



HAL
open science

Tri des cellules sénescentes par cytométrie en flux

Élodie Rodzinski, Nathalie Martin, Raphael Rouget, Adrien Pioger, Vanessa Dehennaut, Olivier Molendi-Coste, David Dombrowicz, Erwan Goy, Yvan de Launoit, Corinne Abbadie

► To cite this version:

Élodie Rodzinski, Nathalie Martin, Raphael Rouget, Adrien Pioger, Vanessa Dehennaut, et al.. Tri des cellules sénescentes par cytométrie en flux : Des spécificités et des pièges à éviter. *Médecine/Sciences*, 2024, 40 (3), pp.275-282. 10.1051/medsci/2024011 . hal-04518057

HAL Id: hal-04518057

<https://hal.science/hal-04518057>

Submitted on 23 Mar 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

► La sénescence est un état d'adaptation des cellules au stress qui contribue au vieillissement et au développement de nombreuses maladies. Étudier les voies moléculaires modulant l'induction, le maintien ou l'échappement de la sénescence est compliqué par la contamination des populations de cellules sénescents par des cellules proliférantes pré- ou post-sénescents. Pour contourner cette difficulté, nous avons développé un protocole de tri par cytométrie en flux, fondé sur trois marqueurs majeurs de sénescence (l'activité SA- β -galactosidase, la taille et la granularité des cellules), qui permet de trier des cellules sénescents viables, à des degrés choisis d'engagement dans le phénotype. ◀

La sénescence, un état cellulaire physiopathologique

La sénescence cellulaire a été décrite pour la première fois au début des années 1960 par Leonard Hayflick et Paul S. Moorhead de l'Institut Wistar à Philadelphie, aux États-Unis [1, 2]. Le concept proposé alors (que la sénescence serait une forme de vieillissement cellulaire) n'a suscité que peu d'intérêt jusqu'au début des années 2000. Ce concept a même été contesté, car considéré comme un artefact de culture *in vitro* de cellules primaires [3]. Aujourd'hui, il est établi que ce processus d'adaptation et de reprogrammation cellulaires, spontané ou induit prématurément par des stress, joue un rôle causal dans l'embryogenèse, la réparation et le remodelage tissulaires, mais aussi dans le vieillissement physiologique des organismes, ainsi que dans la survenue de nombreuses maladies liées à l'âge ou induites par des stress [4, 5] (→).

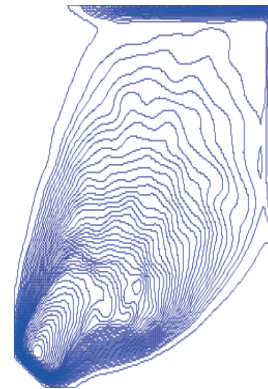
(→) Voir le numéro thématique **Vieillesse et mort, de la cellule à l'individu**, m/s n°12, décembre 2020

De plus, il est maintenant établi que de nombreux traitements anti-cancéreux (notamment les chimio-

Tri des cellules sénescents par cytométrie en flux

Des spécificités et des pièges à éviter

Élodie Rodzinski¹, Nathalie Martin¹, Raphael Rouget¹, Adrien Pioger¹, Vanessa Dehennaut¹, Olivier Molendi-Coste², David Dombrowicz³, Erwan Goy¹, Yvan de Launoit¹, Corinne Abbadie¹



¹Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277 - CANTHER (Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies), F-59000 Lille, France.

²Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US41 – UAR 2014 – PLBS, F-59000 Lille, France.

³Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011 - EGID, F-59000 Lille, France.

corinne.abbadie@cnrs.fr

thérapies conventionnelles et la radiothérapie) agissent principalement en induisant la mort des cellules cancéreuses, mais aussi en partie en induisant leur sénescence [6].

Les cellules sénescents présentent un ensemble de modifications phénotypiques et moléculaires permettant de les caractériser : une augmentation de taille ; un arrêt dans le cycle cellulaire, dû à l'augmentation d'expression d'inhibiteurs de kinases dépendant des cyclines (CDK, *cyclin-dependent kinase*), p21 et p16 ; un stress oxydant ; la présence de dommages à l'ADN non réparés ; une accumulation de lipofuscine ; un stress du réticulum endoplasmique ; une augmentation d'activité autophagique ; une reprogrammation épigénétique ; une perte de lamine B1¹ ; une reprogrammation métabolique et une reprogrammation du sécrétome² vers un enrichissement en cytokines pro-inflammatoires et en enzymes de remodelage de la matrice extracellulaire [7-9]. Les cellules sénescents sont des cellules viables, à longue durée de vie, qui s'accumulent dans les tissus. La viabilité de ces cellules repose sur leur capacité à résister à l'apoptose par le biais de modifications de l'expression de diverses protéines, comme les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL2 (*B cell lymphoma 2*), HSP90 (*heat shock protein 90*), la caspase 3 ou TP53 (*tumor protein 53*) [4, 10, 11].

¹ La lamine B1 est un composant de la lamina nucléaire, constituant de la partie interne de l'enveloppe du noyau cellulaire.

² Le sécrétome est constitué de tous les composants qui sont produits par les cellules vivantes et sécrétés.

Le phénotype sénescence présente cependant une certaine hétérogénéité, selon le type de cellules considérées et/ou l'inducteur de la sénescence. Cette hétérogénéité concerne des modifications phénotypiques et moléculaires, mais aussi la stabilité du phénotype et le devenir des cellules sénescence. On distingue au moins quatre sous-types de sénescence. La sénescence décrite par Hayflick et Morehead correspond au premier sous-type, appelé désormais sénescence répliquative (RS pour *replicative senescence*). Ce sous-type de sénescence résulte de l'érosion des télomères à chaque cycle de réplication ; lorsque les télomères deviennent trop courts, les extrémités des chromosomes se retrouvent exposées, ce qui induit une signalisation de réponse aux dommages à l'ADN (*DNA damage response*) persistante, responsable de l'induction et de l'irréversibilité du phénotype de sénescence répliquative. Les cellules cancéreuses échappent le plus souvent à ce type de sénescence, en mettant en place des mécanismes permettant le maintien de la longueur des télomères [12]. Contrairement à la sénescence répliquative, les trois autres sous-types de sénescence peuvent toucher des cellules saines mais aussi des cellules cancéreuses, et le phénotype sénescence, quoique stable sur une certaine période, peut évoluer vers une mort cellulaire ou vers un échappement. On distingue ainsi la sénescence prématurée induite par un stress (SIPS pour *stress-induced premature senescence*), le plus souvent oxydant, la sénescence induite par les thérapies, notamment les radio et chimiothérapies anticancéreuses (TIS pour *therapy-induced senescence*), et la sénescence induite par certains oncogènes, comme par exemple le variant BRAF^{V600E} (ou OIS, pour *oncogene induced senescence*) [13] (→).

(→) Voir la Synthèse de
E. Goy et C. Abbadié, m/s
n° 3, mars 2018, page 223

Les cellules épithéliales humaines normales, telles que des kératinocytes ou des cellules mammaires, n'entrent pas en sénescence répliquative quand elles sont cultivées *in vitro* mais en SIPS, qui sera suivie, pour la quasi-totalité des cellules, d'une mort par autophagie ou, pour une très petite fraction d'entre-elles, par une ré-entrée dans le cycle cellulaire et une filiation de cellules pré-tumorales [7].

Pourquoi trier des cellules sénescence ?

Des progrès considérables ont été réalisés au cours de ces vingt dernières années, permettant de comprendre les mécanismes moléculaires contribuant à l'induction de la sénescence et à son maintien. Néanmoins, de nombreuses « boîtes noires » persistent, notamment en ce qui concerne les mécanismes d'évasion cellulaire. Il demeure donc nécessaire de réaliser des études sur des populations de cellules sénescence de différents types et induites en sénescence dans différents contextes physiologiques, pathologiques ou thérapeutiques. Or, une population de cellules induites en sénescence n'est jamais homogène : le pourcentage de cellules sénescence peut varier considérablement en fonction du type d'inducteur ou du temps post-induction ; les marqueurs de sénescence peuvent être exprimés à des niveaux variables ; et, plus problématique pour l'interprétation des résultats, les populations de cellules sénescence peuvent être polluées par des cellules proliférantes, soit pré-sénescence, soit post-sénescence,

résultant de l'échappement des cellules à la sénescence. Trier les cellules sénescence par cytométrie en flux permet donc d'obtenir des populations très enrichies en cellules présentant des marqueurs spécifiques de la sénescence, afin de pouvoir réaliser, en aval, des analyses moléculaires classiques, par RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) ou par *western-blot* par exemple. Cela permet également de séparer des sous-populations de cellules sénescence exprimant plus ou moins les marqueurs de sénescence, c'est-à-dire plus ou moins engagées dans le processus et, finalement, de trier des cellules sénescence viables pour étudier leur devenir, notamment la stabilité de leur phénotype, leur éventuelle mort ou l'échappement post-sénescence.

Les critères utilisables pour trier des cellules sénescence

La sénescence est un état cellulaire maintenant bien reconnu, mais qui demeure difficile à définir et à caractériser. En effet, la sénescence se manifeste par plusieurs changements phénotypiques et moléculaires, mais aucune de ces modifications n'est strictement spécifique de la sénescence. Il n'existe donc pas de marqueur unique de sénescence. C'est la somme de ces modifications qui définit l'état de sénescence, ce qui oblige à recourir à la détection de plusieurs marqueurs simultanément [14]. C'est la raison pour laquelle nous avons mis au point, ces dernières années, des protocoles de tri de cellules sénescence fondés sur l'utilisation simultanée de plusieurs marqueurs : la grande taille des cellules, leur forte granularité (qui reflète la présence dans leur cytoplasme de mitochondries altérées, d'agrégats de lipofuscine et de vésicules autophagiques), la quantité de vésicules acides (endosomes, lysosomes et autophagolysosomes) qu'elles présentent, et enfin, l'activité de la β -galactosidase³, (ou SA- β -Gal, pour *senescence-associated β -galactosidase activity*), le marqueur de sénescence le plus universel et le plus utilisé, qui reflète la quantité de lysosomes présents dans les cellules [15-20]. Dans nos premières études, nous avons trié les cellules uniquement selon deux paramètres : soit le couple taille (approximée par le *forward scatter factor* [FSC]) et granularité (approximée par le *side scatter factor* [SSC]) ; soit le couple taille et quantité de vésicules acides, après marquage par le LysoTracker®, un fluorochrome présentant une affinité pour les compartiments acides de la cellule [15-17]. Plus récemment, nous avons mis au point un tri fondé sur

³ La β -galactosidase est une hydrolase dont le rôle est d'hydrolyser des β -galactosides en monosaccharides.

Substrats fluorigènes de la β -Gal	Structure moléculaire	Exc./Em.* (nm)	Considérations d'utilisation
**C ₁₂ FDG		497/518 (laser 488/ canal FITC)	<ul style="list-style-type: none"> Nécessité de tester les temps d'incubation pour marquer les cellules sénescentes en fonction du type de cellules étudiées (le temps minimal d'incubation est de 1 heure). Les substrats C₁₂FDG et DDAOG génèrent un signal de sensibilité et spécificité comparables. La présence de lipofuscine dans les cellules sénescentes entraîne une autofluorescence détectable aussi bien par le canal FITC que par le canal APC (Figure 5A). Le produit DDAO est détectable sur le canal APC, ce qui permet de réaliser un double marquage sur le canal FITC sans compensation ; de plus, le DDAO supporte la fixation L'utilisation du substrat DDAOG permet d'utiliser l'autofluorescence de la lipofuscine dans le canal FITC comme un marqueur additionnel de sénescence (Figure 5B)
***DDAOG		646/659 (laser 640/ canal APC)	

Tableau 1. Description et utilisation des substrats fluorigènes de la β -Gal pour le marquage et le tri de cellules sénescentes par cytométrie en flux. *Exc./Em. : Excitation/émission ; **C₁₂FDG : 5-dodecanoylamino fluoresceine di- β -D-galactopyranoside ; ***DDAOG : 9H-(1, 3-dichloro-9, 9-diméthylacridine-2-one-7-yl) β -D-galactopyranoside

trois paramètres : la taille (FSC), la granularité (SSC) et l'activité β -Gal, en utilisant des substrats synthétiques fluorigènes commerciaux de la β -Gal [19–22].

Classiquement, le tri par cytométrie en flux de différents types de cellules différenciées, le plus souvent des cellules immunitaires, repose sur leur niveau d'expression d'une ou plusieurs protéines membranaires (ou CD pour *cluster of differentiation*). Pour l'analyse de cellules sénescentes, une étude par spectrométrie de masse a permis d'identifier CD26, également appelé DPP4 (*dipeptidyl peptidase 4*), comme une protéine dont la quantité présente à la membrane est très augmentée au cours de la sénescence [23]. Des protocoles de tri magnétique (ou MACS pour *magnetic-activated cell sorting*), utilisant des anticorps anti-CD26, ont été appliqués pour trier des cellules sénescentes au sein d'une population de cellules endothéliales ou de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC pour *peripheral blood mononuclear cells*) [23, 24]. Néanmoins, à l'instar des autres marqueurs de sénescence, le CD26 n'est pas strictement spécifique de la sénescence ; il est en effet fortement exprimé par les cellules cancéreuses, par exemple [25]. Ce marqueur pourrait donc probablement être utilisé pour trier les cellules sénescentes par cytométrie en flux, mais il serait nécessaire de l'associer à un ou plusieurs des autres marqueurs de sénescence que nous avons décrits.

Le protocole de tri des cellules sénescentes : ses difficultés, les pièges à éviter, et ses limites

Principe du protocole

Le protocole de tri de cellules sénescentes le plus récent utilise trois grandeurs mesurables par les cytomètres-trieurs conventionnels : le

FSC, proportionnel à la taille des cellules ; le SSC, qui rend compte de la structure et de la granularité des cellules ; et l'intensité de fluorescence produite par un substrat synthétique fluorigène de la β -Gal [20]. Deux substrats de la β -Gal peuvent être utilisés : le C₁₂FDG (5-dodecanoylamino fluoresceine di- β -D-galactopyranoside) et le DDAOG (9H-(1,3-dichloro-9,9-diméthylacridine-2-one-7-yl) β -D-galactopyranoside). Lorsque le C₁₂FDG est clivé par la β -Gal, le produit, C₁₂F, émet une fluorescence verte et reste piégé à l'intérieur des cellules, probablement ancré dans les membranes grâce à la chaîne aliphatique C₁₂ qui le constitue. Le DDAOG, dépourvu d'une chaîne aliphatique d'ancrage intracellulaire, fonctionne sur le même principe, mais le produit DDAO fluoresce dans l'infra-rouge (Tableau 1). La sensibilité et la spécificité de ces deux substrats pour l'enzyme sont similaires [21].

Dans ce protocole, les cellules sont d'abord sélectionnées en fonction du niveau de fluorescence émis par le produit résultant de l'activité de la β -Gal, puis, simultanément, selon les valeurs de FSC et de SSC. L'inverse, c'est-à-dire une sélection sur les valeurs de FSC et de SSC, puis sur le niveau de fluorescence, est également possible. Les cellules qui sont ainsi triées sont qualifiées de FSC^{high}/SSC^{high}/C₁₂F^{high} ou DDAO^{high}. Les différentes étapes du protocole sont représentées dans la Figure 1. Les résultats de tri sont présentés

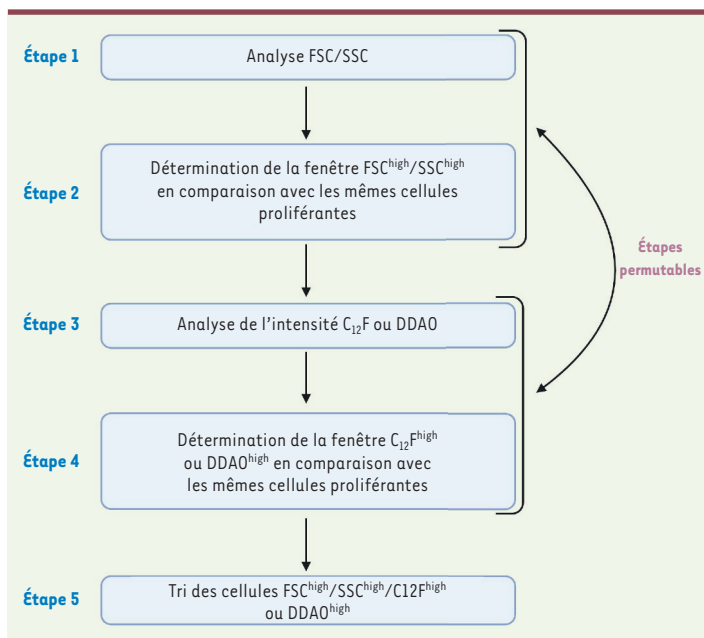


Figure 1. Diagramme résumant les étapes de tri de cellules sénescents par cytométrie en flux.

sous la forme d'un *dot plot*⁴ montrant les valeurs de FSC/SSC et d'activité β -Gal. Des exemples de tri de cellules en RS et de cellules cancéreuses induites en TIS sont montrés, respectivement dans la Figure 2 et la Figure 3.

Afin de pouvoir délimiter les fenêtres de tri, il est nécessaire de disposer de cellules négatives (ou témoins), constituées de cellules identiques aux cellules en sénescence mais qui n'ont pas été traitées par l'inducteur de sénescence, ou de cellules en phase de prolifération exponentielle, s'il s'agit de les comparer à des cellules en RS.

Les difficultés inhérentes aux cellules sénescents

La taille des cellules sénescents

Trier des cellules de grande taille, comme les cellules sénescents, nécessite d'utiliser un trieur qui peut être équipé d'une buse de diamètre suffisant. En effet, il est recommandé d'utiliser une buse dont le diamètre est cinq fois plus grand que celui des cellules à trier. En suspension, le diamètre de fibroblastes humains normaux de derme (NHDF) en RS ou en SIPS est en moyenne de 50 μm , certaines cellules atteignant 100 μm [20]. Il serait donc, en théorie, nécessaire d'utiliser une buse dont le diamètre serait de 500 μm , et qui, à notre connaissance, n'est pas disponible sur le marché. Un trieur équipé d'une buse de 200 μm de diamètre permet cependant d'obtenir des résultats très satisfaisants [19, 20]. Ce problème de taille est d'autant plus important que le type cellulaire analysé est de grande taille avant sénescence, ce qui est le cas des fibro-

blastes primaires, le modèle le plus utilisé dans les études sur la sénescence. Cela est moins vrai pour des cellules épithéliales. Par exemple, les kératocytes humains normaux d'épiderme (NHEK) sénescents en suspension ont un diamètre moyen inférieur à 40 μm , les plus grands d'entre eux n'excédant pas 50 μm . Ils peuvent donc être triés avec un trieur équipé d'une buse d'un diamètre de 130 μm [15–18].

Les doublets de cellules

Les doublets résultent d'une dissociation imparfaite des cellules lors du traitement préalable (par la trypsine/EDTA⁵) de la suspension cellulaire à analyser. Les valeurs mesurées pour un doublet de cellules correspondent à la somme des valeurs de deux singulets, ce qui peut fausser les résultats. La règle est donc d'éliminer les doublets des fenêtres d'analyse et de tri. Cependant, la grande taille des cellules sénescents peut conduire à confondre ces cellules avec des doublets de cellules proliférantes contaminantes, et donc à les exclure par erreur.

Les doublets sont repérés, et exclus des fenêtres de tri, en analysant l'intensité du signal FSC (FSC-H) en fonction de sa largeur (FSC-W), une grandeur qui évalue le temps que l'objet met pour passer devant les détecteurs. On considère que les événements produisant un signal dont la largeur est supérieure à la moyenne de la population sont des doublets (deux cellules accolées mettant plus de temps pour passer devant les détecteurs qu'une cellule unique). Comme un doublet, une cellule sénescence unique, dont la taille est importante, mettra donc plus de temps à passer devant le détecteur, surtout si elle est de forme allongée, comme c'est souvent le cas pour des fibroblastes sénescents, qui conservent leur forme allongée pendant quelques heures après leur mise en suspension. Les cellules sénescents peuvent également rester associées en doublets malgré le traitement par la trypsine. Mais ce risque est très faible, car une des caractéristiques intrinsèques des cellules sénescents est qu'elles s'agrègent peu entre elles [26]. Plutôt que d'éliminer les doublets à l'analyse, il est ainsi préférable d'en vérifier l'absence après le traitement de dissociation par un examen au microscope.

La difficulté du réglage des photomultiplicateurs

Dans un cytomètre, les signaux lumineux sont convertis en courant électrique grâce à des tubes photomultiplicateurs (PMT). Lorsque l'on veut trier

⁴ Diagramme de points.

⁵ Acide éthylène diamine tétra-acétique.

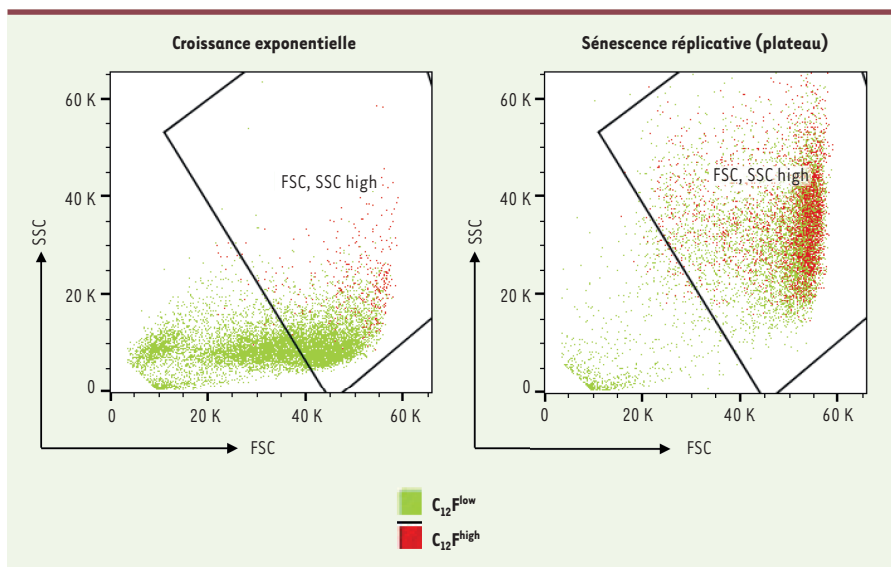


Figure 2. Exemple de dot plot montrant les paramètres FSC, SSC et activité β -Gal utilisés pour trier des cellules sénescents.

Analyse par cytométrie en flux de fibroblastes humains normaux de derme en phase de croissance exponentielle (à gauche) ou au plateau de sénescence répliative (à droite). Les valeurs de FSC (en abscisse) et SSC (en ordonnée) sont représentées par un graphique en points (*dot plot*). Les valeurs d'intensité du $C_{12}F$ sont représentées par un code couleur (faible en vert et forte en rouge). Dans cet exemple, les fenêtres de tri des cellules sénescents ont été établies sur l'activité β -Gal ($C_{12}F^{\text{High}}$), puis sur la taille (FCS^{High}) et la granularité (SSC^{High}).

des cellules sénescents, le réglage des PMT est assez délicat car il doit permettre de bien prendre en compte à la fois les cellules non sénescents, qui ont des valeurs standards de FSC et SSC, et les cellules sénescents qui, elles, peuvent présenter des valeurs de FSC et SSC très grandes. Si l'on applique un réglage de PMT standard, les cellules sénescents les plus grosses et qui sont granulaires peuvent donc ne pas être visualisées correctement, se retrouvant alors au niveau des limites supérieures du graphe d'analyse. Dans ce cas, il peut s'avérer nécessaire d'ajouter un filtre atténuateur (*Figure 4*).

L'auto fluorescence des cellules sénescents

En raison du stress oxydant qu'elles subissent, les cellules sénescents accumulent dans leurs lysosomes de la lipofuscine, un agrégat non dégradable, principalement formé de protéines et de lipides oxydés. La lipofuscine émet une fluorescence intrinsèque (auto fluorescence) dans une large gamme de longueurs d'onde d'excitation et d'émission, qui dépendent de la composition exacte des agrégats et de leur concentration [27–29]. Des fibroblastes humains transformés par le virus SV40 et induits en SIPS par des traitements répétés par l'hydroxyurée présentent ainsi une auto fluorescence dans le canal d'émission de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et dans celui de l'allophycocyanine (APC), deux canaux qui sont utilisés pour mesurer l'activité β -Gal, respectivement avec les substrats $C_{12}FDG$ et DDAOG (*Figure 5A*). Aussi, si un marqueur fluorescent est introduit comme critère de tri (dans le protocole présenté, il s'agira du substrat de la β -Gal), cette auto fluorescence des cellules sénescents, plus importante que celle des cellules non sénescents, peut induire un biais dans l'analyse. Il est donc indispensable de réaliser deux contrôles négatifs : des cellules non sénescents non marquées, et, surtout, des cellules sénescents non marquées mais qui seront autofluorescentes (*Figure 5*).

La sévérité du tri

Afin de sélectionner des sous-populations de cellules présentant un phénotype sénescents marqué, il est tentant de réaliser un tri sévère, par exemple de seulement 15 % des cellules. Ces populations de cellules présentant des valeurs très importantes de FSC, de SSC et d'activité β -Gal peuvent cependant avoir atteint le stade de mort cellulaire, et ne pourront pas être cultivées après le tri. Cela est particulièrement vrai lorsque la sénescence résulte d'un stress génotoxique ou d'un stress oxydant [17]. Cela est moins vrai pour des fibroblastes en RS, un sous-type de sénescence peu ou pas associée à la mort cellulaire. En règle générale, il est donc préconisé de trier 30 % de cellules sénescents, c'est-à-dire de cellules $FSC^{\text{High}}/SSC^{\text{High}}$ et $C_{12}F$ ou $DDAOG^{\text{High}}$.

Efficacité et qualité du tri

Bien que le tri de cellules de grande taille soit délicat, l'efficacité du tri de cellules sénescents avoisine 90 % d'efficacité [20]. Les cellules sénescents triées sont viables et sont capables d'adhérer sur des boîtes de culture cellulaire pour leur analyse, puis, éventuellement, selon le type cellulaire ou l'inducteur de sénescence utilisé, d'échapper au phénotype sénescents et d'à nouveau proliférer [17–20, 30].

Le phénotype sénescents étant multiparamétrique, nous avons vérifié qu'un tri fondé sur trois marqueurs, la taille, la granularité et l'activité β -Gal des cellules, était suffisant pour obtenir des cellules pleinement sénescents, qui expriment égale-

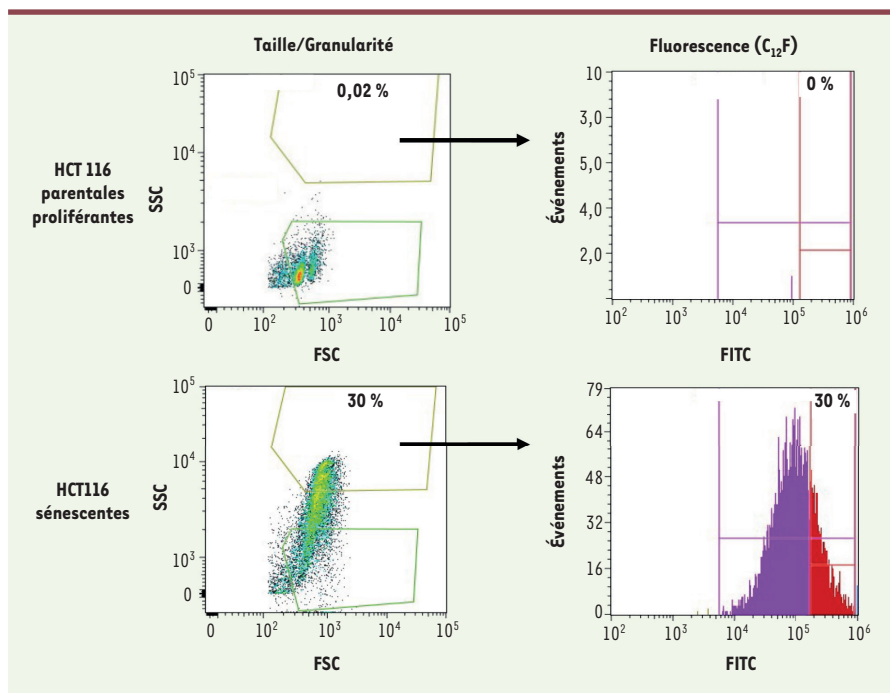


Figure 3. Exemple de tri d'une lignée de cellules cancéreuses induites en TIS. Les cellules cancéreuses coliques HCT116 ont été induites en TIS par un traitement à faible dose (2 nM) de SN38 (7-éthyl-10-hydroxycamptothécine), un inhibiteur de la topoisomérase I, pendant 4 jours. À gauche : représentation en graphique en points des valeurs FSC (abscisse) et SSC (ordonnée) des HCT116 parentales proliférantes (en haut) ou induites en TIS (en bas) avec matérialisation des fenêtres de tri. Les fenêtres sont matérialisées en vert (FSC^{low} / SSC^{low}) et en kaki (FSC^{high} / SSC^{high}). Le pourcentage de cellules dans la fenêtre FSC^{high} / SSC^{high} est indiqué. À droite : représentation en histogramme de l'intensité de fluorescence (FITC) des cellules présentes dans les fenêtres FSC^{high} / SSC^{high} , avec indication du seuil d'intensité de fluorescence utilisé pour le tri.

ment d'autres marqueurs de sénescence. Les fibroblastes humains normaux de derme (NHDF) entrés en RS et triés en fonction des trois marqueurs pré-définis présentent des foyers de 53BP1 (*P53 binding protein 1*), un marqueur de télomères dysfonctionnels. De plus, ces cellules ainsi triées expriment p21 (CDKN1), l'inhibiteur de cycline-CDK majoritairement impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire des fibroblastes en RS [20]. L'association unique de ces trois marqueurs semble donc suffisante pour obtenir, après le tri, des cellules pleinement sénescentes. Trier uniquement selon la taille et la granularité des cellules pourrait paraître suffisant, les cellules les plus positives pour l'activité β -Gal étant les cellules les plus grosses et les plus granulaires (voir [19] et Figure 2).

Le protocole qui a été développé peut s'appliquer à différents types de cellules induites en sénescence dans différents contextes. Des NHEK en SIPS spontanée *in vitro* [31, 30] ont été triés, en utilisant un cytomètre équipé d'une buse de 130 μ m de diamètre, et uniquement selon deux paramètres : le couple FSC et SSC, ou le couple FSC et intensité de marquage spécifique des lysosomes par le LysoTracker®. Ce protocole a permis de trier des sous-populations présentant un taux différentiel de mort cellulaire *versus* d'échappement à la sénescence, et de montrer que ces devenir différentiels dépendaient du niveau de stress oxydant et du niveau d'activité autophagique des sous-populations de cellules sénescentes [15–17]. Des NHDF en RS et en TIS induite par radiothérapie ont été triés quant à eux selon le protocole fondé sur les trois critères de taille, de granularité et d'activité β -Gal. La très grande taille de ces cellules a nécessité d'utiliser une buse de 200 μ m de diamètre [19, 20]. Le protocole fondé sur l'utilisation des trois critères de taille, de granularité

et d'activité β -Gal est désormais également appliqué à des lignées de fibroblastes transformés par le virus SV40 et induits en SIPS par un traitement répété par l'hydroxyurée (Figure 4 et Figure 5). Enfin, ce protocole a aussi été utilisé récemment pour des lignées de cellules cancéreuses induites en TIS (Figure 3). Dans ces deux derniers cas, un cytomètre équipé d'une buse de diamètre de 130 μ m s'est avéré suffisant.

Les limites

Le tri des cellules sénescentes par cytométrie en flux présente les limites habituelles de la technique, la principale étant sans doute la lenteur du processus. Bien que la pureté de la population triée soit très satisfaisante, elle n'atteint jamais 100 %. Le DEPArray®⁶, un instrument de tri cellulaire fondé sur des critères issus d'analyses d'image, permet, en théorie, de trier des cellules avec une pureté de 100 %, mais le nombre total de cellules récupérées n'excède pas quelques milliers. Tous les cytomètres en flux-trieurs ne sont pas équipés, voire ne peuvent

⁶ Le DEPArray™ est un trieur numérique qui combine des éléments microfluidiques et microélectroniques permettant un isolement, fondé sur l'image, de cellules uniques, dont le transcriptome peut ensuite être analysé par des méthodes de séquençage de nouvelle génération.

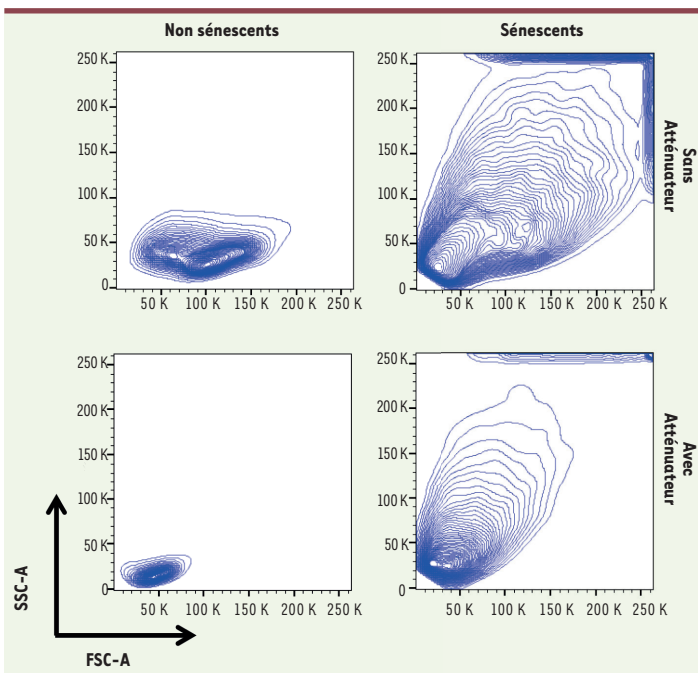


Figure 4. Effet d'un filtre atténuateur sur la visualisation de fibroblastes humains transformés sénescents. Analyse en taille (FSC)/structure (SSC) de populations de fibroblastes transformés par le virus SV40, proliférants (à gauche) ou induits en SIPS par traitement répété à l'hydroxyurée (à droite), avec ou sans filtre atténuateur (respectivement en bas et en haut).

être équipés, d'une buse de grand diamètre. Ce qui limite leur utilisation pour l'application de ce type d'analyse.

Conclusion

Le protocole de tri de cellules sénescents que nous avons présenté peut être adapté à différents types cellulaires qui ont été induits en sénescence dans différents contextes. Il serait possible d'augmenter le nombre de marqueurs utilisés pour le tri, en prenant en compte, par exemple, le niveau d'expression de CD26 et l'intensité du marquage par le LysoTracker, en plus des trois paramètres de taille, de granularité et d'activité β -Gal. L'autofluorescence des cellules sénescents doit être prise en compte de façon adéquate, puisqu'elle peut interférer avec les mesures d'intensité de certains marqueurs d'intérêt. Elle pourrait aussi être utilisée comme critère de tri [21] (Figure 5B), mais les longueurs d'onde d'excitation et d'émission devraient être adaptées à chaque type cellulaire et à chaque inducteur, car la composition exacte des agrégats autofluorescents est variable et fait varier la sensibilité aux différentes longueurs d'onde. La cytométrie spectrale, qui permet de définir le spectre d'autofluorescence d'un type cellulaire sur l'ensemble du banc optique du cytomètre comme un paramètre indépendant, apporterait une solution pertinente et efficace pour définir cette autofluorescence comme un paramètre de tri. \diamond

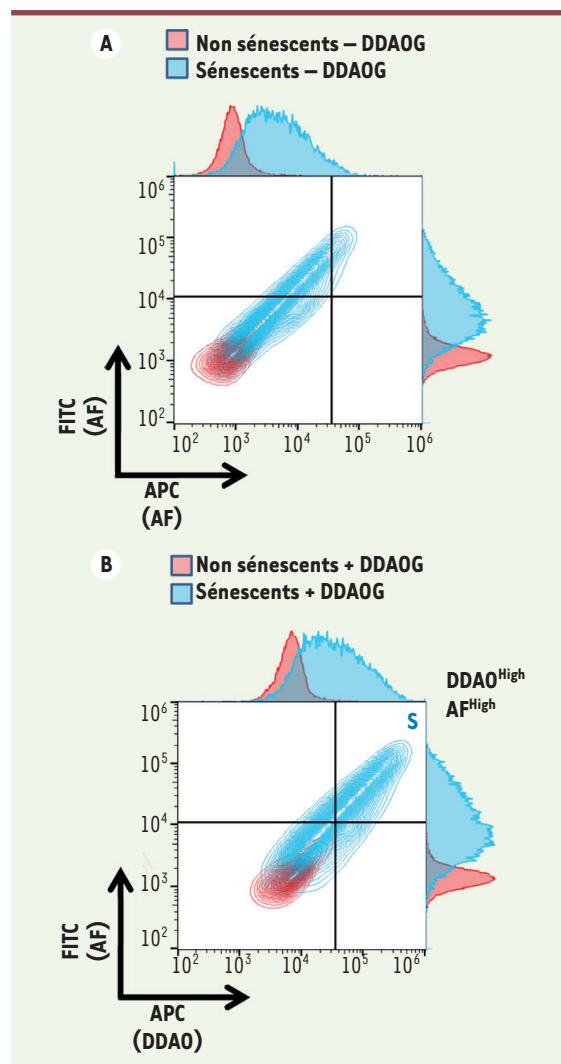


Figure 5. Mise en évidence de l'autofluorescence des cellules sénescents et utilisation comme marqueur additionnel de sénescence.

A. Représentation en histogramme et en graphique de lignes de densité cellulaire de l'intensité de l'autofluorescence (AF) dans les canaux FITC (en ordonnée) et APC (en abscisse) de fibroblastes humains transformés par le virus SV40, proliférants (en rose) ou induits en SIPS par traitement répété à l'hydroxyurée (en bleu). **B.** Utilisation de l'autofluorescence en combinaison avec la sonde DDAOG pour quantifier et trier des fibroblastes transformés par le virus SV40 induits en SIPS par l'hydroxyurée (quadrant S : DDAO^{High}/AF^{High}).

SUMMARY

Sorting of senescent cells by flow cytometry : Specificities and pitfalls to avoid

Cells can be reprogrammed into senescence to adapt to a variety of stresses, most often affecting the genome integrity. Senescent cells accumulate with age or upon various insults in almost all tissues, and

contribute to the development of several age-associated pathologies. Studying the molecular pathways involved in senescence induction, maintenance, or escape is challenged by the heterogeneity in the level of commitment to senescence, and by the pollution of senescent cell populations by proliferating pre- or post-senescent cells. We coped with these difficulties by developing a protocol for sorting senescent cells by flow cytometry, based on three major senescence markers: the SA- β -Galactosidase activity, the size of the cells, and their granularity reflecting the accumulation of aggregates, lysosomes, and altered mitochondria. We address the issues related to sorting senescent cells, the pitfalls to avoid, and propose solutions for sorting viable cells expressing senescent markers at different extents. \diamond

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans cette synthèse ont été soutenus par le CNRS, l'université de Lille, l'Institut Pasteur de Lille, la Ligue contre le cancer (Comité du Pas-de-Calais, Comité de la Somme, Comité du Nord), le Cancéropôle Nord-Ouest, le SIRIC OncoLille (Grant INCA-DGOS-Inserm 6041), le contrat de Plan État Région CPER Cancer 2015-2020 et l'Institut national du cancer (INCA_16078). ER et AP bénéficient d'un contrat doctoral de l'université de Lille et de la région Hauts-de-France. EG a bénéficié d'un contrat doctoral de l'Institut Pasteur de Lille et de la région Hauts-de-France. Nous remercions les services de cytométrie (campus hospitalier et campus Calmette) des Plateformes Lilloises en Biologie Santé (PLBS) – UAR 2014 – US 41.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Hayflick L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965 ; 37 : 614–36.
- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961 ; 25 : 585–621.
- Ramirez RD, Morales CP, Herbert BS, et al. Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev* 2001 ; 15 : 398–403.
- Chaib S, Tchkonja T, Kirkland JL. Cellular senescence and senolytics : the path to the clinic. *Nat Med* 2022 ; 28 : 1556–68.
- Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, et al. Cellular Senescence : Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev* 2019 ; 99 : 1047–78.
- Bousset L, Gil J. Targeting senescence as an anticancer therapy. *Mol Oncol* 2022 ; 16 : 3855–80.
- Abbadie C, Pluquet O, Pourtier A. Epithelial cell senescence : an adaptive response to pre-carcinogenic stresses ? *Cell Mol Life Sci* 2017 ; 74 : 4471–509.
- Pluquet O, Pourtier A, Abbadie C. The unfolded protein response and cellular senescence. A review in the theme : cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014 ; 308 : C415–25.
- Malaquin N, Martinez A, Rodier F. Keeping the senescence secretome under control : Molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Exp Gerontol* 2016 ; 82 : 39–49.
- Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, et al. Cellular senescence in ageing : from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021 ; 22 : 75–95.
- Hu L, Li H, Zi M, et al. Why Senescent Cells Are Resistant to Apoptosis : An Insight for Senolytic Development. *Front Cell Dev Biol* 2022 ; 10 : 822816.
- Gao J, Pickett HA. Targeting telomeres : advances in telomere maintenance mechanism-specific cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 2022 ; 22 : 515–32.
- Goy E, Abbadie C. Senescence et cancer : double jeu. *Med Sci (Paris)* 2018 ; 34 : 223–30.
- Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol* 2018 ; 28 : 436–53.
- Gosselin K, Deruy E, Martien S, et al. Senescent keratinocytes die by autophagic programmed cell death. *Am J Pathol* 2009 ; 174 : 423–35.
- Deruy E, Gosselin K, Vercamer C, et al. MnSOD upregulation induces autophagic programmed cell death in senescent keratinocytes. *PLoS One* 2010 ; 5 : e12712.
- Deruy E, Nassour J, Martin N, et al. Level of macroautophagy drives senescent keratinocytes into cell death or neoplastic evasion. *Cell Death Dis* 2014 ; 5 : e1577.
- Nassour J, Martien S, Martin N, et al. Defective DNA single-strand break repair is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells. *Nat Commun* 2016 ; 7 : 10399.
- Goy E, Tomezak M, Facchin C, et al. The out-of-field dose in radiation therapy induces delayed tumorigenesis by senescence evasion. *eLife* 2022 ; 11 : e67190.
- Goy E, Martin N, Drullion C, et al. Flow Cytometry-based Method for Efficient Sorting of Senescent Cells. *BIO-Protoc.* 2023 ; 13.
- Flor AC, Doshi AP, Kron SJ. Modulation of therapy-induced senescence by reactive lipid aldehydes. *Cell Death Discov* 2016 ; 2 : 16045.
- Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, et al. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc* 2009 ; 4 : 1798–806.
- Kim KM, Noh JH, Bodogai M, et al. Identification of senescent cell surface targetable protein DPP4. *Genes Dev* 2017 ; 31 : 1529–34.
- Admasu TD, Kim K, Rae M, et al. Selective ablation of primary and paracrine senescent cells by targeting iron dyshomeostasis. *Cell Rep* 2023 ; 42 : 112058.
- Verhulst E, Garnier D, De Meester I, et al. Validating Cell Surface Proteases as Drug Targets for Cancer Therapy : What Do We Know, and Where Do We Go ? *Cancers* 2022 ; 14 : 624.
- Greenberg SB, Grove GL, Cristofalo VJ. Cell size in aging monolayer cultures. *In Vitro* 1977 ; 13 : 297–300.
- Terman A, Brunk UT. Oxidative Stress, Accumulation of Biological "Garbage", and Aging. *Antioxid Redox Signal* 2006 ; 8 : 197–204.
- Yin D. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radic Biol Med* 1996 ; 21 : 871–88.
- Pantelis P, Theocharous G, Lagopati N, et al. The Dual Role of Oxidative-Stress-Induced Autophagy in Cellular Senescence : Comprehension and Therapeutic Approaches. *Antioxidants* 2023 ; 12 : 169.
- Gosselin K, Martien S, Pourtier A, et al. Senescence-associated oxidative DNA damage promotes the generation of neoplastic cells. *Cancer Res* 2009 ; 69 : 7917–25.
- Bernard D, Gosselin K, Monte D, et al. Involvement of Rel/NF-kappaB transcription factors in keratinocyte senescence. *Cancer Res* 2004 ; 64 : 472–81.

TIRÉS À PART
C. Abbadie



Tarifs d'abonnement m/s - 2024

Abonnez-vous
à médecine/sciences

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Abonnez-vous sur
www.medecinesciences.org

