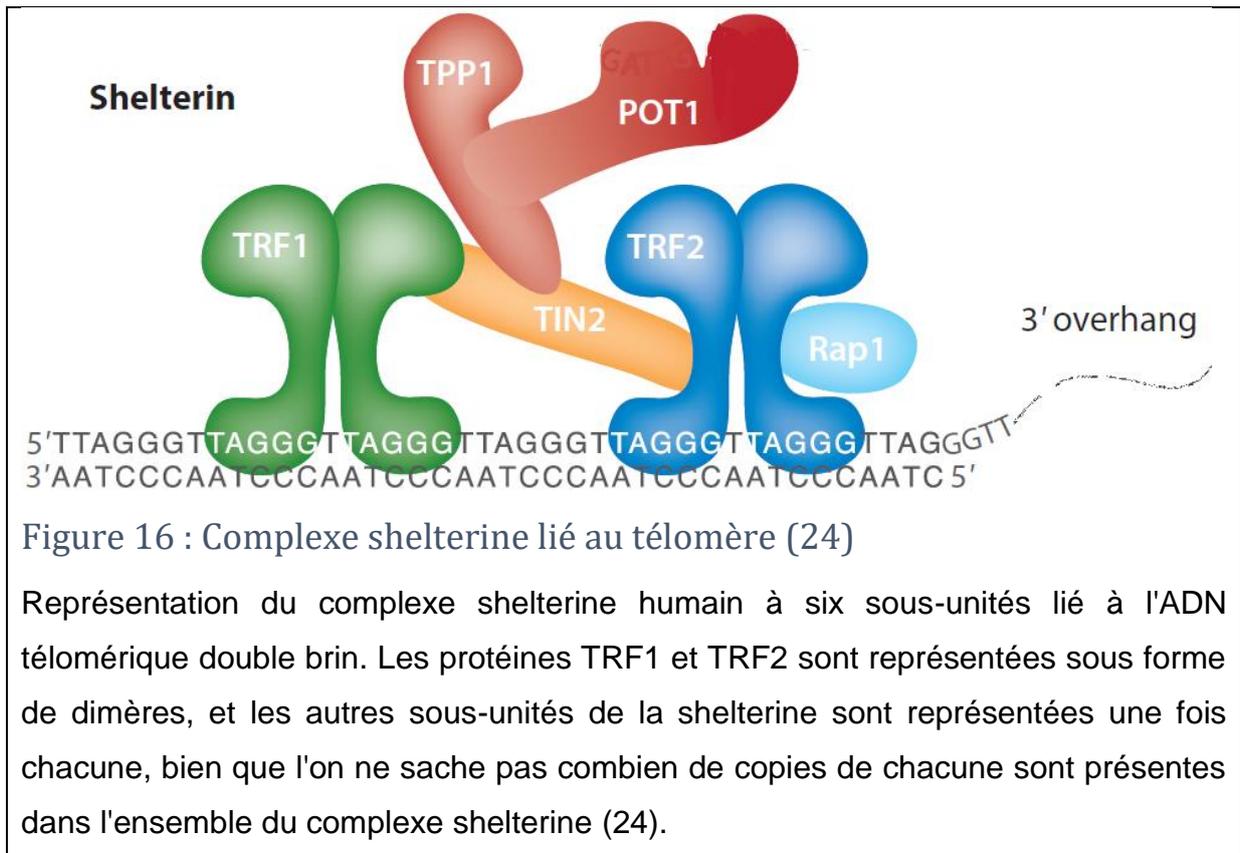


Figure 15 : Schéma d'un chromosome mitotique et le zoom sur un de ses quatre télomères

L'extrémité d'un chromosome est repliée sous forme d'une boucle grâce à la fixation d'un complexe protéique appelé shelterine.

Le complexe shelterine humain est constitué de six protéines distinctes : TRF1, TRF2, Rap1, TIN2, TPP1 et POT1 (Figure 16) (24). La formation du complexe shelterine ne nécessite pas d'interactions avec l'ADN. TRF1 et TRF2 se lient à TIN2 à des endroits différents (Figure 16). TIN2 se lie aussi à TPP1, qui se lie ensuite à POT1. Pour finir, Rap1 se lie à TRF2. TRF1 et TRF2 vont se lier à l'ADN télomérique double brin avec une affinité nanomolaire sous la forme d'homodimères sur quatre

motifs db 5' -TAGGGTT-3'. La protéine POT1 se lie à l'ADN télomérique simple brin (sb) grâce à deux replis en N-ter.



Les protéines de liaison à l'ADN de la shelterine ne montrent pas de coopérativité *in vitro* pour leur fixation à l'ADN. Donc, les complexes shelterine se lient probablement comme des unités indépendantes à l'ADN télomérique. Les protéines du complexe shelterine sont exprimées de façon suffisamment abondante pour lier tout l'ADN télomérique.

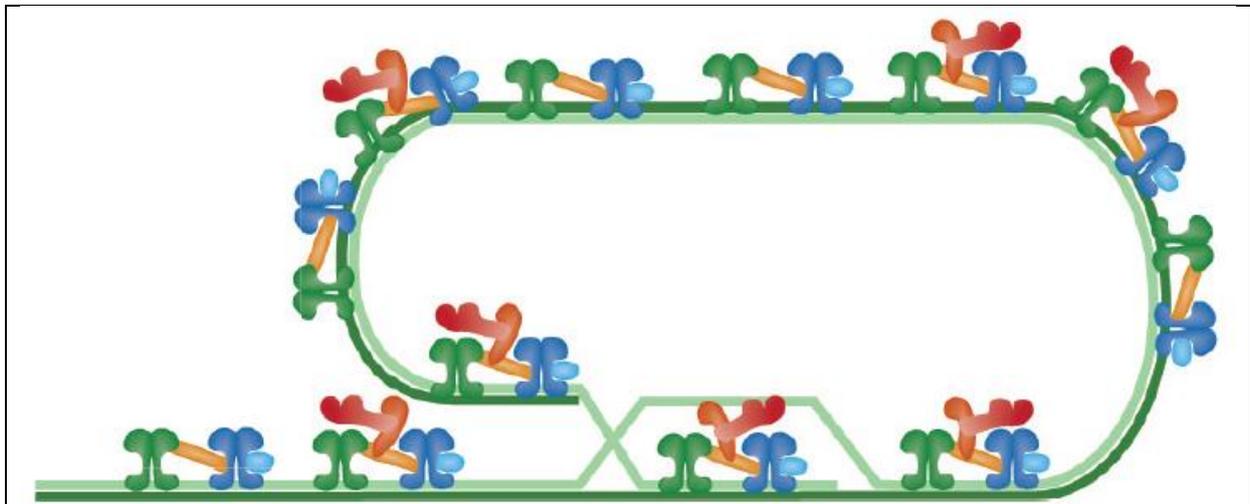


Figure 17: Les complexes shelterine et le télomère (24)

Représentation des complexes de shelterine chargés sur les télomères dans la configuration en boucle T (T pour télomère). Comme TPP1 et POT1 (représentés en rouge) sont beaucoup moins abondants que les autres sous-unités de la shelterine, certains complexes sont représentés sans TPP1 et POT1.

Le complexe shelterine et l'organisation en boucle protègent le télomère d'une signalisation par la voie DDR et d'une réparation

Chez des souris dont les gènes codant pour TRF1 et 2 ont été éteints (knock-out), il a été montré que leurs télomères « nus », sans shelterine, étaient vulnérables à six voies différentes liées à la réparation de l'ADN : les jonctions classique et alternative des extrémités non homologues (c-NHEJ et a-NHEJ); les voies de signalisation ATM et ATR ; la recombinaison dirigée par homologie (HDR) et une résection d'ADN non atténuée (25). Les complexes shelterine ont donc un effet protecteur majeur des télomères ; certains de ces mécanismes de protection ont été élucidés, que ce soit la forme adoptée, c'est-à-dire la structuration en boucle T (Télomère) qui masque les extrémités chromosomiques (Figure 17) ou une répression directe de facteurs de la voie DDR (24).

Comment est induit, malgré cela, la senescence répllicative ?

Dans la plupart des cellules, les télomères raccourcissent d'environ 50 paires de base à chaque division cellulaire (26) (27). Ce phénomène de raccourcissement a plusieurs causes.

Lors de la réplication de l'ADN, l'ADN polymérase synthétise un nouveau brin d'ADN uniquement dans la direction 5' à 3' à l'aide d'amorces d'ARN. Ces amorces s'hybrident aux brins matrices, fournissant un groupe 3'OH libre pour l'ajout de

nucléotides libres. Quand l'action de la polymérase se déroule dans le même sens que la progression de la fourche de réplication, la synthèse du nouveau brin d'ADN dans le sens 5' vers 3' ne nécessite qu'une seule amorce et est continue ; c'est le brin « avancé ». En revanche, la synthèse d'un nouveau brin d'ADN 3' vers 5' progresse, elle, dans le sens contraire de la fourche de réplication ; c'est le brin « retardé ». La synthèse de ce nouveau brin nécessite l'hybridation de plusieurs amorces d'ARN qui sont allongées en courts fragments d'Okazaki, ensuite ligaturés. Par conséquent, une longueur d'ADN au moins égale à la taille de l'amorce d'ARN est perdue à l'extrémité 5' du brin retardé lorsque l'amorce d'ARN finale est retirée après la réplication. En réalité, cependant, une quantité beaucoup plus importante d'ADN est perdue après la réplication en raison d'un échec d'amorçage et en raison de la nature complexe de la structure des télomères elle-même. L'association des séquences de télomères avec le complexe shelterine conduit à un décrochage de la fourche de réplication. De plus, la synthèse d'ADN via l'action de la polymérase produit des extrémités franches. Afin de former la boucle, une activité nucléolytique est nécessaire pour produire un surplomb 3' simple brin ¹.

Il existe néanmoins deux mécanismes principaux permettant de conserver la longueur des télomères : une enzyme, la télomérase, et la recombinaison homologue pour l'allongement alternatif des télomères ou ALT (alternative lengthening of telomeres) (28).

La télomérase est un complexe ribonucléoprotéique. Elle utilise son ARN interne qui porte le motif CCAAUCCC comme matrice pour rallonger le télomère en rajoutant des motifs TTAGGG. L'accès de la télomérase à l'extrémité du télomère est limité par la présence de la boucle. La télomérase est exprimée dans les cellules germinales et les cellules souches mais est réprimée dans la majorité des cellules somatiques adultes, chez l'homme, à l'exception des cellules du système immunitaire qui ont besoin de l'activité de la télomérase pour maintenir leur potentiel prolifératif et soutenir une expansion clonale transitoire sélective et rapide (suivie d'une contraction) (29). Malgré l'existence de la télomérase, le raccourcissement télomérique est encore observé après la prolifération dans la plupart des cellules souches à l'exception des cellules souches embryonnaires.

¹ (28)

Les cellules cancéreuses réactivent l'expression de la télomérase ou possèdent la voie ALT (30). Le mécanisme d'allongement télomérique par ALT n'a été trouvé que dans des situations anormales, notamment dans des lignées cellulaires humaines immortalisées, des tumeurs (31).

Par ailleurs, la possibilité de réparer des fins de télomères exposées, que ce soit par HDR ou NHEJ paraît faible (5).

Lorsque les télomères raccourcissent en dessous d'une longueur seuil, ils ne peuvent plus se structurer en boucle. Ils ne sont donc plus protégés et la voie DDR est activée (26), ce qui se manifeste par l'apparition de foyers de DDR au niveau des extrémités chromosomiques. Il est important de noter que la sénescence n'est pas déterminée par la longueur moyenne des télomères dans une cellule, mais par la présence de quelques télomères suffisamment courts pour déclencher la voie DDR (32). La voie DDR joue un rôle essentiel dans l'initiation et le maintien de la sénescence. L'inactivation fonctionnelle de CHK2, ou la délétion des gènes TP53 (qui code pour p53) et CDKN1A (qui code pour p21) prolonge la prolifération des fibroblastes humains en culture au-delà de la limite de Hayflick. L'inactivation transitoire d'ATM, seule ou avec ATR, et l'inactivation combinée de CHK1 et CHK2 permettent d'échapper à la sénescence et de ré-entrer dans la phase S du cycle cellulaire. En résumé, le raccourcissement progressif des télomères finit par faire en sorte que les extrémités des chromosomes soient reconnues comme des cassures d'ADN, ce qui active par conséquent la voie DDR et induit la sénescence répllicative.

Combien de télomères, sur les 92 télomères ou 184 télomères d'une cellule selon la phase du cycle, sont nécessaires pour déclencher la sénescence ? Cette question est encore en partie ouverte. La plupart des cellules sénescents présentent de multiples foyers de DDR (associés à un télomère non protégé), plus de 1 et moins de 20. Il est notable que la longueur des télomères est hétérogène entre les chromosomes et les allèles de télomères. Il est probable qu'un seul télomère devienne court de façon critique et déclenche la voie DDR avant les autres. Mais la présence de plusieurs foyers DDR implique qu'un seul télomère exposé n'est peut-être pas suffisant pour déclencher un point de contrôle efficace et que les cellules peuvent proliférer malgré la présence d'une extrémité d'ADN exposée et qu'il est nécessaire d'avoir quelques foyers DDR pour enclencher la sénescence. Par ailleurs, observation notable, lorsque des cellules sénescents authentiques de la peau de primates vieillissants ont été analysées in vivo, elles présentaient un seul

foyer DDR associé à la sénescence sur un seul télomère, ce qui suggère qu'un point de contrôle plus strict pourrait être appliqué *in vivo*. Ainsi, la question de savoir combien de télomères sont nécessaires pour déclencher la sénescence est en partie répondue mais est encore à préciser (5).

Ainsi, la sénescence réplivative résulte d'un raccourcissement progressif des télomères au fil des divisions cellulaires, qui entraîne la mise en jeu persistante de systèmes de signalisation de dommages à l'ADN et favorise un arrêt quasi-irréversible du cycle cellulaire caractéristique de la sénescence réplivative.

Je vais maintenant décrire les autres sous- types de sénescence connus ; ces autres sous-types de sénescence peuvent être qualifiés de sénescence prématurée, par opposition à celle que je viens de décrire, la sénescence réplivative, qui intervient à long terme.

La sénescence prématurée

La sénescence réplivative est un processus inéluctable pour des cellules saines qui prolifèrent. La sénescence est dite prématurée lorsqu'elle apparaît dans des cellules qui prolifèrent avant le nombre habituel de multiplications pour lequel la sénescence réplivative s'installe i.e. avant la limite de Hayflick de la lignée.

SIPS ou Stress-Induced Premature Senescence

Découverte en 1995

En 1995, Toussaint et Remacle (22) montrent que des fibroblastes humains subissant certains stress montraient des signes d'accélération du vieillissement et en 1999, le terme SIPS (stress induced premature senescence) a été proposé pour décrire l'effet à long terme d'un stress oxydant sub-cytotoxique sur des cellules en prolifération et qui partage de nombreux aspects avec la sénescence réplivative (4).

La destinée cellulaire varie selon certains paramètres

Selon le type de cellule, la nature, l'intensité et la durée du stress, les cellules peuvent réparer les dommages, mourir si les dommages non réparés sont très nombreux ou entrer en sénescence (prématurée) si les dommages non réparés sont moins nombreux. Si l'intensité du stress est faible, les dommages cellulaires peuvent être réparés et la cellule maintient sa croissance. Si le stress est intense, l'apoptose sera initiée. Dans le cas d'un stress modéré, subcytotoxique, les cellules ne sont pas capables de réparer tous les dommages et sont arrêtées dans le cycle cellulaire, entrant dans un état de sénescence prématurée (4).

Les types de stress induisant la SIPS sont nombreux

De nombreux stress de nature physique, chimique ou biologique peuvent forcer les cellules à entrer en sénescence prématurée. Ainsi ont été décrits comme inducteurs de SIPS l'irradiation ultraviolette (UVB), l'éthanol, l'hydroperoxyde de tert-butyle (t-BHP), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, l'agent le plus utilisé), les dicarbonyles, la mitomycine C, la doxorubicine, le paclitaxel, le choc thermique, les antioxydants à haute dose (33), l'hyperoxie, l'irradiation γ , l'homocystéine, l'hydroxyurée et le paraquat (4), la streptozotocine (34), le virus de l'hépatite C (35). Dans la plupart des cas, l'agent stressant utilisé dans les approches expérimentales est appliqué quotidiennement pendant diverses périodes de temps à des doses subcytotoxiques.

Mécanismes de mise en place de la SIPS

Rôle des espèces réactives de l'oxygène

Le mécanisme d'induction de SIPS n'est pas totalement éclairci. Un rôle important est, semble-t-il, dévolu aux espèces réactives de l'oxygène ou ROS (reactive oxygen species). Cette augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène entraîne des dommages oxydants à l'ADN ; si les SSB ne sont pas réparées par la voie SSBR, cela aboutit à la sénescence par une augmentation de l'expression de p16 (12) ; de leur côté, les DSB vont induire la voie DDR et activer p53 ; si cette activation de p53 est persistante, cela va induire la sénescence par l'augmentation de l'expression du CKI p21 (8).

La p38 MAPK

Lorsque l'inducteur est H₂O₂, il a été montré *in vitro* que le stress oxydant induisait la sénescence en partie par l'activation de la p38 MAPK. Lorsque la p38 était inhibée, il y avait une réversion partielle de la sénescence. Il est intéressant de noter que, dans la lignée cellulaire étudiée, la sénescence semblait induite indépendamment par les voies p53/p21 et p38, ceci semblant en contradiction avec le mécanisme présenté dans le paragraphe ci-après (36).

L'hypothèse de la cavéoline-1 pour expliquer la mise en place de la SIPS

Une autre hypothèse est l'action de la cavéoline-1 : le stress oxydant va induire la transcription du gène de la cavéoline-1 par l'intermédiaire de la protéine kinase activée par les mitogènes p38 MAPK (37).

Ensuite, la cavéoline-1 interagit avec l'ubiquitine ligase E3 à double site homologue de la souris double minute 2 (MDM2) et va entraîner la séquestration de MDM2 dans les cavéoles ; or, MDM2 est un régulateur négatif majeur de l'activité

transcriptionnelle et de la stabilité de p53. Le domaine de liaison de la cavéoline-1 de MDM2 chevauche le motif de liaison p53 de MDM2, ce qui suggère que la cavéoline-1 peut inhiber la formation du complexe p53/MDM2, entraînant une stabilisation de p53 et donc une régulation à la hausse de p53. De plus, la cavéoline-1 séquestre aussi PP2A dans les cavéoles ; or PP2A régule négativement l'autophosphorylation d'ATM, donc la séquestration de PP2A augmente l'engagement d'ATM pour activer p53 (38). p53 va ensuite induire la sénescence cellulaire (Figure 13).

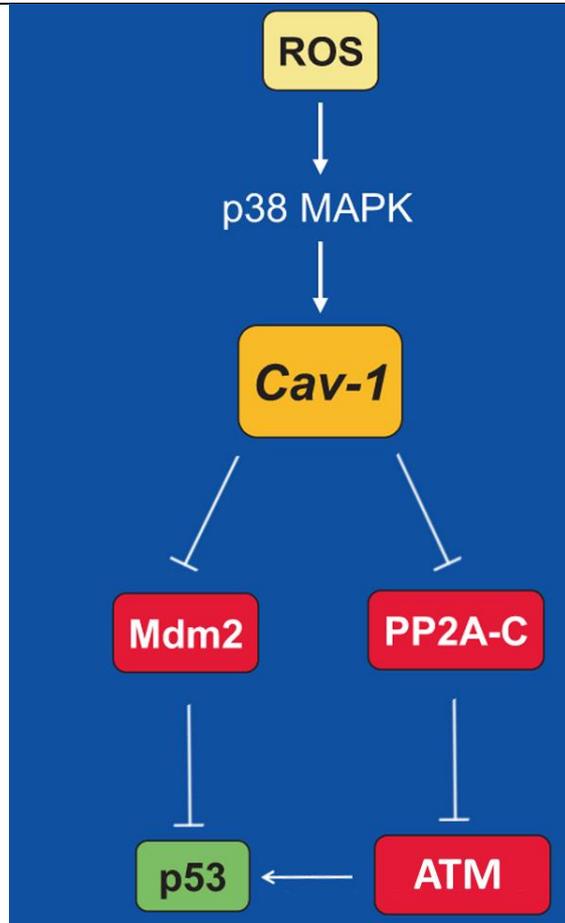


Figure 18: Le stress oxydant entraine l'activation de p53 par l'intermédiaire de la cavéoline-1

Adapté de (37)

Le stress oxydant active le promoteur du gène caveolin-1 dans un mécanisme dépendant de p38 MAPK et régule à la hausse l'expression de caveolin-1. La régulation à la hausse de la cavéoline-1 favorise la sénescence cellulaire en activant la voie p53/p21Waf1/Cip1. L'activation de p53 se produit notamment par la séquestration de Mdm2 dans les membranes cavéolaires, loin de p53, ceci empêche la dégradation de p53 dépendante de Mdm2 et stabilise l'expression de p53 ; l'activation de p53 passe aussi par la séquestration de PP2A-C dans les membranes cavéolaires, ce qui active ATM, qui à son tour phosphoryle et active p53.

OIS ou sénescence induite par les oncogènes

L'OIS pourrait faire partie de la SIPS (stress induced premature senescence) ; en effet, il est possible de considérer l'action d'un oncogène comme un stress sur la cellule. De plus, l'OIS est une sénescence prématurée. Elle est généralement décrite séparément car pouvant jouer un rôle dans la formation et l'évolution des lésions préneoplasiques (39).

OIS induite par l'oncogène *RAS*

RAS (pour Rat sarcoma) désigne une famille de protéines ubiquitaires. A noter que RAS est parfois appelée p21/RAS (NB : aucun lien avec le CKI p21 aussi appelé p21^{CIP1} ou p21^{Waf1}). La famille des oncogènes *RAS* code pour de petites GTPases : elles vont se lier au GTP suite à la fixation de signaux mitogènes sur les récepteurs tyrosine-kinase (RTK). Elles ont donc un rôle dans la transduction du signal et vont notamment induire l'activation de RAF dans la cascade RAS/RAF/MEK/ERK1/ERK2 (Figure 19) (40). Dans cette famille RAS, trois membres sont connus comme oncogènes chez l'être humain: HRAS, KRAS et NRAS ; des mutations de ces 3 gènes sont retrouvées dans ~20% des cancers, notamment KRAS dans quasiment tous les cancers du pancréas (41).

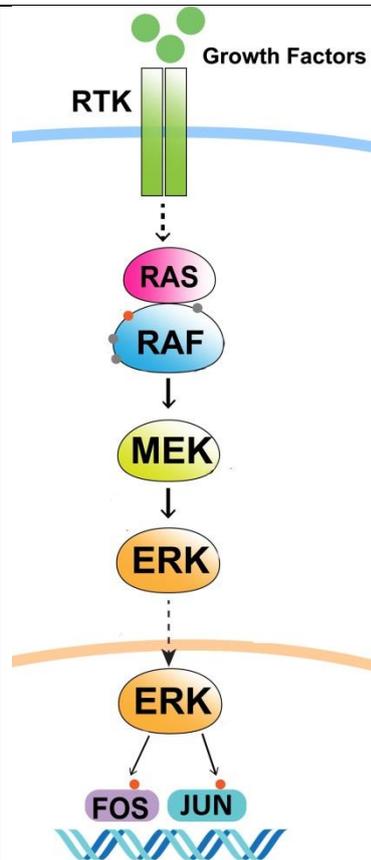


Figure 19 : la cascade de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK

Adapté de (42)

L'axe RAS-RAF-MEK-ERK est impliqué dans la régulation de processus physiologiques importants, tels que la prolifération, la différenciation, le cycle cellulaire, l'apoptose et le développement. La transduction du signal par la voie RAF-MEK-ERK est initiée par la liaison d'une variété de ligands aux RTK, en particulier les récepteurs de facteurs de croissance tels que l'EGFR. L'interaction récepteur-ligand favorise la dimérisation des RTK, leur activation et leur autophosphorylation sur plusieurs résidus tyrosine dans le domaine intracellulaire. Cette phosphorylation entraîne l'échange de GDP en GTP sur les protéines RAS. Le GTP-RAS marque le début d'une cascade de phosphorylation en trois étapes en recrutant et en activant RAF. Le RAF phosphoryle et active les protéines kinases MEK1/2. MEK1/2 phosphoryle ERK1/2. ERK1 et ERK2 phosphorylés se déplacent ensuite vers le noyau et activent des facteurs de transcription qui régulent différents processus physiologiques en modifiant le profil d'expression génétique.

En 1997, Serrano *et al.* démontrent que l'expression prolongée d'un RAS oncogénique (23), c'est-à-dire s'activant constamment sans nécessité d'un signal mitogène, induisait un arrêt du cycle cellulaire impliquant p53 et p16 ; les cellules

étant alors indistinctes de cellules ayant subi la sénescence réplivative. Pour montrer cela, ils ont infecté des cellules primaires avec un oncogène *ras* ; *ras* provoquait un arrêt permanent du cycle cellulaire dans les fibroblastes primaires d'origine rongeur et humaine. L'arrêt se produit en G1, en présence d'une augmentation significative des niveaux de p53, p21 et p16.

Il a été montré dans des fibroblastes d'embryons murins p53^{-/-} et p16^{-/-} que l'augmentation des niveaux de p16 et de p53 induite par la protéine Ras était indépendante l'une de l'autre. De plus, dans ces fibroblastes de rongeurs, la perturbation de p53 ou de p16 est suffisante pour empêcher l'action de *ras*, autrement dit, aucune des deux n'était suffisante pour promouvoir l'arrêt du cycle. Ceci est un argument pour dire que p53 et p16 ne favorisent pas l'arrêt du cycle cellulaire par la même voie l'une de l'autre et, aux niveaux atteints, aucune des deux n'est suffisante pour promouvoir l'arrêt du cycle.

Il a été observé que l'arrêt induit par *ras* n'était pas immédiat mais intervenait environ 7 jours après. D'un point de vue phénotypique, il y a des similitudes entre cette OIS et la sénescence réplivative : la morphologie cellulaire est agrandie, la prolifération est arrêtée ; il est retrouvée une surexpression de PAI1, p16, p53, p21 et de cycline D1 ainsi qu'une activité SA-βGal et une diminution des taux de Rb hyperphosphorylée, de cycline A et d'activité kinase CDK2 (23).

OIS induite par l'oncogène BRAF V600E

La protéine mutée BRAF V600E est retrouvée dans 50% des mélanomes malins ainsi que dans de nombreux autres cancers chez l'homme à des fréquences plus faibles (43).

Les nævi sont des tumeurs très courantes, clonales et bénignes des mélanocytes cutanés et sont fréquemment porteurs de cette mutation V600E de BRAF. Cependant, malgré la nature oncogène de cette mutation, une phase initiale de croissance du nævus est généralement suivie d'un arrêt quasi complet de l'activité proliférative, qui se maintient pendant plusieurs décennies (44) .

L'expression de BRAF V600E dans des mélanocytes humains induit un arrêt du cycle cellulaire accompagnée de l'augmentation des taux de p16^{INK4a} et de β-galactosidase associée à la sénescence (SA-βGal), deux marqueurs de la sénescence. *In vivo*, les nævi congénitaux présentaient aussi des taux élevés de SA-βGal ; j'ai déjà mentionné que les nævi présentaient une diminution de la

prolifération. De plus, les nævi ne semblaient pas subir une attrition des télomères, ceci étant en faveur d'un processus de sénescence prématurée induite par l'oncogène, plutôt qu'une perte du potentiel réplicatif (44).

Il a été montré que d'autres oncogènes entraînaient une OIS, notamment E2F1, RAF, mos, cdc6 et la cycline E (45).

Mécanismes de mise en place de l'OIS

Il existe différents mécanismes qui vont courir à l'induction de la sénescence par les oncogènes.

La surexpression des oncogène RAS et BRAF entraîne la dissociation de BRCA1 de la chromatine, ce qui compromet la réparation des DSB et entraînera la sénescence (46).

Un autre mécanisme est appelé stress réplicatif : les oncogènes peuvent également induire des défauts de réplication de l'ADN et une réplication diminuée de l'ADN, ce qui entraîne l'accumulation de mutations et une instabilité génomique. Cela se manifeste sous diverses formes, la perturbation de la vitesse des fourches de réplication de l'ADN et/ou le décrochage de ces fourches. Ce stress réplicatif va induire l'expression de p53 notamment par le biais d'ATM (46). p53 va ensuite induire le CKI p21 ce qui protégera RB de la phosphorylation (Figure 13 évoquée précédemment).

Enfin, je citerai un troisième mécanisme : un RAS oncogénique induit une régulation à la hausse de NOX4-p22phox, ceci augmente les espaces réactives de l'oxygène au niveau intracellulaire et mitochondrial et entraîne des dommages oxydants à l'ADN (Figure 20), dont des SSB qui peuvent induire la sénescence par l'intermédiaire de p16 ainsi que des DSB induisant la voie DDR et l'activation de p53 (47) (46).

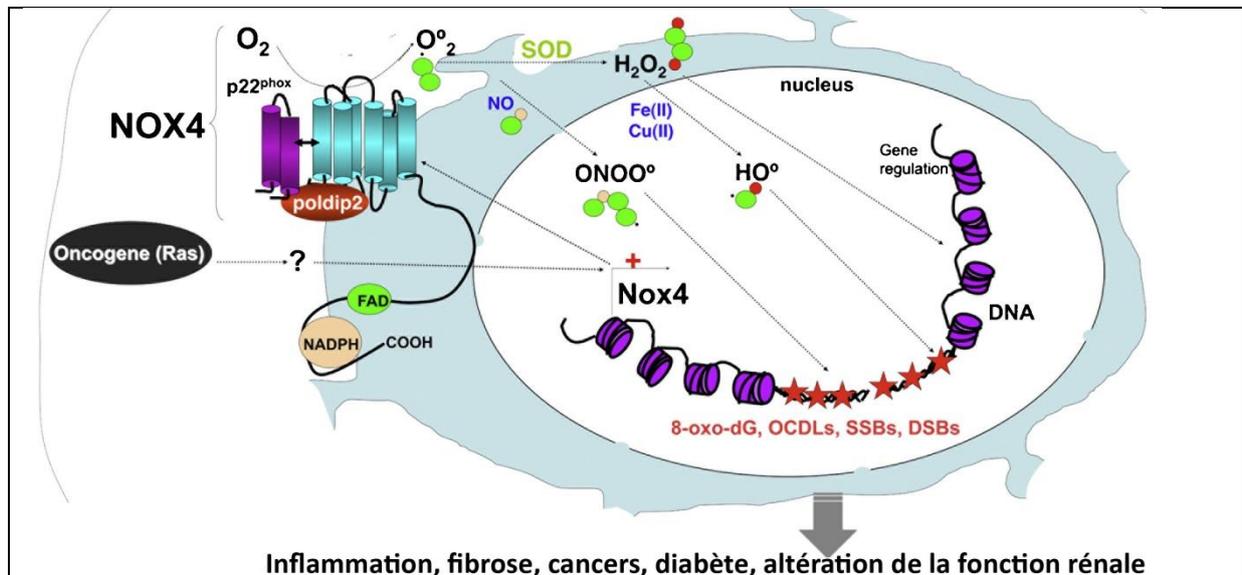


Figure 20 : Rôle des espèces réactives de l'oxygène dérivées de NOX4 dans les lésions de l'ADN induites par RAS.

Adapté de (47)

RAS active la NADPH oxydase NOX4, génératrice de ROS. En raison de sa localisation périnucléaire, NOX4 produit des ROS dans l'environnement nucléaire. Lorsque les ROS pénètrent dans le compartiment cellulaire nucléaire, ils interagissent avec l'ADN, créant des lésions telles que la 8-oxo-2'-déoxyguanosine (8-oxo-dG), des lésions oxydatives de l'ADN en grappe et, dans une certaine mesure, des cassures simple brin (SSB) et double brin (DSB) de l'ADN. Ces lésions peuvent altérer les fonctions cellulaires et conduire à des états pathologiques lorsque la capacité de réparation de l'ADN est dépassée ou en cas d'exposition chronique aux ROS et induire la sénescence. NOX4 semble être un médiateur de la génotoxicité par sa capacité à produire des ROS.

Les différents niveaux d'expression de RAS ou de ses effecteurs en aval entraînent des réponses différentes, allant de la prolifération à la sénescence cellulaire. Ainsi, une activation modérée oriente plutôt vers la prolifération mais, lorsque cette activation dépasse un seuil, cela oriente vers la sénescence ; dans ce cas, il peut, ultérieurement, apparaître un échappement de la sénescence et une évolution vers un carcinome (45).

La TIS ou sénescence induite par la thérapie

De même que l'OIS, la TIS pourrait être incluse dans la SIPS (stress induced premature senescence) ; en effet, il est possible de considérer l'action d'une

radiothérapie ou d'une chimiothérapie comme un stress sur la cellule. De plus, la TIS est aussi une sénescence prématurée. Il a été décidé de traiter séparément la TIS car elle apporte une perspective thérapeutique intéressante avec, potentiellement, des développements cliniques.

Inducteurs de TIS

Le traitement conventionnel du cancer, par radiothérapie ou chimiothérapie, induit une sénescence cellulaire, dénommée sénescence induite par la thérapie (TIS) (48) : à partir de 1999, il a été montré que les médicaments chimiothérapeutiques et l'irradiation aux rayons X utilisés pour le traitement du cancer induisaient la sénescence cellulaire dans plusieurs lignées de cellules tumorales humaines et un peu plus tard *in vivo*. De nombreux anti-cancéreux, le cisplatine, la doxorubicine, l'étoposide, le mitoxantrone, le paclitaxel, le témozolomide (49) induisent ainsi la sénescence *in vitro* et/ou *in vivo* (50).

Il a été montré de plus que certaines thérapies ciblées utilisant des médicaments inhibant les récepteurs à tyrosine kinase induisaient une TIS, e.g. le gefitinib inhibiteur de l'EGFR ou le bevacizumab qui cible le VEGF (6).

Les inhibiteurs de PARP (poly ADP-Ribose Polymerase), comme l'olaparib peuvent dans certaines lignées induire une TIS (51).

Mécanismes d'induction de la TIS

La majorité des agents induisant la TIS sont soit destinés à infliger des dommages directs à l'ADN, soit à modifier directement le paysage de l'ADN en termes de structure et de fonction (52). Ainsi, la doxorubicine provoque des cassures de l'ADN double brin (DSB) en empoisonnant la topoisomérase de type II et en endommageant directement l'ADN. D'où l'activation de la voie p53-p21-RB.

Pour un certain nombre d'inducteurs de TIS, notamment les radiations ionisantes, la streptozotocine (47) et l'hydroxyurée (53), le stress oxydant généré par une sur-régulation de NOX4 est impliqué de façon similaire à la sénescence cellulaire induite par RAS précédemment décrite (Figure 20). Il est notable que, au moins dans le cas de l'irradiation, cette induction de sénescence est indépendante de la voie DDR/p53 et passe par l'augmentation de l'expression de p16 (54).

Comme l'olaparib sera évoqué à nouveau ci-dessous dans les perspectives thérapeutiques (paragraphe « Le traitement du cancer ovarien de haut grade par l'olaparib »), je vais m'attarder plus longuement sur son mécanisme d'action.

Les PARP 1,2 sont nécessaires à la réparation efficace des cassures simple brin de l'ADN ; après la modification de la chromatine, la PARP s'automodifie et va décompacter la chromatine pour faciliter l'accès aux enzymes nécessaires à la réparation des SSB, notamment XRCC1. Quand l'olaparib est lié au site actif de la PARP associée à l'ADN, il empêche la dissociation de la PARP et la piège sur l'ADN, bloquant ainsi le processus de réparation. Dans les cellules en réplication, cela conduit à des cassures double brin (DSB) de l'ADN quand les fourches de réplication rencontrent l'adduit PARP-ADN. Dans les cellules normales, la voie de réparation par recombinaison homologue (HDR : Homologous directed repair) est efficace pour réparer ces DSB de l'ADN. Dans les cellules cancéreuses ne présentant pas des composants fonctionnels essentiels pour une HDR efficace tels que BRCA1 ou 2, les DSB de l'ADN ne peuvent pas être réparés fidèlement ou efficacement, conduisant à une déficience de la recombinaison homologue (HDR) importante. À la place de cela, des voies alternatives et sujettes à l'erreur sont activées, comme la voie classique de jonction des extrémités non homologues (NHEJ : Non Homologous End Joining), conduisant à un degré élevé d'instabilité génomique. Après un certain nombre de cycles de réplication, l'instabilité génomique peut atteindre des niveaux trop importants et entraîner la mort des cellules cancéreuses, étant donné que les cellules cancéreuses ont déjà une quantité élevée d'ADN endommagé par rapport aux cellules normales. L'absence de voie HDR totalement fonctionnelle est l'un des déterminants clés de la sensibilité au platine dans le cancer de l'ovaire. Sur des modèles *in vivo* ayant un déficit des gènes BRCA1/2, l'olaparib donné après un traitement par platine a entraîné un retard dans la progression tumorale et une augmentation de la survie globale en comparaison au traitement par platine seul (55).

Un autre mécanisme d'induction de la sénescence par l'olaparib a été établi *in vitro*: comme il a été présenté dans la voie SSBR, PARP1 est la principale protéine senseur des SSB ; elle est à l'origine de la voie SSBR ; une diminution de l'expression de PARP1 empêche la réparation de ces SSB; la présence de ces SSB non réparés va augmenter l'expression du CKI p16 ce qui va induire la sénescence (12).

Devenir des cellules sénescents dans une TIS

Il a souvent été noté que la dose de chimio ou radiothérapie utilisée entraînait des destins cellulaires différents : une dose faible de médicament orientait vers la sénescence alors qu'une dose plus élevée orientait préférentiellement vers

l'apoptose. Il a aussi été montré que la surexpression de BCL2 pouvait orienter vers la sénescence en bloquant l'apoptose (50) : je signale ce dernier point car il y a actuellement des BH3 mimétiques, inhibiteurs des protéines anti apoptotiques de la famille BCL-2 qui sont testés comme sénolytiques c'est-à-dire comme molécules qui lysent les cellules sénescents ; je reviendrai plus tard sur ce point.

La TIS est-elle bénéfique ou non, notamment dans le cadre du traitement des cancers ? De plus en plus d'études pré cliniques montrent que les chimiothérapies et les radiothérapies provoquent l'accumulation de cellules sénescents à la fois dans les tumeurs et les tissus normaux. Dans les tumeurs, ces cellules sénescents peuvent, paradoxalement, favoriser la récurrence tumorale, les métastases et la résistance au traitement, en partie à cause du p. En outre, dans les tissus sains, ces cellules sénescents peuvent contribuer à certains des effets secondaires observés dans ces thérapies (56).

Caractéristiques des cellules sénescents et identification de marqueurs

La mise en place de la sénescence va modifier les propriétés de la cellule.

Les cellules sénescents présentent plusieurs propriétés communes que nous allons décrire maintenant. Certaines de ces caractéristiques pourront être utilisables comme marqueurs pour identifier les cellules sénescents *in vivo*, mais aucun marqueur n'est totalement spécifique(57) (58).

Un profil sécrétoire différent : le SASP ou Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence

Je vais commencer par décrire une des caractéristiques importantes des cellules sénescents : leur profil sécrétoire différent de celui des mêmes cellules en prolifération.

Les composants du SASP

Les cellules sénescents subissent une reprogrammation (59) et vont sécréter de nombreux facteurs, notamment des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires, des modulateurs de croissance, des facteurs angiogéniques et des métalloprotéinases matricielles (MMP), l'ensemble de ces facteurs est désigné par le phénotype sécrétoire associé à la sénescence ou SASP (Tableau 1).

Tableau 1: **Composants du phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP)** tiré de (60)

Classe	Composant
Interleukines	IL-6 ; IL-7 ; IL-1 ; IL-1b ; IL-13 ; IL-15
Chimiokines	IL-8 ; GRO-a, -b, -g ; MCP-2 ; MCP-4 ; MIP-1a ; MIP-3a ; HCC-4 ; eotaxine ; eotaxine-3 ; TECK ; ENA-78 ; I-309 ; I-TAC
Autres molécules inflammatoires	TGFβ ; GM-CSE ; G-CSE ; IFN-γ ; BLC ; MIF
Facteurs de croissance ; régulateurs de facteurs de croissance	Amphireguline ; épireguline ; hereguline ; EGF ; bFGF ; HGF ; KGF (FGF7) ; VEGF ; angiogénine ; SCF ; SDF-1 ; PlGF ; NGF ; IGFBP-2, -3, -4, -6, -7
Protéases et régulateurs de protéases	MMP-1, -3, -10, -12, -13, -14 ; TIMP-1 ; TIMP-2 ; PAI-1, -2 ; tPA ; uPA ; cathepsine B
Récepteurs ; ligands	ICAM-1, -3 ; OPG ; sTNFR1 ; sTNFR2 ; TRAIL-R3 ; Fas ; uPAR ; SGP130 ; EGF-R
Molécules non protéiques	PGE2 ; oxyde nitrique ; ROS
Facteurs insolubles	Fibronectine ; collagènes ; laminine

Les effets du SASP(59)

Le SASP a de nombreux effets pathophysiologiques :

- * Le SASP renforce et propage la sénescence de manière autocrine et paracrine
- * Le SASP active les réponses immunitaires qui éliminent les cellules sénescents
- * Le SASP intervient dans la sénescence développementale, la cicatrisation des plaies et la plasticité tissulaire.
- * Le SASP est un facteur important dans l'inflammation chronique persistante (appelée inflammaging). A ce titre, le SASP peut expliquer certains des effets délétères et pro-vieillessement des cellules sénescents.
- * Le SASP peut stimuler la tumorigenèse en recrutant des cellules myéloïdes immatures immunosuppressives dans les tumeurs de la prostate et du foie et en favorisant l'angiogenèse et les métastases, en favorisant la transition épithélio-

mésenchymateuse, en induisant des caractéristiques habituellement typiques de cellules souches (« stemness »), en stimulant la prolifération des cellules pré-néoplasiques et cancéreuses, notamment par des facteurs de croissance tels que l'IL6 (61).

Modulation du SASP

Je donnerai un exemple de modulation du SASP : celui de la signalisation mTOR qui favorise la traduction de l'IL-1A et de la protéine kinase activée par des agents mitogènes MAPKAPK2, en réponse à de multiples stimuli de stress (cytokines, rayonnements ultraviolets et ionisants, ROS, ...). Récemment, il a été montré que, dans un environnement stressant de type TIS, la voie PI3K/Akt/mTOR était responsable de la reprogrammation cellulaire vers un SASP soutenu (62). L'inhibition de mTOR par la rapamycine réprime fortement le SASP des cellules sénescents et retarde la sénescence des cellules traitées.

D'autres facteurs de transcription tels que NF- κ B, C/EBP β , GATA4 ou la voie de signalisation p38 MAPK vont aussi moduler le SASP (59)

Une partie de la recherche actuelle est faite en direction de médicaments ou de produits qui pourraient modifier le caractère « agressif » du SASP, vers un SASP plus « modéré » ; la rapamycine a cette capacité, la metformine aussi (63) ; les composés de ce type sont appelés les sénomorphiques.

En conclusion sur le SASP, sa composition et sa force varient considérablement, selon la durée de la sénescence, l'origine du stimulus pro-sénescence et le type de cellule (64) .

L'arrêt de prolifération

L'arrêt de prolifération n'est pas spécifique des cellules sénescents. En effet, de nombreuses cellules *in vivo* sont différenciées en phase terminale ou quiescentes sans être sénescents (58). Mais l'arrêt de prolifération est bien présent dans nos cellules sénescents ; les marqueurs utilisés pour mettre en évidence cet arrêt pourront être l'absence de Ki67, Ki67 étant un marqueur de prolifération (65), la présence de p16 et la présence de p21.

La protéine p16 est fortement corrélée à l'âge (66) (67) (68) chez de nombreux rongeurs et dans de nombreux tissus humains (69) et elle est aussi retrouvée dans certaines cellules tumorales à des niveaux élevés. p16 n'est généralement pas exprimée par les cellules quiescentes ou différenciées en phase terminale.

Résistance à l'apoptose

Une autre caractéristique fondamentale des cellules sénescents est la résistance à l'apoptose (65), ainsi une survie accrue, notamment dans les fibroblastes et les kératinocytes sénescents, a été observée. Les mécanismes à l'origine de cette résistance sont variés, pas encore entièrement découverts et ont reçu la dénomination de SCAPs ou senescent cell anti-apoptotic pathways. Je vais nommer certains acteurs intervenant dans ces voies anti-apoptotiques.

* p21 joue un rôle dans le maintien de la viabilité des cellules sénescents.

* Le côté inflammatoire du SASP, par l'action d'IL-6, d'IL-8, d'IL-1 et du TNF α contribue à renforcer l'arrêt de croissance via la signalisation autocrine NF- κ B et la génération de ROS. Cependant, l'activation de NF- κ B peut également promouvoir des réponses de survie par l'induction transcriptionnelle de protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2, souvent surexprimées dans les cellules sénescents, notamment BCL2 elle-même. Il est notable d'ailleurs que les anti-BCL2 font actuellement partie des candidats pharmacologiques pour lysier les cellules sénescents.

* Un autre composant du SASP, l'IGF1, peut, dans les contextes tumoraux, être absorbé par les cellules cancéreuses environnantes et être responsable de certains des effets pro-tumoraux des cellules sénescents. Ce facteur de croissance peut aussi favoriser la survie des cellules sénescents. Le mécanisme est le suivant : l'IGF-1 se lie au récepteur tyrosine kinase (TKR) IGF1R et entraîne la régulation à la hausse de la voie PI3K/AKT. Il a été montré que l'inhibition d'IGF-1 retarde la sénescence des cellules en prolifération, tout en induisant l'apoptose des fibroblastes sénescents (65).

Ce paragraphe sur la résistance à l'apoptose m'a permis de mentionner pour la première fois certaines molécules qui agissent en lysant les cellules sénescents, aussi appelées **sénolytiques**.

La β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β -gal)

Le marqueur de sénescence le plus utilisé (70) est la **β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β -gal)** ; mais elle n'est ni nécessaire ni suffisante pour affirmer la sénescence (71) (72). Il a été montré que le vieillissement cellulaire (et donc la sénescence) était corrélé avec des lysosomes hypertrophiés et donc contenant une plus grande quantité de β -galactosidase mais que l'activité de cette enzyme β -

galactosidase lysosomale était, de plus, augmentée. Il existe, par contre, des possibilités de faux positifs avec ce bio-marqueur. Ainsi, il est possible d'avoir une coloration faussement positive des macrophages (73) . Certains tissus de l'embryon semblent aussi se colorer positivement pour SA- β -gal sans exprimer d'autres marqueurs clés de sénescence tels que p21 (74).

La diminution de la lamine B1

La diminution de la **lamine B1** semble être un bon biomarqueur général de la sénescence (75).

La surface interne de l'enveloppe nucléaire est tapissée d'une lamina, qui contribue à la taille, à la forme et à la stabilité du noyau ainsi qu'à l'organisation de la chromatine. Les principales protéines structurales de la lamina sont les lamines nucléaires, qui sont des filaments intermédiaires de type V dont la taille varie de 60 à 80 kDa. Les lamines sont classées en type A (lamine A, C) ou type B (lamine B1, B2) en fonction de leurs points isoélectriques. La lamina est une structure dynamique car chaque fois qu'une cellule entre en mitose, elle est désassemblée puis réassemblée au cours du cycle cellulaire suivant.

La lamine B1 est nécessaire à une bonne organogenèse et à la survie de l'organisme : les souris dépourvues d'un gène LMNB1 fonctionnel meurent quelques minutes après la naissance, et les fibroblastes de ces souris ont des noyaux déformés et subissent une sénescence prématurée en culture.

La lamine B1 diminue rapidement lorsque les cellules sont induites en sénescence par de multiples moyens. La diminution de la lamine B1 est une caractéristique de la sénescence dans plusieurs souches cellulaires de fibroblastes humains et murins et après des dommages aigus à l'ADN qui entraînent la persistance de cellules sénescents *in vivo*.

La diminution de la lamine B1 se produit rapidement (2 jours) après exposition à un stimulus induisant la sénescence et n'est pas une caractéristique générale de l'arrêt du cycle cellulaire, car les cellules quiescentes conservaient des niveaux de lamine B1 égaux à ceux des cellules proliférantes. Fait intéressant, la perte de lamine B1 n'a pas été empêchée par l'inhibition des voies qui contrôlent de nombreux autres aspects de la sénescence, tels que le SASP. Ainsi, la diminution de la lamine B1 était indépendante de la voie p38 MAPK/NF- κ B, de la voie DDR et de la signalisation ROS. Cependant, la diminution de la lamine B1 a été fortement induite soit par

l'activation directe de p53, soit par l'expression directe de p16^{INK4a}. Parce que presque tous les inducteurs de sénescence dépendent fortement des voies p53 ou p16^{INK4}, la perte de la lamine B1 pourrait servir de marqueur de sénescence général dans d'autres contextes et types de cellules (75).

Les SAHF (senescence-associated heterochromatin foci)

La sénescence cellulaire est également caractérisée par la présence d'altérations de la structure chromatinienne : la plupart des cellules sénescents présentent des régions caractéristiques avec de l'hétérochromatine condensée connues sous le nom de foyers hétérochromatiques associés à la sénescence (SAHF). Les SAHF sont particulièrement enrichis en histone 3 triméthylée sur la lysine 9 (H3K9me3). Cette triméthylation est médiée par la H3K9 Méthyltransferase Suv39h1 (76). Les SAHF agissent en réprimant plusieurs gènes régulés par E2F impliqués dans la progression du cycle cellulaire et sont induits par des mécanismes impliquant l'activation de p53 et p16 (6).

Perspectives thérapeutiques

Tout d'abord, je vais présenter de façon très générale le lien entre la sénescence et de nombreuses pathologies

La sénescence en physiopathologie

Il a été montré qu'il y a une accumulation progressive des cellules sénescents avec l'âge. De plus, cette accumulation est encore plus forte dans les tissus associés à des pathologies. Ainsi, il a été montré que les cellules sénescents sont associées au développement de diverses maladies liées à l'âge telles que l'athérosclérose, l'arthrose, l'ostéoporose, la neurodégénérescence, le cancer, les maladies rénales chroniques, le diabète de type II et le diabète de type I (77) (Figure 21).

Il a aussi été démontré que, chez l'homme, les cellules sénescents étaient plus importantes dans les tissus associés à certaines maladies chroniques telles que le diabète de type II ainsi que le diabète de type I (78), ainsi que dans les tissus néoplasiques et malins (79).

De plus, dans des modèles murins, il a été démontré que le SASP est impliqué dans la pathogenèse de plusieurs maladies liées à l'âge, telles que l'athérosclérose, la bronchopneumopathie chronique obstructive, l'arthrose, la maladie d'Alzheimer, la sarcopénie, la dégénérescence maculaire liée à l'âge, les cataractes, la glomérulosclérose, l'hypertrophie des cardiomyocytes et la lipodystrophie (80). Le

rôle de la sénescence dans certaines pathologies a déjà été élucidé expérimentalement dans des modèles murins de fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) (81) et de stéatose hépatique (82).

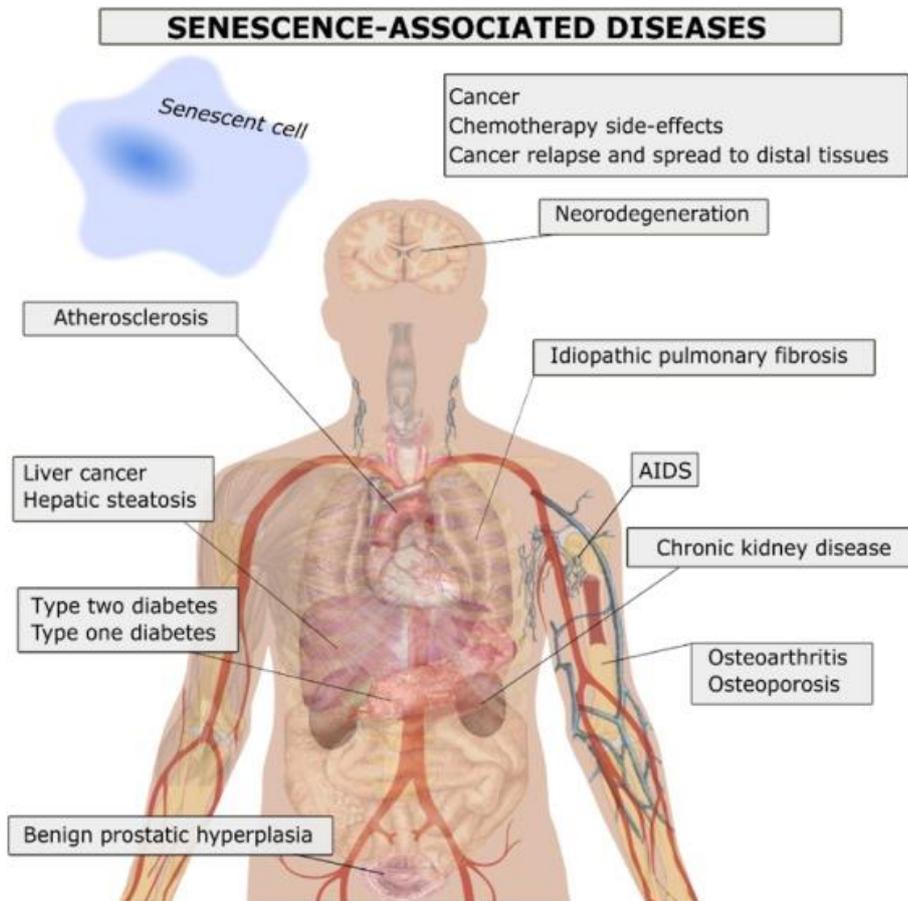


Figure 21 : Représentation schématique de la distribution des maladies liées à l'âge et d'autres pathologies dans l'organisme où les cellules sénescents jouent un rôle important dans leur développement (77).

Ce lien important entre la sénescence cellulaire et de nombreuses pathologies amène à se poser la question d'un potentiel thérapeutique de ce concept de cellules sénescents : y a-t-il un impact positif à leur élimination ou à leur reprogrammation par une méthode interventionnelle (pharmacologique notamment) ?

Des résultats récents (pré cliniques et cliniques) ont été publiés. Je vais maintenant en détailler certains.

Premiers résultats pré cliniques par l'équipe de Baker, publiés en 2011(69) :

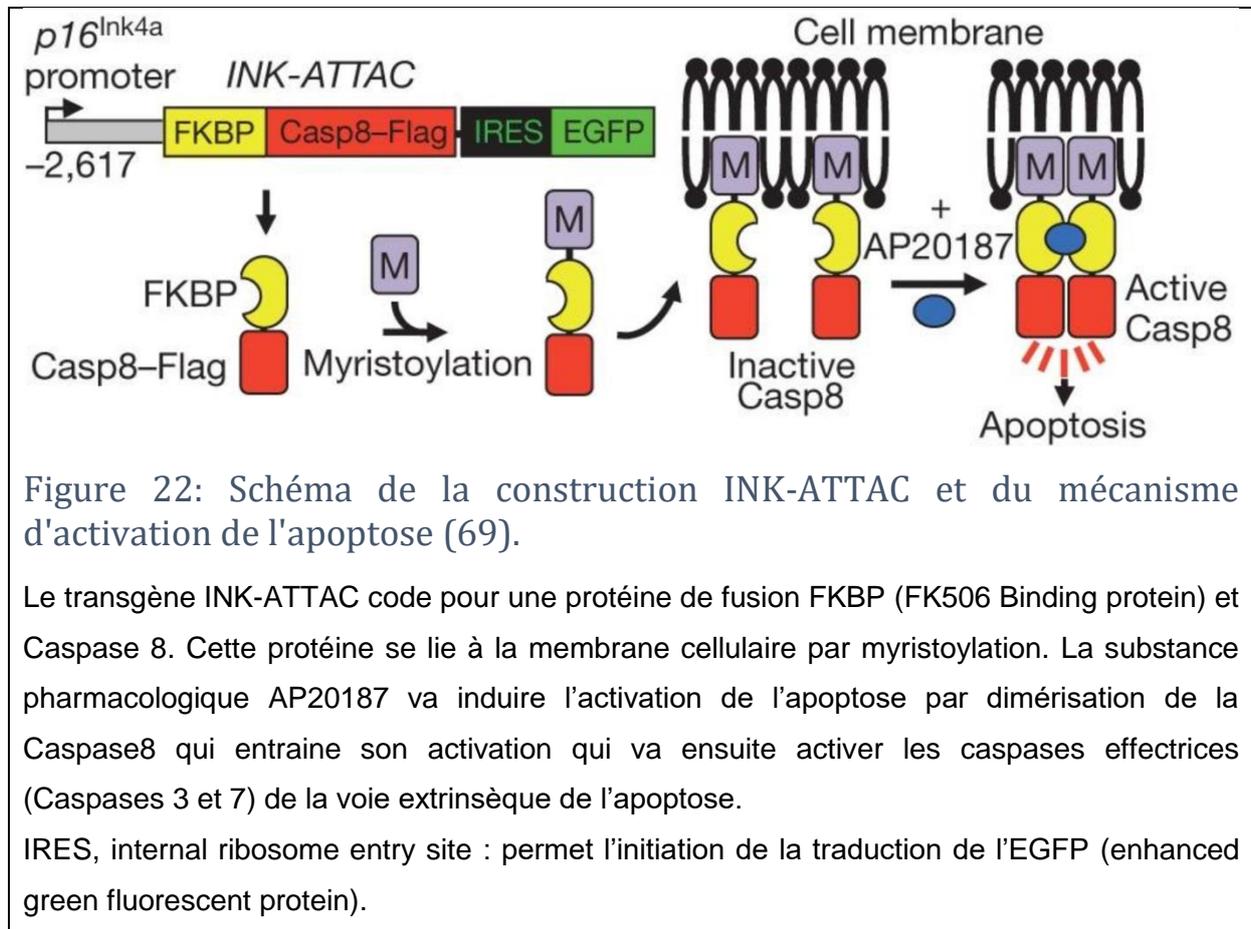
Le premier résultat important est celui obtenu par l'équipe de Baker publié en 2011.

Modèle de souris BubR1^{H/H} INK-ATTAC

Les auteurs ont travaillé avec des souris progéroïdes BubR1^{H/H} (hypomorphes pour BubR1) ; ces souris ont une durée de vie considérablement raccourcie et présentent une variété de phénotypes liés à l'âge, notamment l'infertilité, la lordose-cyphose, la sarcopénie, les cataractes, la perte de graisse, les arythmies cardiaques, le raidissement de la paroi artérielle, la cicatrisation altérée et l'amincissement du derme. Il a été proposé que BubR1 soit un déterminant du vieillissement naturel, car les niveaux de BubR1 diminuent nettement avec l'âge. Les souris BubR1^{H/H} accumulent sélectivement des cellules p16^{Ink4a} positives dans certains tissus dans lesquels se développent des pathologies liées à l'âge, dont le tissu adipeux, le muscle squelettique et l'œil. L'inactivation de p16^{Ink4a} chez ces souris est connue pour retarder sélectivement l'apparition de phénotypes liés à l'âge dans ces tissus.

Clairance inductible des cellules sénescences

Le principe de leur expérience est le suivant : il s'agit d'une modification transgénique des souris BubR1^{H/H} pour pouvoir tuer par apoptose de façon inductible les cellules sénescences. Pour cela, les auteurs ont introduit un transgène nommé INK-ATTAC qui code pour une protéine de fusion FK506-binding-protein-Casp8 (FKBP-Casp8). La caspase 8 ou Cysteine dependant Aspartate directed proteASE 8 est une caspase initiatrice ; elle va activer les caspases effectrices (3 et 7) qui vont amener à l'apoptose. La caspase 8 est impliquée dans l'apoptose par la voie extrinsèque, déclenchée par les récepteurs de mort, et non par la voie intrinsèque. Ce gène codant pour FKBP-Casp8 a été placé sous le promoteur suivant : un fragment de 2161 pb du promoteur du gène p16^{Ink4a} qui est transcriptionnellement actif dans les cellules sénescences, mais pas non sénescences. L'administration d'une substance pharmacologique, AP20187, induit la dimérisation de la protéine de fusion qui est liée à la membrane par myristoylation (Figure 22). Il a été vérifié que ce modèle fonctionne *in vitro* et *ex vivo*, que la protéine INK-ATTAC est bien exprimée dans les cellules sénescences, en corrélation avec p16 ainsi que d'autres marqueurs de sénescence (p21, p19, Pai1, IL-6, Igfbp2, Mmp13, Mmp3).



Résultats lorsque le traitement démarre au sevrage

Les cohortes de souris transgéniques $BubR1^{H/H}$ INK-ATTAC ont été soit traitées avec AP20187 tous les trois jours à partir de l'âge de 3 semaines, soit non traitées.

Il n'y a pas eu d'effets secondaires manifestes de la clairance des cellules sénescentes dans ce modèle.

Les souris des lignées $BubR1^{H/H};INK-ATTAC$ traitées présentaient un retard substantiel d'apparition de la lordocyphose (une mesure de l'apparition de la sarcopénie dans ce modèle) et des cataractes par rapport aux souris non traitées.

Par ailleurs, lors des tests d'exercice sur tapis roulant, la durée de l'exercice, la distance parcourue et la quantité globale de travail effectuée étaient toutes significativement augmentées chez les animaux traités avec AP20187, indiquant la préservation de la fonction musculaire.

Résultats lorsque le traitement démarre plus tard dans la vie

Pour étudier l'effet de la clairance des cellules sénescents plus tard dans la vie lorsque des phénotypes liés à l'âge sont apparents chez les souris *BubR*^{H/H}, les auteurs ont commencé le traitement AP20187 des souris *BubR1*^{H/H}; *INK-ATTAC* à 5 mois au lieu de l'âge de sevrage, 3 semaines, et mesuré à l'âge de 10 mois les phénotypes liés à l'âge et dépendants de p16.

Ces souris traitées à partir de 5 mois, lorsqu'elles ont atteint 10 mois, ont été comparées aux souris non traitées âgées de 5 mois ; cette comparaison a montré que le traitement atténue la progression des déclinés liés à l'âge mais ce n'est pas un renversement du vieillissement.

Conclusion :

La clairance des cellules sénescents exprimant p16^{Ink4a} à la fois dès le sevrage et plus tard dans la vie retarde sélectivement les pathologies liées à l'âge dans les tissus qui accumulent ces cellules.

Limites de l'étude

Les phénotypes liés à l'âge des souris *BubR1*^{H/H} qui surviennent de manière indépendante de p16^{Ink4a}, tels que les arythmies cardiaques et le raidissement de la paroi artérielle, n'ont pas été atténués chez les souris *BubR1*^{H/H}; *INK-ATTAC* traitées par AP20187. Ceci était en corrélation avec le manque d'induction *INK-ATTAC* dans le cœur et l'aorte. Selon les auteurs, l'insuffisance cardiaque est vraisemblablement la principale cause de décès chez les souris *BubR1*^{H/H}, ce qui pourrait expliquer pourquoi la survie globale des souris *BubR1*^{H/H}; *INK-ATTAC* ne diffère pas significativement qu'elles soient traitées ou non avec AP20187.

Par ailleurs, le travail a été effectué avec une lignée très particulière de souris progéroïdes, ce qui limite fortement l'universalité des résultats obtenus.

La suite des travaux de Baker *et al.* publiée en 2016

L'équipe de Baker travaille cette fois sur des souris de deux lignées communes : C57BL/6-129Sv-FVB et C57BL/6J. La technique est la même que celle utilisée pour les travaux de 2011 : introduction du transgène *INK-ATTAC*, ceci pour induire, similairement, par injection d'AP20187 deux fois par semaine à partir de l'âge d'un an, l'apoptose dans les cellules de souris de type sauvage exprimant p16 (83).

La clairance des cellules p16^{Ink4a}-positives a retardé la tumorigenèse et atténué la détérioration liée à l'âge de plusieurs organes sans effets secondaires apparents, notamment les reins, le cœur et la graisse, où la clairance a préservé la fonctionnalité des glomérules, des canaux cardio-protecteurs K_{ATP} et des adipocytes, respectivement.

Résultat important, ils montrent que, par rapport au véhicule seul, le traitement AP20187 a prolongé la durée de vie médiane chez les souris mâles et femelles de deux origines génétiques distinctes.

En conclusion, les travaux de Baker *et al.* ont donc été les tous premiers résultats prometteurs, avec ce premier travail sur des souris progéroïdes transgéniques publié en 2011 puis cette suite avec des souris transgéniques de lignée commune publiée en 2016.

La recherche de sénolytiques

Contexte historique

Il y a eu un certain nombre d'avancées depuis les travaux de Baker et al. en 2011. Ces avancées ont notamment été permises par la recherche puis la découverte et maintenant l'utilisation de sénolytiques, i.e. des substances qui vont lyser les cellules sénescents ; ces substances peuvent être des médicaments avec une AMM déjà présente (le dasatinib, le vénétoclax, la rapamycine) ou des substances nouvelles en cours d'évaluation (le navitoclax) ou des suppléments naturels (quercétine, fisétine notamment). La toxicité de ces molécules étant parfois déjà étudiée, encadrée et disponible, il a ainsi pu être lancé rapidement des essais cliniques avec de petits effectifs sur des durées assez courtes et qui montrent que le potentiel thérapeutique est bien présent et commence à être documenté.

Une des pistes a été de cibler l'aspect anti-apoptotique des cellules sénescents ; les sénolytiques pourront agir en facilitant l'apoptose des cellules sénescents induite par leur propre SASP ; ils ne cibleront pas l'expression de p16, par exemple.

La recherche de molécules capables de lyser spécifiquement les cellules sénescents a été la suivante (84) : l'analyse des transcrits des cellules sénescents versus cellules non sénescents a montré une expression accrue des réseaux pro-survie dans les cellules sénescents, correspondant à leur résistance à l'apoptose. Ensuite, des siRNA ciblant les nœuds de ce réseau ont permis de révéler des cibles intéressantes : les ligands de l'ephrine EFNB1 et EFNB3, l'inhibiteur 1A de la kinase

dépendant de la cycline ou CDKN1A ou p21, l'inhibiteur 2 activé par le plasminogène (PAI-2), la sous-unité catalytique delta de la phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3KCD) qui fait partie de la famille PI3K impliquée dans la régulation de multiples fonctions cellulaires, y compris la survie, et BCL-xL, qui régule l'apoptose dépendante des mitochondries et est la cible de certains médicaments anticancéreux. Le silencing de ces cibles par siRNA a permis de tuer les cellules sénescents, mais pas les cellules différenciées en prolifération ou quiescentes.

Puis il a été recherché des molécules pharmacologiques ciblant ces mêmes facteurs.

Le dasatinib

Le dasatinib est un inhibiteur multiple de kinases, notamment BCR/ABL c-KIT, PDGFR et les kinases de la famille SRC telles que SRC, LCK, HCK, YES et FYN(85) ; il est notamment utilisé pour le traitement des cancers, notamment la leucémie myéloïde chronique Phi+ et la LAL Phi+ de l'enfant. Il est connu pour interférer avec la suppression de l'apoptose dépendante de l'EFNB (84).

In vitro, le dasatinib a réduit de manière préférentielle la viabilité et provoqué la mort cellulaire des préadipocytes humains sénescents, mais a été beaucoup moins efficace sur les cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale sénescents. Au 3^{ème} jour, le taux de préadipocytes en prolifération était à peu près stable alors que le taux de préadipocytes sénescents diminuait de 30 à 40% (84).

La quercétine

La quercétine est le flavonoïde le plus abondant que l'on trouve dans les fruits, les légumes et les boissons telles que le thé et le vin rouge (86). Elle fonctionne comme un double inhibiteur de mTOR et de PI3K. En outre, elle peut cibler plusieurs voies pro-survie, par exemple Wnt/ β -caténine, dont l'activation est liée à l'action de PI3K/AKT/mTOR via la Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3), et STAT3 qui est également interconnecté avec PI3K.

In vitro, la quercétine était efficace contre les cellules endothéliales humaines (84) et les cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse sénescents murines.

L'association du dasatinib et de la quercétine a été efficace pour éliminer les fibroblastes embryonnaires murins sénescents.

Je vais maintenant faire un saut dans le temps et dans le type d'étude pour passer de l'étude de Baker et al. sur des souris progéroïdes qui sont modifiées génétiquement, publiée en 2011 à l'étude d'Hickson et al. publiée en 2019, étude clinique sur 7 femmes et 2 hommes souffrant de néphropathie diabétique qui ont pris des sénolytiques (dasatinib + quercétine) pendant 3 jours.

Des résultats cliniques avec les travaux d'Hickson et al. publiés en 2019

Contexte historique

Je vais replacer cette étude par Hickson dans son contexte historique : le tout premier essai clinique utilisant des sénolytiques a vu ses résultats publiés en janvier 2019 par l'équipe de Justice et al. (87); c'était une étude courte incluant 14 patients souffrant de fibrose pulmonaire idiopathique (FPI), traités par dasatinib (100 mg/jour) + quercétine (1250 mg/jour) 3 jours par semaine pendant 3 semaines. Il avait résulté une amélioration significative de la fonction physique chez ces patients. Les fonctions pulmonaires ne présentaient pas d'amélioration significative mais cela peut être dû à la courte durée de l'essai clinique. Ainsi, lors d'études pré cliniques dans des modèles murins de FPI, l'amélioration significative de la fonction pulmonaire était précédée de l'amélioration de la fonction physique. Cet essai montre le potentiel du dasatinib couplé à la quercétine chez des patients atteints d'une maladie progressive irréversible et fatale sans traitement efficace à ce jour, la fibrose pulmonaire idiopathique, ouvrant la voie à des essais plus longs avec un effectif plus important (88).

Rationnel pour l'étude d'Hickson et al.

Le rationnel pour l'utilisation de sénolytiques chez ces patients diabétiques s'appuie sur l'accumulation de cellules sénescents dans les tissus avec l'âge, en particulier le tissu adipeux ; ces cellules sécrètent le SASP qui possède une composante pro-inflammatoire favorisant la mort des cellules non sénescents (87).

La néphropathie diabétique est la cause la plus fréquente d'insuffisance rénale au stade terminal et elle est caractérisée par un fardeau de cellules sénescents augmenté (89).

Les études pré cliniques montrent que le dasatinib couplé à la quercétine désactive temporairement les voies pro-survie qui défendent les cellules sénescents contre

leur propre environnement pro apoptotique et éliminent sélectivement les cellules sénescents chez des souris vieillissantes ou résistantes à l'insuline (87).

L'étude clinique (87)

Elle inclut 9 patients atteints de néphropathie diabétique. C'est un traitement « hit and run » : traitement oral pendant 3 jours avec dasatinib 100 mg 1 fois par jour et quercétine 1000 mg au total par jour (500 mg deux fois par jour).

L'expression de p16^{INK4A} et p21^{CIP1} ainsi que l'activité SA-βgal ont été utilisées comme marqueurs de cellules sénescents.

Les marqueurs clés de la charge cellulaire sénescents ont diminué dans le tissu adipeux et la peau biopsiée des sujets 11 jours après la fin du traitement de 3 jours de D + Q, tout comme les principaux facteurs SASP circulants (IL-1α, -2, -6 et -9 et MMP-2, -9 et -12), par rapport à avant l'administration de ces médicaments sénolytiques.

Cet allègement du fardeau de cellules sénescents encore après 11 jours après la fin du traitement indique un effet soutenu de ces médicaments alors qu'ils n'étaient plus présents dans le corps, leurs demi-vies d'élimination étant inférieures à 11h. Ceci est cohérent avec le temps mesuré en culture supérieur à deux semaines nécessaire pour le développement de nouvelles cellules sénescents.

Les préadipocytes isolés à partir de biopsies obtenues 11 jours après la fin du traitement sénolytique avaient leur capacité de prolifération multiplié par 3, ce qui est cohérent avec, d'une part la diminution du nombre de cellules sénescents objectivées par l'utilisation des marqueurs sus nommés ainsi qu'avec le fait que les cellules isolées à partir de tissus de sujets âgés comportant davantage de cellules sénescents présentent un potentiel réplicatif réduit par rapport aux cellules isolées à partir de sujets plus jeunes (87).

C'est un des tous premiers essais cliniques ; il montre d'une part l'action sur le fardeau de sénescence et suggère qu'un régime de dosage intermittent peut être efficace chez l'être humain.

Perspectives thérapeutiques dans les traitements anti-cancéreux

Un autre domaine où le potentiel thérapeutique paraît prometteur est le couplage d'un sénolytique avec un traitement anti cancéreux. L'intérêt de l'utilisation de ce couplage avec un sénolytique repose sur les observations suivantes. L'arrêt de prolifération n'est pas irréversible pour toutes les cellules d'une population de cellules

cancéreuses présumées sénescents, et celles qui échappent à l'arrêt du cycle cellulaire sont susceptibles de contribuer à une rechute clinique du cancer (76). Cette échappée de l'arrêt de la prolifération peut se retrouver dans les TIS mais aussi dans les OIS (39). Dans ces exemples d'OIS, ces cellules « échappées » présentaient des altérations génomiques qui favorisaient l'évasion de la sénescence et un phénotype cancéreux agressif. Des preuves solides issues d'études sur des cultures de cellules primaires soutiennent l'idée que les cellules totalement sénescents pourraient retrouver une capacité proliférative tout en conservant certaines caractéristiques de la sénescence cellulaire. Tout cela pourrait être un mécanisme potentiel qui soutient les rechutes cliniques ; cela montre également que la TIS ou l'OIS peut évoluer vers un état dissocié qui combine une préservation partielle et une inversion partielle des phénotypes associés à la sénescence (39).

Je vais donc décrire l'étude *in vitro* de Rodier et al. publiée en 2019 (51) qui s'inscrit dans cette perspective.

Résultats *in vitro* de couplage chimiothérapie + sénolytique

Le traitement du cancer ovarien de haut grade par l'olaparib

L'olaparib a l'AMM pour l'indication suivante (55) : monothérapie pour traitement d'entretien des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire, récidivant et sensible au platine, avec une mutation du gène BRCA1/2.

Actuellement, le traitement d'entretien du cancer séreux ovarien de haut grade (CSOHG) par l'olaparib est majoritairement suivi par une récurrence assez rapide (90) ; la recherche de nouvelles thérapies combinées est en cours.

Sénolytique utilisé dans l'étude de Rodier et al. : le Navitoclax

Le navitoclax ou ABT-263 est un BH3 mimétique qui se lie puissamment au domaine BH3 des membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 (91), cela provoque le déplacement de la protéine pro-apoptotique à domaine BH3 uniquement, BIM, de BCL-2. BIM est alors libérée pour déclencher la libération de cytochrome c, à partir des mitochondries, provoquant l'apoptose des cellules.

Le navitoclax inhibe préférentiellement BCL-2 (B cell lymphoma 2), BCL-W et BCL-XL (extra large) qui sont tous trois anti apoptotiques. L'inhibition de BCL-XL induit un effet indésirable important : une thrombocytopénie.

Le navitoclax est encore en cours d'évaluation par les agences européenne et américaine.

Le navitoclax a une action sénolytique dans les cellules épithéliales sénescents de la veine ombilicale humaine mais pas dans les préadipocytes primaires humains (92).

Rationnel

Dans le modèle de cancer du sein utilisé, les cellules sénescents étaient impliquées dans la rechute du cancer et se propageaient aux tissus distaux après la chimiothérapie. L'élimination pharmacologique des cellules sénescents par l'utilisation du Navitoclax a amélioré l'activité physique et réduit la rechute du cancer chez les souris traitées avec la doxorubicine (49).

Résultats (51)

L'équipe de Rodier a travaillé *in vitro* sur des lignées cellulaires provenant de cancer séreux ovarien de haut grade (CSOHG). Ils ont montré les résultats suivants :

L'olaparib induit la sénescence dans ces lignées cellulaires CSOHG. Cette sénescence induite par l'inhibiteur de PARP est médiée par p21 et CHK2. Concernant le point de discussion sur la réversibilité ou l'irréversibilité de la sénescence, ils ont montré que cette TIS ou sénescence induite par la thérapie (en l'occurrence par l'olaparib) était réversible, à l'arrêt du traitement.

Enfin, point important, ils ont utilisé le navitoclax, sénolytique inhibiteur notamment de BCL2 et ont montré la synergie du navitoclax avec l'olaparib.

Discussion(51):

La sénescence réversible suite à l'arrêt de l'olaparib explique la repousse tumorale lors du retrait du médicament. Par ailleurs, l'environnement SASP induit par la TIS pourrait être pro-tumorigène.

L'intérêt potentiel est que l'olaparib, inducteur de sénescence, peut être couplé à un sénolytique afin de potentialiser les effets du traitement ; cette stratégie n'implique *a priori* pas d'effet indésirable supplémentaire provenant de dommages à l'ADN car le sénolytique serait utilisé de façon intermittente et donc sans induire de thrombopénie, effet indésirable grave du navitoclax.

Conclusion-Discussion

La sénescence a été décrite la première fois il y a plus de 60 ans : Hayflick a publié ses premiers papiers sur la sénescence répliquative (RS) en 1961. Les vingt dernières années ont vu une accélération des découvertes dans ce domaine : il y a eu, d'une part, la description de nouveaux sous-types de sénescence : la sénescence prématurée induite par le stress (SIPS), la sénescence induite par les oncogènes OIS), notamment *RAS*, et la sénescence induite par les thérapies (TIS), radiothérapies et chimiothérapies. Ce dernier sous type est retrouvé dans de nombreux exemples et l'implication de la TIS dans la réussite ou l'échec des thérapies anti-cancéreuses semble de plus en plus pertinente.

Un des intérêts majeurs du concept de sénescence et de cellules sénescents dans le contexte de TIS réside dans la possibilité d'éliminer ces cellules en espérant un bénéfice thérapeutique avec, *a priori*, des effets indésirables limités. Des premiers résultats pré-cliniques ont été publiés en 2011 par Baker et al. Dans cette continuité, il y a eu une recherche de médicaments et de produits sénolytiques, i.e. qui vont lyser préférentiellement les cellules sénescents. Cette recherche de sénolytiques est toujours en cours mais a déjà fourni quelques candidats : certains sénolytiques ont déjà fait l'objet de publication dans des essais cliniques avec de faibles effectifs depuis 2019.

De nouveaux essais cliniques sont actuellement en cours (93) et les perspectives d'adapter les traitements chimiothérapeutiques et/ou radiothérapeutiques actuels en y intégrant des sénolytiques sont en train d'émerger et pourraient améliorer les résultats thérapeutiques dans ces domaines.

Bibliographie

1. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 21 févr 2011;192(4):547-56.
2. Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiological Reviews.* 1 avr 2019;99(2):1047-78.
3. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* déc 1961;25:585-621.
4. Ott C, Jung T, Grune T, Höhn A. SIPS as a model to study age-related changes in proteolysis and aggregate formation. *Mechanisms of Ageing and Development.* 1 mars 2018;170:72-81.
5. d'Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature Reviews Cancer.* juill 2008;8(7):512-22.
6. Francica P, Aebersold DM, Medová M. Senescence as biologic endpoint following pharmacological targeting of receptor tyrosine kinases in cancer. *Biochemical Pharmacology.* 15 févr 2017;126:1-12.
7. Mirman Z, de Lange T. 53BP1: a DSB escort. *Genes Dev.* 1 janv 2020;34(1-2):7-23.
8. von Zglinicki T, Saretzki G, Ladhoff J, d'Adda di Fagagna F, Jackson SP. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev.* janv 2005;126(1):111-7.
9. Caldecott KW. DNA single-strand break repair and human genetic disease. *Trends in Cell Biology* [Internet]. 26 mai 2022 [cité 15 juill 2022]; Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0962892422001155>
10. Hanzlikova H, Kalasova I, Demin AA, Pennicott LE, Cihlarova Z, Caldecott KW. The Importance of Poly(ADP-Ribose) Polymerase as a Sensor of Unligated Okazaki Fragments during DNA Replication. *Mol Cell.* 19 juill 2018;71(2):319-331.e3.
11. Cleaver JE. Profile of Tomas Lindahl, Paul Modrich, and Aziz Sancar, 2015 Nobel Laureates in Chemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 janv 2016;113(2):242-5.
12. Goy E, Abbadie C. Sénescence et cancer - Double jeu. *Med Sci (Paris).* 1 mars 2018;34(3):223-30.
13. D'Amico AM, Vasquez KM. The Multifaceted Roles of DNA Repair and Replication Proteins in Aging and Obesity. *DNA Repair (Amst).* mars 2021;99:103049.
14. Vaezi A, Feldman CH, Niedernhofer L. ERCC1 and XRCC1 as biomarkers for lung and head and neck cancer. *Pharmacogenomics and personalized medicine* [Internet]. 2011; Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3513219/>
15. Pečina-Šlaus N, Kafka A, Salamon I, Bukovac A. Mismatch Repair Pathway, Genome Stability and Cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences* [Internet]. 2020 [cité 12 oct 2022];7. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2020.00122>
16. Jackson M, Marks L, May G, Wilson JB. The genetic basis of disease. *Essays In Biochemistry.* 3 déc 2018;62:643-723.

17. Engeland K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ.* mai 2022;29(5):946-60.
18. Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, Lahav G. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol.* avr 2019;20(4):199-210.
19. Peurala E, Koivunen P, Haapasaari KM, Bloigu R, Jukkola-Vuorinen A. The prognostic significance and value of cyclin D1, CDK4 and p16 in human breast cancer. *Breast cancer research : BCR.* 21 janv 2013;15:R5.
20. Parry D, Bates S, Mann DJ, Peters G. Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product. *EMBO J.* 1 févr 1995;14(3):503-11.
21. Parry D, Mahony D, Wills K, Lees E. Cyclin D-CDK Subunit Arrangement Is Dependent on the Availability of Competing INK4 and p21 Class Inhibitors. *Mol Cell Biol.* mars 1999;19(3):1775-83.
22. Toussaint O, Michiels C, Raes M, Remacle J. Cellular aging and the importance of energetic factors. *Experimental Gerontology.* 1 janv 1995;30(1):1-22.
23. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* mars 1997;88(5):593-602.
24. de Lange T. Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annu Rev Genet.* 23 nov 2018;52:223-47.
25. Sfeir A, de Lange T. Removal of Shelterin Reveals the Telomere End-Protection Problem. *Science.* 4 mai 2012;336(6081):593-7.
26. Maciejowski J, de Lange T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mars 2017;18(3):175-86.
27. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 31 mai 1990;345(6274):458-60.
28. Turner KJ, Vasu V, Griffin DK. Telomere Biology and Human Phenotype. *Cells.* 19 janv 2019;8(1):73.
29. Aubert G. Telomere dynamics and aging. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014;125:89-111.
30. Flynn RL, Cox KE, Jeitany M, Wakimoto H, Bryll AR, Ganem NJ, et al. Alternative Lengthening of Telomeres Renders Cancer Cells Hypersensitive to ATR Inhibitors. *Science.* 16 janv 2015;347(6219):273-7.
31. Cesare AJ, Reddel RR. Alternative Lengthening of Telomeres in Mammalian Cells [Internet]. *Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Landes Bioscience; 2013 [cité 1 août 2022].* Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6486/>
32. Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell.* 5 oct 2001;107(1):67-77.

33. Kornienko JS, Smirnova IS, Pugovkina NA, Ivanova JS, Shilina MA, Grinchuk TM, et al. High doses of synthetic antioxidants induce premature senescence in cultivated mesenchymal stem cells. *Sci Rep.* 4 févr 2019;9(1):1296.
34. Oubaha M, Miloudi K, Dejda A, Guber V, Mawambo G, Germain MA, et al. Senescence-associated secretory phenotype contributes to pathological angiogenesis in retinopathy. *Science Translational Medicine.* 26 oct 2016;8(362):362ra144-362ra144.
35. Wandrer F, Han B, Liebig S, Schlue J, Manns MP, Schulze-Osthoff K, et al. Senescence mirrors the extent of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Aliment Pharmacol Ther.* août 2018;48(3):270-80.
36. Borodkina A, Shatrova A, Abushik P, Nikolsky N, Burova E. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging (Albany NY).* juin 2014;6(6):481-95.
37. Volonte D, Galbiati F. Caveolin-1, a master regulator of cellular senescence. *Cancer Metastasis Rev.* juin 2020;39(2):397-414.
38. Samarakoon R, Higgins SP, Higgins CE, Higgins PJ. The TGF- β 1/p53/PAI-1 Signaling Axis in Vascular Senescence: Role of Caveolin-1. *Biomolecules.* 3 août 2019;9(8):341.
39. Schmitt CA, Wang B, Demaria M. Senescence and cancer — role and therapeutic opportunities. *Nat Rev Clin Oncol.* 31 août 2022;1-18.
40. Stefani C, Miricescu D, Stanescu-Spinu II, Nica RI, Greabu M, Totan AR, et al. Growth Factors, PI3K/AKT/mTOR and MAPK Signaling Pathways in Colorectal Cancer Pathogenesis: Where Are We Now? *International Journal of Molecular Sciences.* janv 2021;22(19):10260.
41. Waters AM, Der CJ. KRAS: The Critical Driver and Therapeutic Target for Pancreatic Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* sept 2018;8(9):a031435.
42. Ullah R, Yin Q, Snell AH, Wan L. RAF-MEK-ERK pathway in cancer evolution and treatment. *Seminars in Cancer Biology.* 1 oct 2022;85:123-54.
43. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 27 juin 2002;417(6892):949-54.
44. Michaloglou C, Vredeveld LCW, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CMAM, et al. BRAF^{E600}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature.* 4 août 2005;436(7051):720-4.
45. DiMauro T, David G. Ras-induced Senescence and its Physiological Relevance in Cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* déc 2010;10(8):869-76.
46. Kotsantis P, Petermann E, Boulton SJ. Mechanisms of Oncogene-Induced Replication Stress: Jigsaw Falling into Place. *Cancer Discov.* mai 2018;8(5):537-55.
47. Weyemi U, Dupuy C. The emerging role of ROS-generating NADPH oxidase NOX4 in DNA-damage responses. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 1 oct 2012;751(2):77-81.

48. Mongiardi MP, Pellegrini M, Pallini R, Levi A, Falchetti ML. Cancer Response to Therapy-Induced Senescence: A Matter of Dose and Timing. *Cancers (Basel)*. 27 janv 2021;13(3):484.
49. Demaria M, O'Leary MN, Chang J, Shao L, Liu S, Alimirah F, et al. Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov*. févr 2017;7(2):165-76.
50. Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF. Therapy-Induced Senescence in Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 20 oct 2010;102(20):1536-46.
51. Fleury H, Malaquin N, Tu V, Gilbert S, Martinez A, Olivier MA, et al. Exploiting interconnected synthetic lethal interactions between PARP inhibition and cancer cell reversible senescence. *Nat Commun*. 11 juin 2019;10:2556.
52. Faheem MM, Seligson ND, Ahmad SM, Rasool RU, Gandhi SG, Bhagat M, et al. Convergence of therapy-induced senescence (TIS) and EMT in multistep carcinogenesis: current opinions and emerging perspectives. *Cell Death Discov*. 15 juin 2020;6(1):1-12.
53. Bjelica S, Diklić M, Đikić D, Kovačić M, Subotički T, Mitrović-Ajtić O, et al. Hydroxyurea-induced senescent peripheral blood mesenchymal stromal cells inhibit bystander cell proliferation of JAK2V617F-positive human erythroleukemia cells. *FEBS J*. sept 2019;286(18):3647-63.
54. Le O, Rodier F, Fontaine F, Coppe JP, Campisi J, DeGregori J, et al. Ionizing radiation-induced long-term expression of senescence markers in mice is independent of p53 and immune status. *Aging Cell*. juin 2010;9(3):398-409.
55. EMA. AMM Olaparib [Internet]. Disponible sur: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2022/20220802156562/anx_156562_fr.pdf
56. Prasanna PG, Citrin DE, Hildesheim J, Ahmed MM, Venkatachalam S, Riscuta G, et al. Therapy-Induced Senescence: Opportunities to Improve Anticancer Therapy. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1 oct 2021;113(10):1285-98.
57. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. sept 2007;8(9):729-40.
58. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev*. 15 nov 2010;24(22):2463-79.
59. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*. 31 oct 2019;179(4):813-27.
60. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:99-118.
61. Lau L, David G. Pro- and Anti-Tumorigenic Functions of the Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Expert Opin Ther Targets*. déc 2019;23(12):1041-51.
62. Bent EH, Gilbert LA, Hemann MT. A senescence secretory switch mediated by PI3K/AKT/mTOR activation controls chemoprotective endothelial secretory responses. *Genes Dev*. 15 août 2016;30(16):1811-21.

63. Acar MB, Ayaz-Güner Ş, Gunaydin Z, Karakukcu M, Peluso G, Di Bernardo G, et al. Proteomic and Biological Analysis of the Effects of Metformin Senomorphics on the Mesenchymal Stromal Cells. *Front Bioeng Biotechnol.* 5 oct 2021;9:730813.
64. Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med.* déc 2015;21(12):1424-35.
65. Soto-Gamez A, Quax WJ, Demaria M. Regulation of Survival Networks in Senescent Cells: From Mechanisms to Interventions. *Journal of Molecular Biology.* 12 juill 2019;431(15):2629-43.
66. 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.* juill 1997;15(2):203-11.
67. Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest.* 1 nov 2004;114(9):1299-307.
68. Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E. Real-time in vivo imaging of p16Ink4a gene expression: a new approach to study senescence stress signaling in living animals. *Cell Div.* 2010;5(1):1.
69. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature.* nov 2011;479(7372):232-6.
70. Rhinn M, Ritschka B, Keyes WM. Cellular senescence in development, regeneration and disease. *Development.* 1 oct 2019;146(20).
71. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 26 sept 1995;92(20):9363-7.
72. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell.* avr 2006;5(2):187-95.
73. Hall BM, Balan V, Gleiberman AS, Strom E, Krasnov P, Virtuoso LP, et al. p16(Ink4a) and senescence-associated β -galactosidase can be induced in macrophages as part of a reversible response to physiological stimuli. *Aging (Albany NY).* 2 août 2017;9(8):1867-84.
74. Huang T, Rivera-Pérez JA. Senescence-associated β -galactosidase activity marks the visceral endoderm of mouse embryos but is not indicative of senescence. *Genesis.* avr 2014;52(4):300-8.
75. Freund A, Laberge RM, Demaria M, Campisi J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell.* juin 2012;23(11):2066-75.
76. Milanovic M, Fan DNY, Belenki D, Däbritz JHM, Zhao Z, Yu Y, et al. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature.* 4 janv 2018;553(7686):96-100.
77. Prašnikar E, Borišek J, Perdih A. Senescent cells as promising targets to tackle age-related diseases. *Ageing Res Rev.* 29 déc 2020;101251.

78. Tian Y, Zhang Y, Fu X. β Cell Senescence as a Common Contributor to Type 1 and Type 2 Diabetes. *Trends in Molecular Medicine*. sept 2019;25(9):735-7.
79. Schmitt CA, Wang B, Demaria M. Senescence and cancer — role and therapeutic opportunities. *Nat Rev Clin Oncol*. oct 2022;19(10):619-36.
80. Zampino M, Ferrucci L, Semba RD. Biomarkers in the path from cellular senescence to frailty. *Experimental Gerontology*. janv 2020;129:110750.
81. Schafer MJ, White TA, Iijima K, Haak AJ, Ligresti G, Atkinson EJ, et al. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun*. avr 2017;8(1):14532.
82. Ogrodnik M, Miwa S, Tchkonina T, Tiniakos D, Wilson CL, Lahat A, et al. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat Commun*. août 2017;8(1):15691.
83. Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, et al. Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*. 11 févr 2016;530(7589):184-9.
84. Zhu Y, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Gower AC, Ding H, Giorgadze N, et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell*. août 2015;14(4):644-58.
85. Guo K, Bu X, Yang C, Cao X, Bian H, Zhu Q, et al. Treatment Effects of the Second-Generation Tyrosine Kinase Inhibitor Dasatinib on Autoimmune Arthritis. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2019 [cité 24 sept 2022];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.03133>
86. Granato M, Rizzello C, Gilardini Montani MS, Cuomo L, Vitillo M, Santarelli R, et al. Quercetin induces apoptosis and autophagy in primary effusion lymphoma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR and STAT3 signaling pathways. *J Nutr Biochem*. mars 2017;41:124-36.
87. Hickson LJ, Langhi Prata LGP, Bobart SA, Evans TK, Giorgadze N, Hashmi SK, et al. Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. *EBioMedicine*. 18 sept 2019;47:446-56.
88. Justice JN, Nambiar AM, Tchkonina T, LeBrasseur NK, Pascual R, Hashmi SK, et al. Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EBioMedicine*. 5 janv 2019;40:554-63.
89. Verzola D, Gandolfo MT, Gaetani G, Ferraris A, Mangerini R, Ferrario F, et al. Accelerated senescence in the kidneys of patients with type 2 diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. nov 2008;295(5):F1563-1573.
90. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, et al. Olaparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive Relapsed Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*. 12 avr 2012;366(15):1382-92.
91. Mohamad Anuar NN, Nor Hisam NS, Liew SL, Ugusman A. Clinical Review: Navitoclax as a Pro-Apoptotic and Anti-Fibrotic Agent. *Frontiers in Pharmacology* [Internet]. 2020 [cité 25 sept 2022];11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.564108>

92. Zhu Y, Tchkonina T, Fuhrmann-Stroissnigg H, Dai HM, Ling YY, Stout MB, et al. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell.* juin 2016;15(3):428-35.
93. Chaib S, Tchkonina T, Kirkland JL. Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic. *Nat Med.* 11 août 2022;

Nom : ROSE
Prénom : François

Titre de la thèse : La sénescence cellulaire : ses différents contextes et propriétés en vue d'une perspective clinique

Mots-clés : sénescence, télomère, shelterine, SASP, sénolytique

Résumé :

La sénescence a été pour la première fois décrite en 1961 par Hayflick. Des développements récents dans la description et la typologie de cette destinée cellulaire sont apparus : après avoir présenté quelques prérequis sur le cycle cellulaire et la réparation de l'ADN, je décris les différents sous types de sénescence ainsi que les caractéristiques que présentent les cellules sénescents. J'aborde ensuite l'élimination des cellules sénescents, notamment par l'utilisation d'une nouvelle classe de médicaments et de produits baptisés sénolytiques, i.e. capables de lyser les cellules sénescents : je présente des résultats pré cliniques et cliniques impliquant ces sénolytiques qui paraissent augurer de forts potentiels thérapeutiques, notamment dans le domaine des chimiothérapies/radiothérapies anti-cancéreuses.

Membres du jury :

Président : PAUMELLE-LESTRELIN Réjane, Professeure des universités à la faculté de pharmacie de Lille de l'UFR3S.

Directeur, conseiller de thèse : ABBADIE Corinne, Professeure à l'Université de Lille

Assesseurs : CAZIN Jean-Louis, Professeur de Pharmacologie et Pharmacie Clinique à la Faculté de Pharmacie (UFR3S, Université de Lille), - Directeur du Centre de Pharmacologie et Pharmacie Clinique en Cancérologie au Centre Oscar Lambret de Lille (Centre de Lutte Contre le Cancer des Hauts de France), - Président du Conseil Scientifique de la Société Française de Pharmacie Oncologique Oscar Lambret

BOUKHLEF Samir , Radiopharmacien au CH de Valenciennes