

Les télomères et le vieillissement des cellules

Michel M. Ouellette
Isabelle Savre-Train

M.M. Ouellette: The Eppley Institute, The University of Nebraska Medical Center, 986805 Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-6805, États-Unis. I. Savre-Train: Inserm U. 271, 151, cours Albert-Thomas, 69424 Lyon Cedex 03, France.

► Les cellules somatiques de l'organisme humain cessent de se diviser après avoir effectué un nombre limité de mitoses. Ce processus, appelé sénescence, existe sous plus d'une forme. La sénescence de type M1 touche presque toutes les cellules de l'organisme et l'horloge qui en contrôle l'induction est le raccourcissement des télomères. Un de ses rôles essentiels est de bloquer le processus de la carcinogenèse et de contrer l'apparition des cancers. Elle aurait également des effets secondaires nocifs puisqu'elle semble être une cause de vieillissement dans certains tissus de l'organisme. ◀

Les cellules humaines normales ont une durée de vie limitée. Après un certain nombre de divisions cellulaires, elles atteignent un état stationnaire qu'on appelle « sénescence ». Dans cet état, les cellules sont viables, métaboliquement actives, mais ne se divisent plus [1]. La transition qui s'effectue lors de ce processus s'apparente à la différenciation cellulaire puisqu'elle est irréversible et qu'elle s'accompagne de changements morphologiques et d'expression génique. La sénescence est généralement accompagnée d'un élargissement et d'un aplatissement des cellules. Parmi les changements d'expression génique observés, certains contribuent à l'induction de la sénescence alors que d'autres en sont la conséquence. Le premier groupe comprend l'induction des gènes codant pour p21^{WAF1} et p16^{INK4a}, des inhibiteurs de la prolifération cellulaire [2, 3]. Le second groupe inclut l'induction de la SA-β-galactosidase (SA pour *senescence-associated*), un biomarqueur utile qui permet la détection des cellules sénescents [4]. La sénescence est un processus biologique normal qui touche presque toutes les cellules de l'orga-

nisme humain. Des études récentes suggèrent que la sénescence cellulaire contribue au vieillissement de l'organisme et que son rôle premier est de prévenir le développement des cancers.

Le cycle des divisions cellulaires et la sénescence

Lors de la sénescence, deux systèmes sont mis en action dont les effets bloquent le cycle des divisions cellulaires: le système p16^{INK4a}/pRB et le système p53/p21^{WAF1} (figure 1) (*m/s 1994, n°6-7, p. 744*). Une composante importante du premier système est l'induction du gène codant pour p16^{INK4a}. La protéine p16^{INK4a} est un inhibiteur des kinases CDK4 et CDK6, deux membres de la famille des CDK (*cyclin-dependent kinase*) (*m/s 1996, n°2, p. 224*). Les kinases de type CDK contrôlent les transitions qui s'effectuent entre chacune des différentes phases du cycle cellulaire, les phases G1, S, G2 et M [5]. La protéine pRB bloque la transition de G1 à S et son activité est inhibée lorsqu'elle est phosphorylée par les kinases CDK4 et CDK6. L'induction de p16^{INK4a} immobilise le cycle cellu-

TIRÉS À PART

M.M. Ouellette.

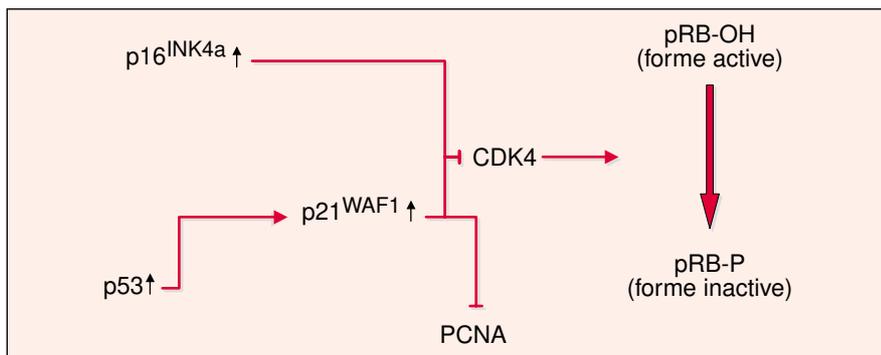


Figure 1. **Mécanismes responsables de l'inhibition du cycle cellulaire lors de la sénescence.** Dans les cellules sénescentes, le cycle des divisions cellulaires est bloqué par au moins deux processus indépendants : l'activation du facteur de transcription p53 et l'induction du gène codant pour p16^{INK4a}. Le facteur p53 contrôle l'expression de nombreux gènes et son activation conduit à l'induction du gène codant pour p21^{WAF1}. Cette protéine est un inhibiteur de la prolifération cellulaire qui agit au moins à deux niveaux. Elle inhibe un facteur essentiel à la réplication de l'ADN, le facteur PCNA, et elle bloque l'activité des kinases de type CDK. L'induction de la protéine p16^{INK4a}, indépendante de l'activation de p53, a aussi pour effet d'inhiber ces kinases. Cette inhibition a pour conséquence d'empêcher la phosphorylation et l'inactivation de pRB (pRB-P). Sous sa forme hypophosphorylée (pRB-OH), la protéine pRB bloque la transition G1/S du cycle cellulaire. L'incapacité des cellules sénescents à inactiver pRB produit un arrêt complet des divisions cellulaires.

laire en inhibant la phosphorylation de pRB. Le second système mis en place lors de la sénescence est indépendant du premier et son action sur la prolifération cellulaire est beaucoup plus globale. Une de ses composantes majeures est l'activation du facteur transcriptionnel p53 (*m/s* 1997, n° 11, p. 1339 et 1998, n° 8-9, p. 973). Une fois activée, cette protéine stimule la transcription de nombreux gènes dont celui codant pour la protéine p21^{WAF1} [6]. Cette dernière bloque le cycle cellulaire en agissant à au moins deux niveaux. Elle inhibe PCNA (*prolifération cell nuclear antigen*), un facteur essentiel à la réplication de l'ADN, et elle bloque l'ensemble des CDK [6] (*m/s* 1997, n° 11, p. 1259). Dans les cellules sénescents, la protéine p53 est activée, les niveaux d'expression de p21^{WAF1} et de p16^{INK4a} sont élevés et la protéine pRB est hypophosphorylée [2, 3, 7]. L'antigène grand T du virus SV40, une oncoprotéine, s'associe à p53 et pRB et les inactive. Cette inactivation bloque l'action des deux systèmes contre la sénescence et augmente la durée de vie des cellules humaines (*figure 2*) [8]. Lors de la culture des cellules humaines, le moment de l'induction

de la sénescence est déterminé par le nombre de divisions cellulaires qui ont été effectuées plutôt que par le temps chronologique passé en culture [1]. Ainsi, si la cadence des divisions cellulaires est artificiellement ralentie, le nombre de divisions qui seront exécutées sera le même mais pour un temps chronologique plus long. Si une population cellulaire est congelée 20 divisions avant la sénescence, puis remise en culture plusieurs années plus tard, elle exécutera les 20 divisions qui lui restent. Ces observations impliquent l'existence d'une horloge mitotique capable de compter le nombre de divisions cellulaires. La nature de cette horloge est longtemps demeurée spéculative et plusieurs mécanismes de comptage avaient été proposés. Parmi ceux-ci, on peut citer la dilution d'une molécule très stable lors des divisions, une diminution progressive de la méthylation du génome, l'accumulation aléatoire de mutations dans les gènes, l'accumulation de protéines incorrectement repliées, et la perte progressive de zones hétérochromatiques dans le génome. Au moins deux types distincts de sénescence existent, la forme M1 et la forme M0. La sénescence décrite dans cet article est de

type M1 et l'horloge biologique qui en contrôle l'induction est le raccourcissement graduel des télomères qui a lieu lors des divisions cellulaires.

Une horloge mitotique aux extrémités des chromosomes

Les télomères sont des structures essentielles qui coiffent les extrémités des chromosomes et les protègent contre la dégradation enzymatique, la recombinaison et les fusions interchromosomiques [9, 10]. Chez les vertébrés, ces structures sont constituées d'une séquence d'ADN simple, TTAGGG, répétée plusieurs milliers de fois et de protéines se liant à ces séquences [9-12] (*m/s* 1999, n° 11, p. 1286). Les extrémités des chromosomes linéaires sont particulièrement difficiles à répliquer. En effet, les polymérases ne synthétisent l'ADN que dans une seule direction (de 5' vers 3'). Conséquemment, les deux brins d'ADN de chaque chromosome doivent être répliqués par des processus différents : l'un est copié de façon ininterrompue alors que l'autre est répliqué de façon discontinue. La réplication discontinue utilise des amorces ARN pour la synthèse de courts segments d'ADN qu'on appelle les fragments d'Okazaki. Lorsque la fourche de réplication atteint l'extrémité d'un chromosome, la synthèse discontinue reste incomplète puisque l'amorce d'ARN du dernier fragment d'Okazaki est dégradée sans être remplacée. A chaque division cellulaire, une zone d'ADN non répliqué est donc créée aux extrémités des chromosomes, causant ainsi un raccourcissement progressif des télomères [13]. Dans les cellules en culture, les pertes en séquences télomériques sont généralement de l'ordre de 50 à 200 paires de bases (pb) par division [14, 15]. Des études récentes ont démontré que ce raccourcissement des télomères est l'horloge biologique qui induit la sénescence de type M1 (*voir plus loin*) [16, 17]. Lorsque la longueur des télomères diminue en-deçà d'une valeur minimale, la sénescence est induite par des mécanismes peu connus.

Un raccourcissement de la longueur des télomères survient également *in vivo* au cours du vieillissement de

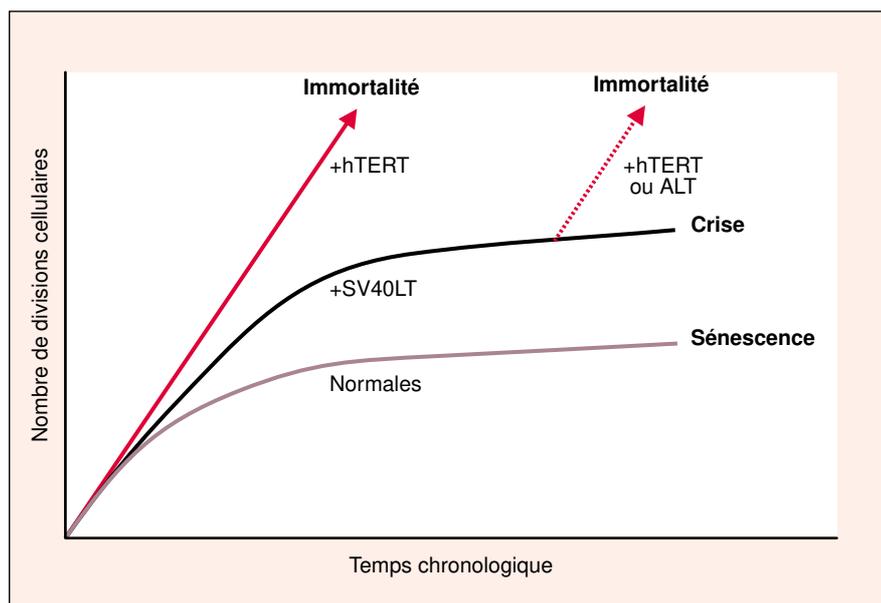


Figure 2. **Effets de la télomérase et des oncogènes viraux sur la durée de vie des cellules humaines.** Après un certain nombre de divisions cellulaires, les cellules humaines normales cessent de se diviser et deviennent sénescentes (Normales). L'induction de cet état résulte de l'activation de plusieurs protéines cellulaires parmi lesquelles pRB et p53. L'antigène grand T du virus SV40 peut se lier à p53 et pRB. Son expression continue (+ SV40LT) prévient l'induction de la sénescence et augmente la durée de vie des cellules. Au cours de cette période de sursis, l'érosion des télomères se poursuit. Après plusieurs divisions additionnelles, un état de crise caractérisé par la mort cellulaire est induit. Un événement très rare peut permettre à une cellule d'échapper à cette crise et de former un clone immortel (ligne pointillée). Cet événement rare est la mise en place du mécanisme ALT ou encore l'activation du gène codant pour hTERT et l'induction de la télomérase. Le gène codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase, hTERT, a été isolé et l'expression forcée de ce gène dans les cellules humaines normales (+ hTERT) prévient l'induction de la sénescence et de la crise et conduit à l'immortalité cellulaire.

l'organisme humain. Ces diminutions sont généralement de l'ordre de 10 à 200 paires de bases par année, selon les tissus. Une diminution de la longueur des télomères a été observée dans le cas des fibroblastes de la peau [18], des myoblastes des muscles squelettiques [14], des cellules de la muqueuse intestinale [19], des globules blancs du sang [20] et des cellules endothéliales du système vasculaire [21]. Dans ce dernier exemple, un raccourcissement plus rapide a été observé dans les vaisseaux sanguins exposés à un stress hémodynamique plus élevé où le renouvellement cellulaire est plus fréquent (de 102-147 pb/année dans l'artère iliaque comparé à 47 pb/année pour la veine iliaque). Dans le cerveau, où la prolifération cellulaire est minimale, la longueur

des télomères ne diminue pas avec l'âge.

La télomérase, source d'immortalité

La durée de vie des cellules humaines varie considérablement d'un type cellulaire à l'autre. Bien que la plupart des cellules de l'organisme humain possèdent une durée de vie relativement courte (d'au plus 100 divisions), certaines sont dotées d'une longévité exceptionnelle. C'est le cas de certaines cellules souches hématopoïétiques de la peau et de l'intestin qui, au cours de la vie des individus, se divisent un très grand nombre de fois. Quant aux cellules des lignées germinales, responsables de la production des gamètes, leur durée de vie est théoriquement illimitée puisqu'elles

se propagent d'une génération à l'autre. Ces types cellulaires ont ceci en commun : ils expriment tous la télomérase, une enzyme qui compense le raccourcissement des télomères par la synthèse de l'ADN télomérique (figure 3) [22]. L'extrémité des télomères se termine par une extension simple brin de type 3' dont la longueur varie entre 50 et 200 nucléotides [23, 24]. La télomérase reconnaît cette structure, s'y attache et synthétise de l'ADN télomérique qu'elle ajoute à l'extrémité du télomère. L'enzyme peut agir plusieurs fois sur un même substrat et à chaque cycle de synthèse, 6 nucléotides sont ajoutés. Au cours de l'embryogenèse, l'activité de la télomérase, initialement présente dans presque tous les tissus de l'embryon humain, est graduellement réprimée [25, 26]. A la naissance, l'activité de cette enzyme n'est détectée que dans les lignées germinales et que dans certaines cellules souches de la peau, de l'intestin et des tissus hématopoïétiques.

La télomérase est constituée de deux sous-unités essentielles : une protéine, la sous-unité catalytique de la télomérase (ou hTERT) et un ARN, l'ARN intégral de la télomérase (ou hTR) [27, 28]. La molécule hTR contient une séquence nucléotidique (5'-CUAACCCUAAC-3') complémentaire de celle des télomères, qui sert de matrice lors de la fabrication de l'ADN télomérique. Quant à la protéine hTERT, elle fonctionne comme une transcriptase inverse puisqu'elle fabrique un ADN, l'ADN des télomères, à partir d'une matrice d'ARN, l'ARN intégral de la télomérase. La sous-unité catalytique de la télomérase possède plusieurs courtes séquences d'acides aminés (les motifs RT) normalement retrouvées dans les transcriptases inverses et dont l'intégrité est essentielle au fonctionnement de l'enzyme. L'étude des niveaux d'expression des gènes hTERT et hTR a montré que l'activité de la télomérase est principalement dictée par le niveau de l'ARN messager codant pour hTERT [28]. Quant à l'ARN intégral de la télomérase, il est apparemment présent dans toutes les cellules de l'organisme où il ne se présente que sous sa forme mûre et fonctionnelle. Des études récentes ont montré que la protéine hTERT est

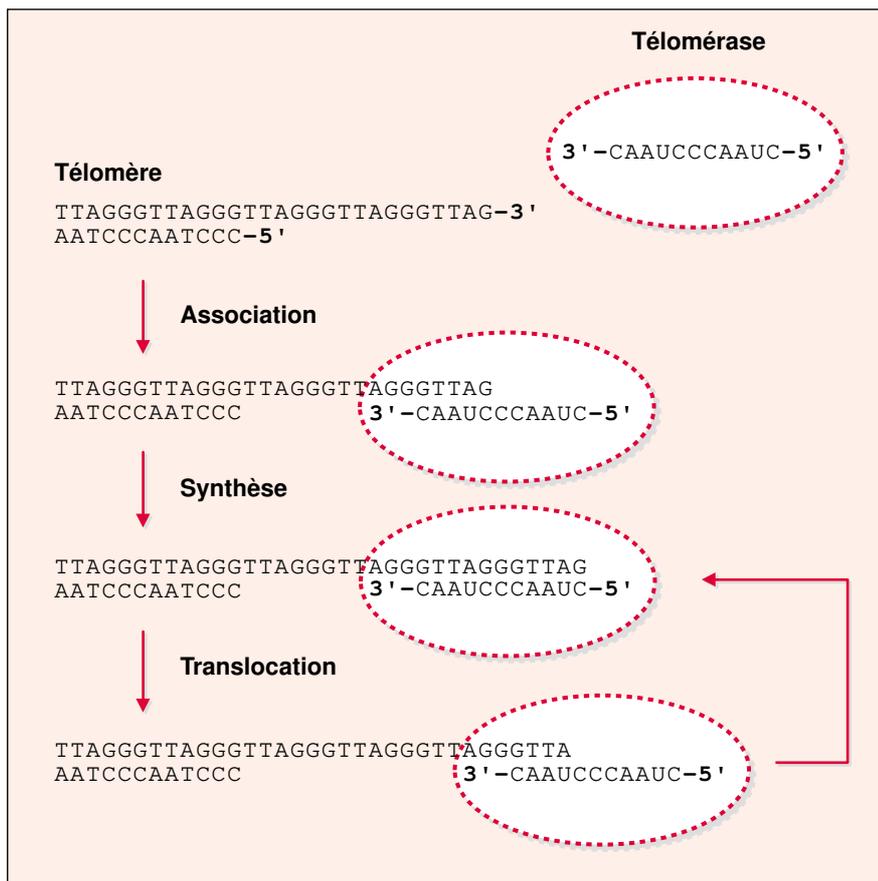


Figure 3. **Propriétés enzymatiques de la télomérase.** Le rôle biologique de la télomérase est de compenser l'érosion des télomères par la synthèse de l'ADN télomérique. La télomérase est constituée de deux sous-unités essentielles: une transcriptase inverse (hTERT) et un ARN intégral (hTR). La transcriptase inverse fournit l'activité catalytique et l'ARN intégral contient une courte séquence nucléotidique, complémentaire de celle des télomères, qui sert de matrice lors de la fabrication de l'ADN télomérique. L'enzyme se lie à l'extension simple brin de type 3' qui coiffe l'extrémité des télomères. Au cours de cette interaction, la matrice présente dans hTR s'hybride à l'extrémité de l'extension simple brin. Lors de la synthèse d'une répétition d'ADN télomérique, la protéine hTERT utilise l'extrémité du télomère comme amorce et l'ARN hTR comme matrice. L'enzyme télomérase peut, par un processus de translocation, agir plusieurs fois sur un même télomère. À chaque étape de synthèse, 6 nucléotides additionnels sont ajoutés à l'extrémité du télomère.

l'unique pièce qui manque au système pour pouvoir produire l'activité de la télomérase dans les cellules humaines normales. Ainsi, la transfection de ces cellules par un gène codant pour hTERT suffit à reconstituer l'activité de la télomérase et à prévenir l'érosion des télomères. L'observation cruciale est que cette activité exogène permet aux cellules de contourner la sénescence de type M1 (figure 2) [16, 17]. Cette observation démontre que l'horloge mitotique qui contrôle l'induction de ce processus est l'érosion des télomères.

Dans les fibroblastes de la peau et les cellules épithéliales de la rétine, l'expression continue de hTERT conduit à l'immortalité cellulaire (nous considérons les cellules immortelles lorsqu'elles ont quadruplé leur durée de vie normale) [17]. Dans certains types cellulaires, l'immortalisation requiert toutefois un événement additionnel, l'inhibition de la sénescence de type M0. C'est le cas notamment des cellules épithéliales de la glande mammaire et des kératinocytes de la peau. La nature et le mode de comptage (chronologique

ou mitotique) de l'horloge qui induit M0 ne sont toujours pas connus. Dans les cellules qui ont atteint M0, le système p53/p21^{WAF1} demeure inactif mais l'expression du gène p16^{INK4a} est induite [30]. L'immortalisation de ces types cellulaires requiert la présence de la télomérase mais aussi la répression ou l'inactivation du gène codant pour p16^{INK4a} [30]. Le rôle joué par M0 dans le vieillissement de l'organisme et la carcinogénèse n'a toujours pas été défini. Des mécanismes importants permettant le maintien de l'intégrité des tissus et la réparation des structures endommagées sont la prolifération et la différenciation des cellules. Dans ce contexte, il est difficile d'imaginer que l'organisme humain puisse tirer profit de la sénescence des cellules. De nombreuses études suggèrent que la sénescence a pour rôle premier de contrôler l'émergence d'un cancer et que cette action bénéfique représente son avantage évolutif. Au cours de la carcinogénèse, plusieurs mécanismes de contrôle de la prolifération cellulaire sont successivement détruits. Chaque étape nécessite la mutation d'un gène, la sélection des cellules mutées, et une amplification des cellules mutantes qui favorise l'émergence de la mutation suivante [31]. Chacune de ces étapes utilise un grand nombre de divisions cellulaires, ce qui implique une perte accélérée d'ADN télomérique et un vieillissement prématuré des cellules précancéreuses. Pour devenir cancéreuses, ces cellules doivent pouvoir survivre aux effets de la sénescence ou prévenir son induction. Certains oncogènes viraux et certaines mutations somatiques peuvent mener à l'inactivation des systèmes p53/p21^{WAF1} et p16^{INK4a}/pRB et ainsi augmenter la durée de vie des cellules [8]. Ces événements sont d'ailleurs très fréquemment observés dans les cellules cancéreuses [31]. Dans les modèles expérimentaux utilisés au laboratoire, l'inactivation de ces deux systèmes n'empêche toutefois pas l'érosion des télomères et les cellules ainsi transformées ne sont toujours pas immortelles (figure 2). Après plusieurs divisions additionnelles, un état de crise caractérisé par la mort cellulaire est induit. Un événement très rare permet parfois à une cellule d'échapper à cette crise et de former

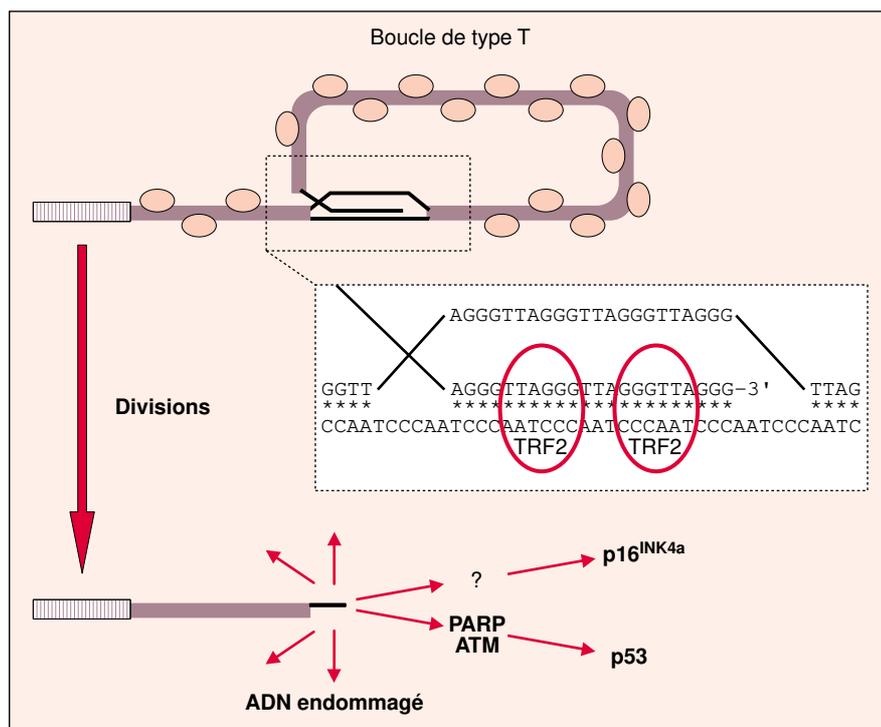


Figure 4. **Induction de la sénescence par le raccourcissement des télomères.** Il existe, dans les cellules humaines, des systèmes qui sont à la recherche d'ADN endommagé (cassures dans les chromosomes). Une fois qu'ils ont identifié un défaut, ces systèmes bloquent la prolifération cellulaire et induisent un état qui mime la sénescence. Or, les télomères sont des interruptions naturelles de l'ADN (bâtonnet noir) qui pourraient potentiellement être reconnues par ces systèmes. Ces cassures naturelles seraient normalement cachées par la formation d'un complexe macromoléculaire appelé télosome. Ce complexe contient plusieurs protéines associées aux télomères (perles roses) et inclut une structure spécialisée, la boucle de type T. Ces boucles sont créées par un repliement des télomères et par l'insertion de l'extension simple brin de type 3' dans la section double brin des télomères où elle s'hybride au brin qui lui est complémentaire. Le facteur hTRF2 est essentiel à la formation de ces boucles et son inhibition peut induire la sénescence. Lorsqu'un télomère devient trop court, le télosome se dissocie ou change de conformation, ce qui aurait pour effet d'exposer le télomère aux systèmes de surveillance de l'intégrité du génome. Une fois induits par la présence d'ADN endommagé, ces systèmes bloquent la prolifération des cellules en activant le facteur p53 et en induisant l'expression du gène codant pour p16^{INK4a}. Certaines données récentes suggèrent que la kinase ATM et l'enzyme PARP participent à l'activation de p53.

un clone immortel. Cet événement rare est l'activation du gène codant pour hTERT et l'induction de la télomérase [8, 15] ou encore la mise en place du mécanisme ALT (*alternative lengthening of telomeres*) [32]. ALT, par un mécanisme qui n'a pas encore été élucidé, permet aux télomères de conserver leur taille par un processus inapproprié de recombinaison génétique. L'utilisation de ces mécanismes de survie est fréquemment observée lors de la carcinogenèse. Ainsi, l'activité de la télomérase, normalement absente dans presque tous les tissus

sains de l'organisme, est détectée dans plus de 85 % des cas de cancers [33]. Cette activation très fréquente du gène *hTERT* implique qu'elle est essentielle à la progression de nombreux cancers et que la sénescence et la crise sont des obstacles qui limitent le développement de ces maladies.

Des télomères au cycle des divisions cellulaires

Olovnikov a été le premier à suggérer que le raccourcissement aux extrémités des chromosomes limite la durée

de vie des cellules. Selon son modèle initial, le raccourcissement des chromosomes conduit à l'élimination de gènes essentiels, ce qui diminue la vitalité des cellules [34]. Nous pensons maintenant que la sénescence est induite par des mécanismes moins destructeurs et beaucoup plus complexes. Il existe dans les cellules humaines des systèmes qui sont à la recherche d'ADN endommagés, par exemple des cassures dans la double hélice d'ADN. Une fois activés, ces systèmes bloquent la division cellulaire et stimulent les mécanismes de réparation de l'ADN. Lorsqu'ils sont induits par les rayons gamma (qui créent des cassures dans les chromosomes), ces systèmes produisent un état similaire à la sénescence. Au cours de cette transition, qui est accompagnée d'une activation de p53 et d'une induction de p21^{WAF1} et de p16^{INK4a}, le cycle cellulaire est irréversiblement bloqué [35, 36]. Or, les télomères sont des cassures permanentes de l'ADN qui pourraient potentiellement induire l'activation de ces systèmes. Selon un modèle en vogue, cette activation serait normalement bloquée par l'assemblage coopératif d'un complexe appelé « télosome » qui cache l'extrémité des télomères. Ce modèle propose que, lorsqu'un télomère devient trop court, le télosome se dissocie ou change de conformation et que cet événement induit la sénescence en exposant le télomère aux systèmes de surveillance de l'intégrité du génome (figure 4).

Quelles sont ces protéines qui font partie du télosome et quels sont leurs rôles respectifs dans l'induction de la sénescence? Les connaissances que nous avons de la structure du télosome sont le fruit de nombreuses études qui ont d'abord été effectuées chez la levure. Le télosome de la levure *Saccharomyces cerevisiae* est constitué d'au moins huit protéines différentes. L'une d'entre elles, Rap1p, forme des homodimères qui reconnaissent la séquence des répétitions télomériques. Ce facteur sert d'ancrage à la formation d'un complexe beaucoup plus large constitué des protéines Rif1p, Rif2p, Sir2p, Sir3p et Sir4p [37] (*m/s* 1997, n°4, p. 585). Plusieurs travaux suggèrent que la formation de ce complexe confère à la chromatine du télomère une structure très compacte qui est

inaccessible aux facteurs de transcription, à la télomérase et aux systèmes de surveillance de l'intégrité du génome. Lorsqu'un télomère se raccourcit, et que le nombre de molécules Rap1p qui lui sont associées est insuffisant, ce complexe se dissocie ou change de conformation, ce qui permet l'accès de la télomérase [38]. Ce mécanisme règle l'activité de la télomérase en ne permettant son action que sur les télomères les plus courts. Les deux facteurs additionnels, Cdc13p et Ku, auraient pour rôle commun de protéger les télomères de l'activité des exonucléases [37, 39].

Dans les cellules humaines, le facteur Rap1p est remplacé par deux orthologues, les facteurs hTRF1 et hTRF2 (TRF: *TTAGGG repeat factor*). Le rôle de hTRF1, similaire à celui de Rap1p, serait de contrôler l'accès de la télomérase au niveau de chacun des télomères [11]. Dans les cellules humaines possédant la télomérase, la surexpression de hTRF1 conduit à une diminution de la longueur des télomères alors que l'introduction d'un mutant dominant négatif produit l'inverse. Quant à la protéine hTRF2, son rôle serait de bloquer l'activation des systèmes de surveillance de l'intégrité du génome. La protéine hTRF2 est essentielle à la formation des boucles de type T, des structures qui cachent l'extrémité des télomères. Les boucles de type T sont créées par un repliement des télomères et par l'insertion de l'extension simple brin de type 3' dans la section double brin des télomères où elle s'hybride au brin qui lui est complémentaire (figure 4) [40]. L'introduction d'un mutant dominant négatif de hTRF2 conduit à la destruction des boucles de type T, à l'activation de p53, à l'induction de la SA- β -galactosidase et produit un arrêt du cycle cellulaire mimant la sénescence [12, 40].

Dans ce contexte, l'activation de p53 et l'induction de la sénescence sont dépendantes de la fonctionnalité du gène codant pour ATM (*ataxia-telangiectasia mutation*), une kinase normalement mobilisée par la présence d'ADN endommagé [41]. Or, la kinase ATM peut s'associer au facteur p53 et l'activer par la phosphorylation de son domaine amino-terminal [42]. Ces travaux situent la fonction de la kinase ATM entre la reconnaissance

des télomères qui ont été exposés et l'activation de p53. Une seconde molécule qui pourrait également participer à l'activation de p53 est la *poly(ADP-ribose)polymerase* (ou PARP) (*m/s 2000, n°4, p. 469*). Cette enzyme utilise une structure en doigt de zinc pour la recherche d'interruptions dans la double hélice de l'ADN. Après avoir identifié un défaut, PARP synthétise un polymère d'ADP-ribose qu'elle attache à sa propre structure et à celle de certaines autres protéines dont p53 [43]. Or, PARP forme un complexe avec p53, est parfois essentielle à l'activation de p53 et son inhibition conduit à un prolongement de la durée de vie des cellules [44]. Une molécule similaire à PARP a récemment été décrite comme faisant partie du télosome humain. Cette molécule, baptisée tankyrase, interagit avec hTRF1 et possède une activité catalytique similaire à celle de PARP [45]. Il n'est pas impossible que cette molécule puisse jouer un rôle similaire à celui de PARP dans le contrôle de la durée de vie des cellules. Une autre molécule faisant partie du télosome humain est Ku [44]. Dans les cellules humaines, la fonction usuelle de Ku est de participer à la réparation des cassures dans l'ADN et de signaler leur présence. Ce rôle, Ku le joue en association avec la DNA-PK, une kinase activée par la présence d'ADN endommagé [47] (*m/s 1999, n°6/7, p. 892*). Une possibilité intéressante est que Ku joue un rôle passif de protection des télomères lorsque les cellules sont jeunes et qu'il active la DNA-PK lorsque les télomères sont courts et donc insuffisamment masqués par l'action de hTRF2. Il a toutefois été démontré que la DNA-PK n'est pas essentielle à l'activation de p53. Peut-être participe-t-elle à l'induction du gène codant pour p16^{INK4a}? Les mécanismes responsables de l'induction de ce gène sont encore méconnus.

Le rôle des télomères dans le vieillissement de l'organisme

Au cours du vieillissement, il y a diminution de la capacité de régénération des tissus et une cause probable de ces changements est l'accumulation progressive de cellules sénescents. Le raccourcissement des télomères qui survient avec l'âge est-il suffisant

pour pouvoir induire la sénescence dans les tissus de l'organisme? La durée de vie des myoblastes dérivés de biopsies du quadriceps est inversement proportionnelle à l'âge des donneurs. Chez les nouveau-nés, la capacité de prolifération de ces cellules est d'environ 60 divisions alors qu'elle est six fois moins élevée chez les donneurs qui ont passé la soixantaine [12]. Des diminutions similaires ont été observées avec l'âge pour les fibroblastes de la peau [1, 18]. Dans ce cas toutefois, une très grande variabilité a été observée entre individus de même âge et également entre échantillons provenant d'un même individu. Au niveau de la peau, cette variabilité est vraisemblablement due à l'existence de secteurs locaux qui diffèrent de par leur histoire proliférative. Une approche différente a récemment été utilisée, permettant la visualisation directe des cellules sénescents. En laboratoire, la sénescence des fibroblastes s'accompagne d'une induction de l'activité de la SA- β -galactosidase. Or, une méthode histo-chimique simple permet la détection de cette activité dans les biopsies [4]. Dans le derme, les fibroblastes exprimant la SA- β -galactosidase montrent une distribution sectorielle et leur nombre augmente en fonction de l'âge des donneurs. Bien que fragmentaires, ces données suggèrent une accumulation de cellules sénescents lors du vieillissement de certains tissus.

Les rongeurs, tels que le hamster, la souris et le rat, diffèrent radicalement de l'être humain quant à la biologie des télomères. Ces espèces animales ne répriment pas l'activité de la télomérase au cours de l'embryogenèse et possèdent de très longs télomères [48]. Clairement, le raccourcissement des télomères ne joue aucun rôle dans le vieillissement de ces organismes. Toutefois, lorsque les deux allèles codant pour l'ARN intégral de la télomérase sont inactivés chez la souris, un phénotype intéressant de vieillissement prématuré est éventuellement observé [10]. Les souris de la première génération ne montrent aucun symptôme et il y a perte progressive d'ADN télomérique d'une génération à l'autre. A la sixième génération, les souris sont stériles et souffrent de symptômes normalement associés au vieillissement de l'orga-

nisme humain [48]. Parmi les défauts observés figurent la perte des poils, le grisonnement des poils, une cicatrisation plus lente des plaies et une diminution de la capacité de régénération des cellules sanguines. Bien qu'elles soient indirectes, ces observations suggèrent que le raccourcissement des télomères participe à certains aspects du vieillissement humain.

Conclusions

Le raccourcissement des télomères et la sénescence imposent aux cellules de l'organisme humain l'équivalent biologique d'une date d'expiration. Il s'agit d'une arme à double tranchant. La sénescence limite les dégâts engendrés par les mutations spontanées qui provoquent le cancer mais accélère le processus du vieillissement. Au cours de l'évolution, les caractères génétiques ne sont sélectionnés que s'ils augmentent la capacité des individus à transmettre leurs gènes aux générations suivantes. Parfois, les caractères sélectionnés ont des effets secondaires néfastes qui se font sentir plus tard dans la vie. Le raccourcissement des télomères et la sénescence représentent un avantage évolutif parce qu'ils protègent les individus du développement d'un cancer durant la très longue période de maturation qui précède la puberté. Chez les rongeurs, cette période de maturation est si courte que la sénescence ne constituerait pas un avantage évolutif. Chez les rongeurs, les mécanismes réprimant la télomérase au cours de l'embryogenèse n'auraient donc pas été sélectionnés ■

Remerciements

Nous remercions vivement M. Roger et R. Pelletier pour leurs commentaires sur ce manuscrit.

RÉFÉRENCES

- Martin GM, Sprague CA, Epstein CJ. Replicative lifespan of cultivated human cells: effect of donor's age, tissue and genotype. *Lab Invest* 1970; 23: 86-92.
- Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR. Cloning of senescent cell derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 1994; 211: 90-8.
- Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13742-7.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9363-7.
- LePeuch C, Dorée M. Le temps du cycle cellulaire. *Med Sci* 2000; 16: 461-8.
- El-Deiry WS. p21/p53, cellular growth control and genomic integrity. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998; 227: 121-37.
- Stein GH, Beeson M, Gordon L. Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts. *Science* 1990; 249: 666-9.
- Wright WE, Shay JW. The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp Gerontol* 1992; 27: 383-9.
- Blackburn EH. Telomeres: no end in sight. *Cell* 1994; 77: 621-3.
- Ancelin K, Castellazzi M, Gislou E. Télomères et cancer: les barrières tombent. *Med Sci* 2000; 16: 481-6.
- Van Steensel B, de Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 1997; 385: 740-3.
- Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 1999; 283: 1321-5.
- Gire V, Wynford-Thomas D. La sénescence dans les cellules humaines: un obstacle au développement tumoral? *Med Sci* 1999; 15: 1096-104.
- Decary S, Mouly V, Hamida CB, Sautet A, Barbet JP, Butler-Brown GS. Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 1429-38.
- Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 1992; 11: 1921-9.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279: 349-52.
- Morales CP, Holt SE, Ouellette M, et al. Lack of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet* 1999; 21: 115-8.
- Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10114-8.
- Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 1990; 346: 866-8.
- Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9857-60.
- Chang E, Harley CB. Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11190-4.
- Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 1989; 59: 521-9.
- Makarov VL, Hirose Y, Langmore JP. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 1997; 88: 657-66.
- McElligott R, Wellinger RJ. The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J* 1997; 16: 3705-14.
- Ulaner GA, Giudice, LC. Developmental regulation of telomerase activity in human fetal tissues during gestation. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 769-73.
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996; 18: 173-9.
- Feng JL, Funk WD, Wang SS, et al. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995; 269: 1236-41.
- Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, et al. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 1997; 277: 955-9.
- Kiyono T, Foster SA, Koop JJ, McDougall JK, Galloway DA, Klingelhutz AJ. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 1998; 396: 84-8.
- Brenner AJ, Stampfer MR, Aldaz CM. Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation. *Oncogene* 1998; 17: 199-205.
- Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9: 138-41.
- Reddel RR, Bryan TM, Murnane JP. Immortalized cells with no detectable telomerase activity. *Biochemistry* 1997; 62: 1254-62.
- Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33: 787-91.
- Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 1973; 41: 181-90.
- Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 1994; 8: 2540-51.

RÉFÉRENCES

36. Robles SJ, Adami, GR. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16-ink4a enrichment and to premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 1998 ; 6: 1113-23.
37. Bourns BD, Alexander MK, Smith AM, Zakian VA. Sir proteins, Rif proteins, and Cdc13p bind *Saccharomyces telomeres in vivo*. *Mol Cell Biol* 1998 ; 18: 5600-8.
38. Marcand S, Gilson E, Shore D. A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* 1997 ; 275: 986-90.
39. Gravel S, Larrivee M, Labrecque P, Wellinger RJ. Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* 1998 ; 280: 741-4.
40. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 1999 ; 97: 503-14.
41. Lavin MF, Shiloh Y. The genetic defect in ataxia-telangiectasia. *Annu Rev Immunol* 1997 ; 15: 177-202.
42. Khanna KK, Keating KE, Kozloy S, et al. ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet* 1998 ; 20: 398-400.
43. Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Luo R, Smulson ME. Poly(ADP-ribosylation) of p53 during apoptosis in human osteosarcoma cells. *Cancer Res.* 1999 ; 59: 2190-4.
44. Vaziri H, West MD, Allsopp RC, et al. ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *EMBO J* 1997 ; 16: 6018-33.
45. Smith S, Giriat I, Schmitt A, de Lange T. Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 1998 ; 282: 1484-7.
46. Hsu HL, Gilley D, Blackburn EH, Chen DJ. Ku is associated with the telomere in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96: 12454-8.
47. Featherstone C, Jackson SP. Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions? *Mutat Res* 1999 ; 434: 3-15.
48. Lenhard K, Chang S, Lee HW, et al. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* 1999 ; 96: 701-12.

ms2000

Summary

Telomere-controlled senescence

Most normal human cells have a finite life span. After a limited number of cell divisions, they reach a quiescent state termed senescence. During this process, cell cycle progression is blocked by the activation of p53 and the induction of p16^{INK4a}. The onset of senescence is controlled by the shortening of telomeres that occurs each time normal human cells divide. The observation that telomeres shortening occurs *in vivo* suggests that senescence may play a role in the aging process. The enzyme telomerase can extend the life span of human cells by synthesizing new telomeric DNA. This enzyme, absent from most somatic

tissues, contains an RNA (hTR) that serves as a template for the synthesis of telomeric DNA and a reverse transcriptase (hTERT) that provides catalytic activity. The forced expression of exogenous hTERT in normal human cells is sufficient to reconstitute telomerase activity, maintain the size of telomere and prevent the induction of senescence. During carcinogenesis, senescence is frequently inhibited by the ectopic expression of telomerase. Although senescence might be detrimental as a potential cause of aging, its evolutionary advantage is to provide an additional obstacle to the development of cancers.