



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Rôle du TGF-1 dans le contrôle de l'expression génique de la sénescence induit par les stress oxydatifs

Zdanov, Stéphanie

*Award date:*  
2000

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



---

**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Rôle du TGF- $\beta$ 1 dans le contrôle de l'expression génique de la sénescence  
induit par les stress oxydatifs.**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

Stéphanie Zdanov

Juin 2000

~~LBS 878 1652~~

2059197

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix  
FACULTE DES SCIENCES  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

## Rôle du TGF- $\beta$ 1 dans le contrôle de l'expression génique de la sénescence induit par les stress oxydatifs

ZDANOV Stéphanie

### Résumé

Des biomarqueurs de la sénescence répllicative apparaissent prématurément lorsque des fibroblastes humains sont soumis à un stress sublétal sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Parmi ces biomarqueurs, on trouve une morphologie cellulaire typique, une activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (S-A  $\beta$ -gal), la surexpression de certains gènes dont la fibronectine, l'ostéonectine, SM22 et l'apolipoprotéine J, et un blocage irréversible du cycle cellulaire.

Nous avons étudié le rôle du TGF- $\beta$ 1 produit après ces stress, dans l'apparition de ces biomarqueurs. En ce qui concerne l'arrêt irréversible du cycle cellulaire, le TGF- $\beta$ 1 ne semble pas réguler l'effet anti-prolifératif des stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ceci est suggéré par nos résultats obtenus en suivant le niveau d'incorporation de thymidine dans l'ADN et le niveau d'ARN de la protéine p21<sup>waf-1</sup>. Par contre nos résultats suggèrent que le TGF- $\beta$ 1 régule l'apparition de la morphologie sénescence, de la S-A  $\beta$ -gal et l'augmentation du niveau d'ARN des gènes cités ci-dessus.

En conclusion, le TGF- $\beta$ 1 semble réguler partiellement l'établissement de la sénescence induite par les stress sublétaux.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2000

Promoteur: J. Remacle

Directeur de mémoire: O. Toussaint

Et voici que se terminent quatre années d'étude...

Au terme de ce travail, je tiens à remercier, le professeur José Remacle de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire.

Mes remerciements vont ensuite, tout spécialement à l'équipe des GRAS :

Olivier, pour sa clairvoyance, sa sérénité permanente et sa bonne humeur. Travailler au sein de ton équipe à été très enrichissant.

Jean Jean, pour la folle nuit passée à réaliser la mise en page de ce mémoire

Thierry, Flo, Patrick et Joao, pour l'attention que vous m'avez portée.

Et enfin, toi, Christophe, qui a guidé mes premiers pas dans le laboratoire. Tes vouvoiements du début m'ont quelques peu surprise, mais j'ai appris à découvrir l'oiseau rare que tu es. Je tiens à te signaler que je n'ai pas oublier ton beau briquet bleu.

Je tiens également à remercier tous les URBCéens, et plus particulièrement toi ZAZA pour les match de volley follement sportif, nos discussions durant les temps d'incubation, (et même en dehors) ta bonne humeur permanente, ton dynamisme et plein d'autres choses encore (CORE).

Je remercie chaleureusement Vanko, Amélie, Marielle et Patricia, avec qui j'ai partagé le bureau durant ces quelques mois. Apprendre à mieux vous connaître a été une expérience agréable.

Merci aussi à vous les "copains", Willy, Snoorky et Oli pour avoir su mettre du piment dans notre vie d'étudiant. Et puis toi, JP, qui a toujours eu le génie de me faire rire.

Enfin, un grand merci à vous mes parents, qui m'avez donné la possibilité de poursuivre des études scientifiques. Vos encouragements, votre soutien au moment difficile ainsi que votre confiance, ont été plus que bénéfiques. Merci aussi à vous, mes frangins, Nadège, Natacha, Boris et miss Nastya, sans qui la vie à la maison serait monotone.

## Table des matières.

<u>I : Introduction.</u>	Pages
<b><u>Première partie : Etude du vieillissement cellulaire <i>in vitro</i>.</u></b>	
1. La sénescence répllicative.	1
2. Les biomarqueurs liés à la sénescence.	2
2.1. Modification morphologique associée à la sénescence : les morphotypes.	2
2.2. Modification histochimique : l'activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence.	2
2.3. L'altération du génome mitochondrial.	3
2.4. Le raccourcissement des télomères.	3
2.5. Duplication de l'ADN et synthèse protéique.	4
2.6. Régulation du cycle cellulaire.	5
2.6.1. Les gènes de réponses précoces.	5
2.6.2. Répression des gènes impliqués en fin de phase G1 et à la limite G1-S.	6
2.6.3. Répression des cyclines et de kinases dépendantes de cyclines (CDK).	6
2.6.4. p53, p21 <sup>Waf-1</sup> et pRb.	7
3. Relations entre stress et le vieillissement <i>in vitro</i> .	8
<b><u>Seconde partie : Les effets du TGF-<math>\beta</math>1 sur la progression du cycle cellulaire.</u></b>	
1. Généralités.	10
2. Pourquoi s'intéresser au TGF- $\beta$ 1?	10
<b><u>But du mémoire</u></b>	11

## **II : Matériels et méthodes.**

1. La culture cellulaire.	13
1.1. Décongélation des cellules.	13
1.2. Repiquage des cellules.	14
1.3. La congélation des cellules.	14
1.4. Stress à l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	15
2. Détection de l'activité S-A β-galactosidase.	16
3. Mesure de la synthèse d'ADN par incorporation de thymidine tritiée.	17
4. Extraction de protéines nucléaires.	18
5. Le dosage des protéines par la méthode de Bradford.	19
6. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).	20
6.1. Marquage et purification des sondes.	20
6.2. Liaison sonde-protéine et électrophorèse.	22
7. L'extraction d'ARN total de cultures cellulaires.	24
8. La transcription inverse suivie d'une amplification par PCR.	26
8.1. Préparation du mix réactionnel et conditions RT-PCR.	26
8.2. Electrophorèse en gel d'agarose.	27
8.3. Electrophorèse en gel de polyacrylamide non dénaturant.	28
9. RPA (RNase Protection Assay).	31
9.1. Synthèse de la sonde.	31
9.2. Préparation de l'ARN et hybridation.	32
9.3. Traitement des échantillons à la RNase.	33
9.4. Migration.	34
10. Immunofluorescence.	35

11. Séquençage.	36
-----------------	----

### **III : Résultats et Discussions.**

1. Etude de l'expression du TGF- $\beta$ 1 au cours du temps lors du vieillissement accéléré par des stress oxydatifs.	38
2. Apparition de biomarqueurs de la sénescence répllicative après stimulation des fibroblastes IMR-90 avec du TGF- $\beta$ 1.	40
2.1. Effet du TGF- $\beta$ 1 sur l'activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence.	40
2.2. Effet du TGF- $\beta$ 1 sur l'expression de 4 gènes ayant une variation d'expression spécifique de la sénescence.	41
3. Etude de la morphologie, de l'activité S-A $\beta$ -gal et de l'expression des 4 gènes, après neutralisation du TGF- $\beta$ 1.	43
4. Effet du TGF- $\beta$ 1 sur la capacité proliférative des fibroblastes IMR-90, 72 heures après un stress.	46
5. Etude de l'influence du TGF- $\beta$ 1 sur l'expression de p21 <sup>Waf-1</sup> , 72 heures après un stress sous peroxyde d'hydrogène.	48
6. Etude de la translocation des Smad à l'intérieur du noyau suite à un stress à l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	50

### **IV. Conclusions et perspectives.**

### **V. Bibliographie.**

### **VI. Annexe.**



## Liste des abréviations.

<b>A</b>	adénine
<b>Anti-TGF-<math>\beta</math>1 RII</b>	anticorps anti récepteur II du TGF- $\beta$ 1
<b>AB</b>	antibiotique
<b>ADN</b>	acide déoxyribonucléique
<b>APS</b>	persulfate d'ammonium
<b>ARNm</b>	acide ribonucléique messenger
<b>ARNt</b>	acide ribonucléique de transfert
<b><math>\beta</math>-gal</b>	$\beta$ -galactosidase
<b>bp</b>	paire de bases
<b>C</b>	cytosine
<b>Cdks</b>	kinases dépendantes de cyclines
<b>CPM</b>	coups par minute
<b>DMSO</b>	diméthylsulfoxyde
<b>dNTPs</b>	déoxynucléotides
<b>D.O.</b>	densité optique
<b>EDTA</b>	éthylène diamine tétraacétate
<b>FBS</b>	fœtal bovin serum
<b>g</b>	gramme
<b>G</b>	guanine
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peroxyde d'hydrogène
<b><math>\mu</math></b>	micro
<b>m</b>	milli
<b>M</b>	molaire
<b>MEM</b>	modified eagle medium
<b>MF</b>	morphotype mitotique
<b>min</b>	minute
<b>n</b>	nanogramme
<b>PBS</b>	phosphate buffer saline
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction
<b>PMF</b>	morphotype postmitotique
<b>PRB</b>	protein retinoblastoma
<b>RPA</b>	Rnase protection assay
<b>Rpm</b>	round per minute

<b>RT-PCR</b>	reverse transcriptase polymerase chain reaction
<b>SDS</b>	dodécylsulfate de sodium
<b>Sec</b>	seconde
<b>T</b>	thymine
<b>T25 / T75</b>	boîtes de culture de 25 / 75 cm <sup>2</sup>
<b>TBE</b>	tampon trisborate-EDTA
<b>t-BHP</b>	<i>tert</i> -butylhydroperoxide
<b>TEMED</b>	N,N,N',N',-tetraméthyléthylènediamine
<b>TGF-β1</b>	transforming growth factor β1
<b>Tris</b>	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
<b>UV</b>	ultraviolet
<b>V</b>	base dégénérée (= A,C ou G)
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-chloro-3-indoly β-Dgalactopyranoside
<b>°C</b>	degré Celsius
<b><sup>32</sup>P</b>	radioisotope 32 du phosphore

# *Introduction*

## Première partie : Etude du vieillissement cellulaire *in vitro*.

### 1. La sénescence répllicative.

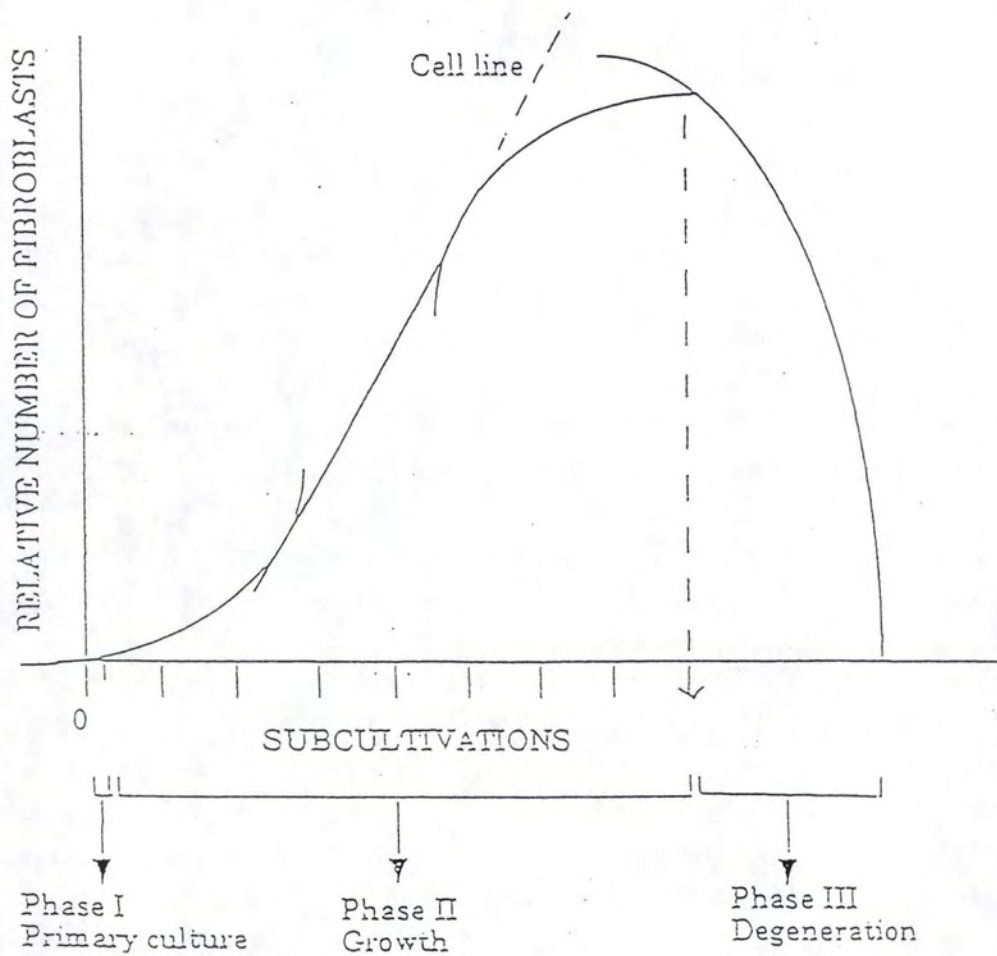
En 1961, L. Hayflick et P. Moorhead montrèrent l'évolution du potentiel prolifératif au cours du temps (Hayflick, L. et Moorhead, P., 1961).

Durant leurs travaux, ils observèrent que des fibroblastes d'embryon humain se divisent un nombre limité de fois, correspondant à environ 50 passages en culture. En effet lorsque le potentiel prolifératif est atteint, les cellules arrêtent de se diviser de manière irréversible, tout en restant métaboliquement actives. Ce phénomène est communément appelé « Sénescence répllicative ». Les cellules sénescents restent viables *in vitro* pendant des mois voire des années et finissent par mourir par nécrose. Les cellules sénescents ne peuvent mourir par apoptose puisqu'elles sont caractérisées par un blocage de leur cycle cellulaire en phase G1, or pour avoir apoptose, il faut terminer la phase G1.

De plus, ils établirent un modèle illustrant la sénescence. Celui-ci présente trois phases bien distinctes (**Figure I-1**). La phase 1 se rapporte à la mise en culture de cellules à partir d'un tissu d'origine. La phase 2 est une phase exponentielle durant laquelle les cellules se divisent activement. Cette deuxième phase se termine par une diminution de la vitesse de duplication. La phase 3 correspond à l'arrêt irréversible des mitoses.

Ce modèle fut par la suite généralisé à de nombreux types cellulaires prolifératifs ainsi qu'à de nombreuses espèces animales.

Des études effectuées par l'équipe de Martin *et al* nous apprennent que le nombre maximum de passages en culture diminuait lorsque l'âge de l'individu donneur augmentait (Martin, M., *et al*, 1970).



**Figure I-1 :** Illustration du phénomène de sénescence répliquative des cellules en culture.

Succession des phases de mise en culture (phase I), de prolifération (phase II) et de dégénérescence précédant la mort des cellules (phase III).

## **2. Les biomarqueurs liés à la sénescence.**

### **2.1. Modification morphologique associée à la sénescence : les morphotypes.**

Les études de l'équipe de Bayreuther montrèrent qu'il est possible de classer les fibroblastes humains en 7 classes morphologiques bien distinctes au cours de leurs différents passages en culture (Bayreuther, K., *et al*, 1988).

Bayreuther proposa d'appeler "morphotypes" ces différentes morphologies apparaissant au cours du vieillissement des fibroblastes. Il avait aussi proposé que le passage d'un morphotype à l'autre était graduel, en d'autre terme que ces différents morphotypes représentaient des états de différenciation bien distincts. À ce jour, aucun argument expérimental définitif n'a démontré cette hypothèse (Toussaint, O., *et al*, 1998).

On peut classer ces morphotypes en trois catégories : (**Figure I-2**)

Les morphotypes mitotiques (MFI, II et III) sont caractérisés par leur petite taille et par leur capacité de se diviser activement. On rencontre essentiellement ces morphotypes dans les cultures de fibroblastes provenant d'une biopsie de peau réalisée chez des individus jeunes.

En revanche, les morphotypes post-mitotiques (MFIV, V et VI) se retrouvent en majorité dans les cultures de cellules vieilles. Ces cellules sont plus étendues et plus larges.

Enfin, le septième morphotype correspond à des cellules nécrotiques et est très rarement observable (Toussaint, O., *et al*, 1992b).

In vitro, la proportion des différents morphotypes varie en fonction du nombre de doublements de population atteint par les cellules en culture.

Les expériences faites sur des fibroblastes humains de poumon fœtal WI-38 et AGO4432 nous le prouvent (**Figure I-3**).

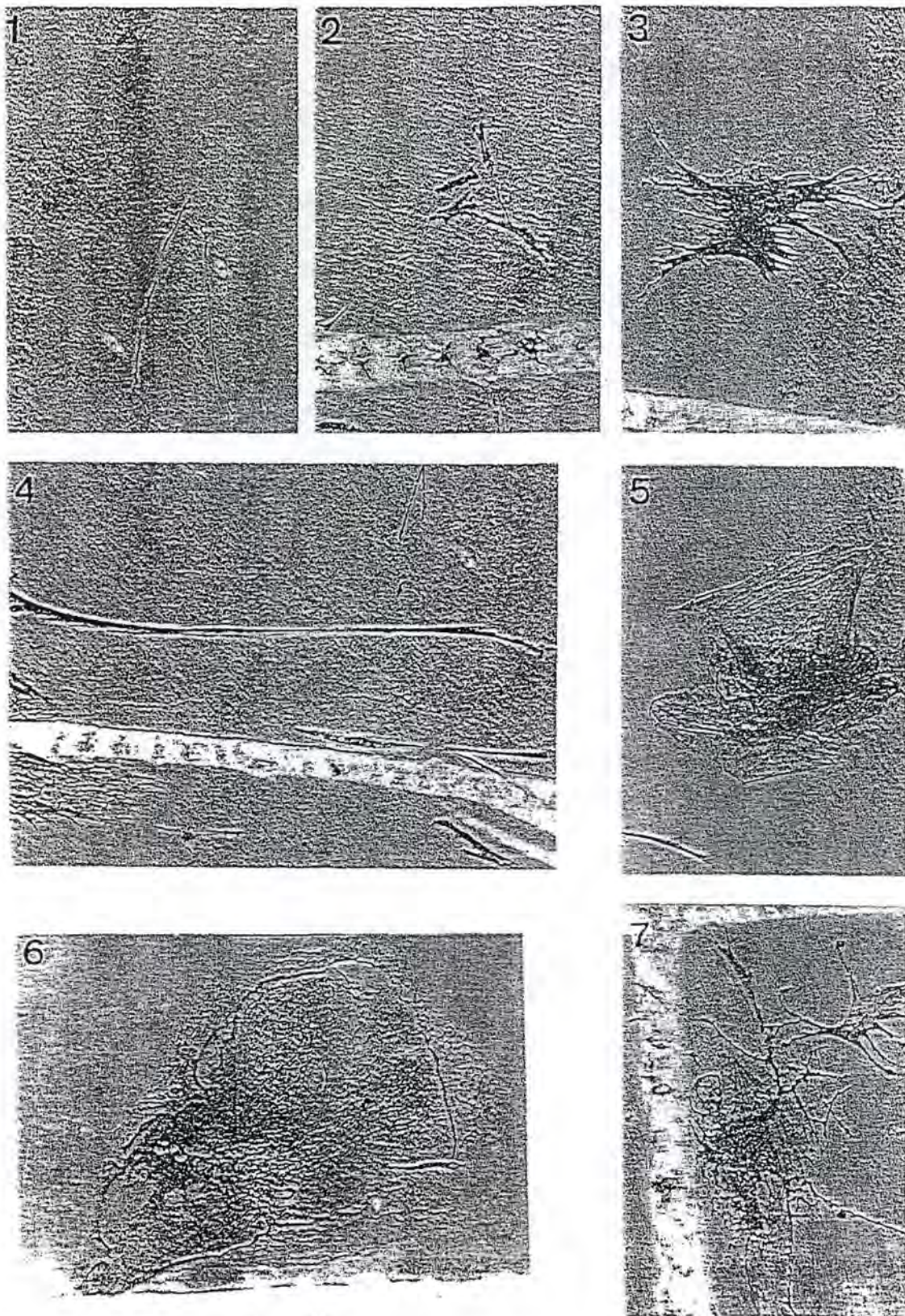
On constate que la proportion de fibroblastes de morphotype I n'est plus que de 10 % au quinzième passage en culture alors que la proportion de morphotype II est encore de 90 %. Par la suite, on observe une diminution des MFII au profit des MFIII.

Enfin, les morphotypes post-mitotiques apparaissent lentement et s'accumulent lors des derniers passages en culture. (Toussaint, O., *et al*, 1998).

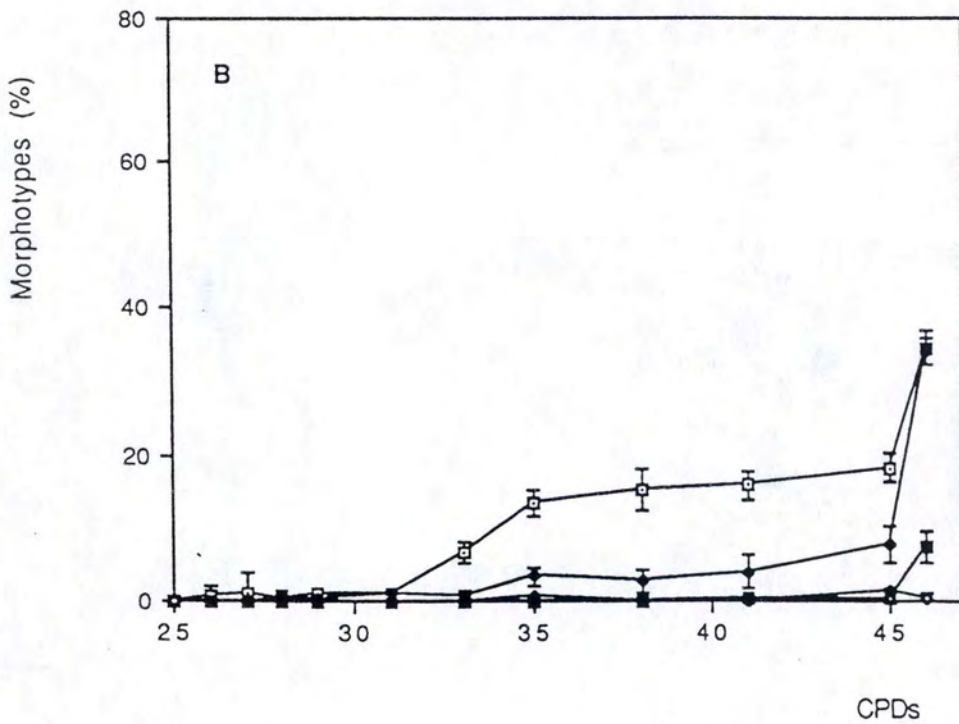
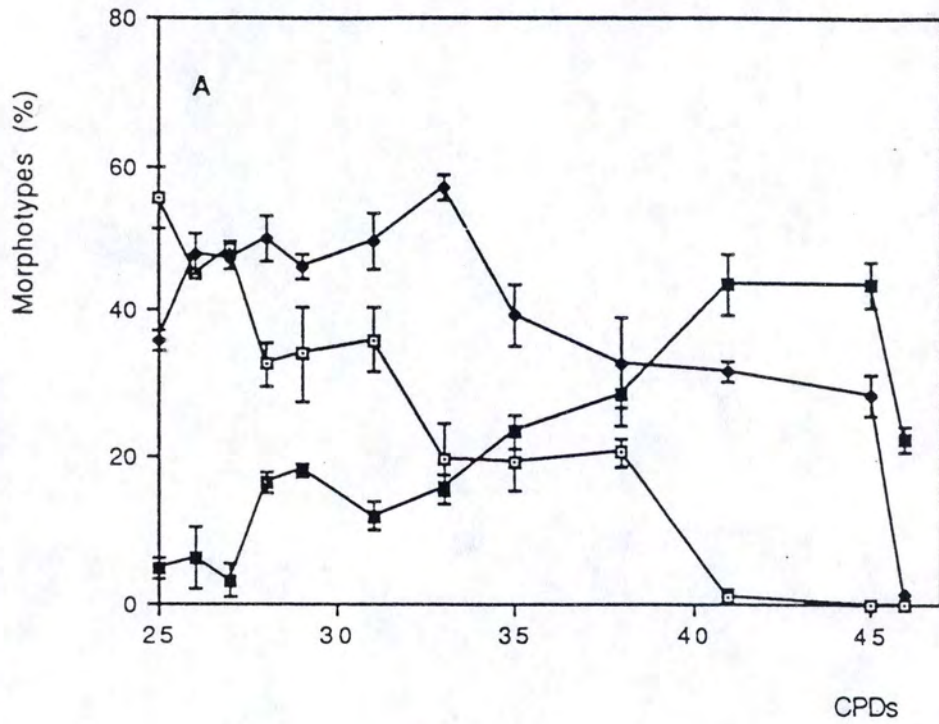
En bref, nous retiendrons que ces morphotypes constituent un excellent outil pour l'étude du vieillissement in vitro.

### **2.2. Modification histochimique : l'activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence.**

Les cellules sénescents, c'est-à-dire n'étant plus capables de se diviser, présentent une activité  $\beta$ -galactosidase spécifique, habituellement appelée « Senescence-Associated  $\beta$ -galactosidase Activity » (S-A  $\beta$ -gal) (Dimri, G.P., *et al*, 1995).



**Figure I-2 :** Morphotypes mitotiques et post-mitotiques des fibroblastes humains WI-38. (1) Fibroblaste mitotique MFI (2) Fibroblaste mitotique MFII (3) Fibroblaste mitotique MFIII (4) Fibroblaste post-mitotique PMFIV (5) Fibroblaste post-mitotique PMFV (6) Fibroblaste post-mitotique PMFVI (7) Fibroblaste post-mitotique dégénéréscnt PMF VII.



**Figure I-3:** (A) Proportions des fibroblastes mitotiques WI-38 en fonction du nombre de passage en culture, MFI ( $\square$ ), MF II ( $\blacklozenge$ ) et MF III ( $\blacksquare$ ). (B) Proportions des fibroblastes post-mitotiques WI-38 en fonction du nombre de passage en culture, PMFIV ( $\square$ ), PMF V ( $\blacklozenge$ ) et PMF VI ( $\blacksquare$ ). (Toussaint, O. *et al*, 1992)



Lorsque l'on place ces cellules sénescents en présence d'un substrat, le 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranosine (X-gal), celles-ci se colorent en bleu à un pH optimal de 6, ce qui n'est pas le cas des cellules jeunes. Par contre, toutes les cellules sénescents ou non, se colorent en bleu si ce test est réalisé à un pH égal à 4, car elles contiennent toutes des lysosomes.

Actuellement, on explique toujours pas pourquoi une activité  $\beta$ -galactosidase est observée à pH 6 dans les cellules sénescents, cependant deux hypothèses ont été émises.

Soit par un épissage de l'ARN et/ou des modifications post-traductionnelles de l'enzyme, qui seraient différents au cours du vieillissement.

Soit par un élargissement du pic de pH optimal suite à une augmentation de la taille des lysosomes chez les cellules sénescents (Remacle, J., *et al*, 1980) et à une accumulation de la  $\beta$ -galactosidase normale

### **2.3. L'altération du génome mitochondrial.**

Les cellules ont besoin d'énergie pour leur métabolisme. Cette énergie provient essentiellement de la chaîne respiratoire des mitochondries produisant 36 ATP par molécule de glucose dégradée.

Les tissus à haute demande énergétique comme les myocytes ou les neurones, posséderont un plus grand nombre de mitochondries.

Ces organites contiennent de l'ADN sous forme de molécules circulaires de 16569 paires de bases. Ces gènes codent pour des enzymes capitales de la respiration mitochondriale.

Avec le vieillissement, de nombreuses mutations ponctuelles et délétions sont observables dans l'ADN mitochondrial.

Les délétions sont souvent de grande taille (jusqu'à 10,4 Kb) et portent sur des gènes essentiels au métabolisme énergétique.

### **2.4. Le raccourcissement des télomères.**

Les télomères sont des parties non codantes du génome nucléaire situés aux extrémités des chromosomes. Ils sont constitués par la répétition d'une courte séquence consensus (TTAGGG chez l'homme) et leur longueur est de plusieurs kilobases.

À la naissance de l'individu, ils sont longs de 10 à 15 Kb, puis au cours des divisions cellulaires, ils diminuent de taille à raison de 50 à 150 bp par passage en culture *in vitro* et de 15 à 50 bp par an *in vivo* (Harley, C., *et al*, 1990).

La théorie télomérique du vieillissement représente les télomères comme une horloge interne calculant le nombre de mitoses effectuées au cours du temps. Selon elle, la cellule deviendrait sénescents lorsqu'un télomère atteint une longueur critique.

D'un point de vue moléculaire, on ne connaît toujours pas le mécanisme qui induit le blocage des divisions cellulaires, toutefois une hypothèse principale a été proposée afin d'expliquer cette perte de capacité proliférative.

Cette hypothèse serait que la cellule perçoive ces raccourcissements télomériques comme des dommages à l'ADN. Cela entraînerait l'activation de c-abl, qui permettrait la transcription de p53 (facteur de transcription), qui lui-même activerait la transcription de p21<sup>Waf-1</sup>, ce qui conduirait à l'arrêt du cycle cellulaire. En bref, un télomère long bloquerait la transcription de certains inhibiteurs de croissance, tandis qu'un court l'activerait. (Campisi, J., *et al*, 1996)

Remarquons que les cellules germinales et immortelles, comme les cellules cancéreuses, ne subissent pas ce raccourcissement systématique au fil des divisions cellulaires. Ces dernières sont pourvues d'une télomérase (télomère synthase) qui grâce à sa sous-unité catalytique est capable de polymériser des nucléotides sur une matrice d'ARN.

Outre tout cela, de récents travaux effectués par l'équipe de Bodnar montrent qu'il est possible d'augmenter le potentiel prolifératif des fibroblastes humains normaux d'au moins 20 passages en culture à condition de les transfecter avec un vecteur comportant le cDNA codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase (Bodnar, G., *et al*, 1998).

Ces cellules en sont actuellement à 230 passages en culture selon les données communiquées par la firme Geron Corporation, USA.

### **2.5. Duplication de l'ADN et synthèse protéique.**

On a pu démontrer, grâce à la technique d'incorporation de thymidine tritiée, une diminution de la synthèse d'ADN par unité de temps chez les cellules âgées.

Par marquages utilisant de la [<sup>35</sup>S]-méthionine, on a mis en évidence une diminution de la quantité de protéines synthétisées par unité de temps, ceci n'empêchant nullement l'augmentation de la quantité de protéines particulières suite à une augmentation de synthèse ou une diminution de dégradation (**Tableau I-1, Tableau I-2 et I-3**).

Remarquons aussi qu'il existe une série de gènes qui voient leur transcription augmenter suite au processus du vieillissement *in vitro*, alors que la tendance générale est la baisse en ce qui concerne le taux de transcription moyen.

Gene/protein	Description/function	Expression
cdk2	Cyclin-dependent protein kinase-2	G1
cycA	Cyclin A, activator of cdk kinase	Late G1
cycB, cdc2	Active cdc2 kinase components	G2/M
DHFR	Dihydrofolate reductase	Late G1/S
E2F1	Component of E2F transcription factor	Mid-late G1
EPC1	Serine protease inhibitor	G0
c-fos	Component of AP-1 transcription factor	Early G0/G1
gas1, gas6	Growth arrest-specific genes	G0
his2a,2b,3,4	Replication-dependent histones	Late G1/S
hsp70, 90	Heat shock proteins 70 and 90	Stress-inducible late G1/S
Id1, Id2	Inhibitors of bHLH transcription factors	Early and mid-G1
IGF1	Insulin-like growth factor-1	G1
IL-6	Interleukin-6 multifunctional cytokine	G1
L7	Large ribosomal subunit protein	Constitutive
miG-5	Tissue inhibitor of metalloproteinase	G0/G1
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen/ DNA polymerase $\delta$ function	Late G1/S
pola	DNA polymerase $\alpha$	Late G1/S
RNR	Ribonucleotide reductase	Late G1/S
TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteinase	G0
TK	Thymidine kinase	Late G1/S
TS	Thymidylate synthetase	Late G1/S

**Tableau I-1 :** Gènes réprimés ou sous-exprimés chez les fibroblastes humains sénescents (Campisi, J. *et al*, 1996)

Gene/protein	Description/function
Cathepsin B	Protease
Collagen, $\alpha 1, 2$ (I)	Extracellular matrix component
Collagenase	Protease; extracellular matrix remodeling
Cyclins E and D	Regulatory components of cdks
EFl $\alpha$	Protein synthesis elongation factor
Fibronectin	Extracellular matrix component
IGFBP-3	Insulin-like growth factor binding protein
IL-1	Interleukin-1 $\alpha$ and -1 $\beta$ cytokines
p21 (sdi1)	Cyclin-dependent kinase inhibitor
SAG	Senescence-associated gene, function unknown
Statin	Nuclear protein, associates with pRb
Stromelysin	Protease; extracellular matrix remodeling
WS3-10	Calcium binding protein

Tableau I-2 : Gènes sur-exprimés chez les fibroblastes humains sénescents  
(Campisi, J. *et al*, 1996)

Gene/protein	Description/function	Modification
cdk	Cyclin-dependent protein kinase; G1 progression	Inhibition of activity; p21 association
Fibronectin	Extracellular matrix component	Novel antigenic determinant
Mortalin	hsp70-related	Intracellular localization
pRb	Tumor suppressor, growth inhibitor	Lack of phosphorylation
Prohibitin	Growth inhibitor	Loss of low-MW form; phosphorylation?
Terminin	Lysosomal?/unknown	Proteolysis to smaller peptide

Tableau I-3 : Modification post-traductionnelle chez les fibroblastes sénescents.  
(Campisi, J. *et al*, 1996)

## 2.6. Régulation du cycle cellulaire.

Pour une revue, voir Campisi, J., *et al*, 1999.

Le cycle cellulaire est divisé en 4 phases majeures, G1, S, G2 et M (**Figure I-4**).

De manière générale, la progression du cycle cellulaire est gouvernée par l'activité d'une famille de protéines kinases : « les cyclin dependent kinases » (CDK).

L'activité de ces kinases est modulée par l'association avec leur sous-unité régulatrice, les cyclines.

Comme décrit dans la figure I-4, les différents complexes cyclines /CDK sont exprimés et activés à travers les différentes phases du cycle cellulaire.

Les complexes cycline D-CDK4, 6 sont activés en premier en G1 en réponse à des stimuli mitogènes et restent actifs jusqu'à l'entrée en phase S.

Les complexes cycline E-CDK2 sont activés en fin de phase G1 et restent actifs jusqu'à la fin de la phase S.

Les complexes cycline A-CDK2 deviennent actifs en phase S et sont toujours présents jusqu'à la moitié de la phase G2.

Les complexes cycline A et B-cdc2 apparaissent à la mi-G2.

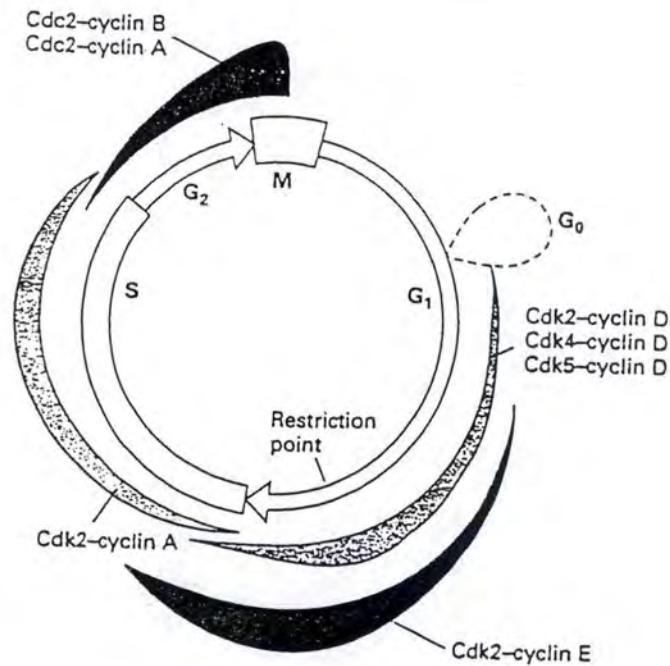
À la fin de la phase G1 se présente un point de restriction. Ce point a été défini par Pardee, et au-delà de ce point, les cellules continuent leur cycle jusqu'à la phase S. En effet, une fois ce point dépassé, les cellules ne répondent plus aux signaux inhibiteurs et n'ont plus besoin de signaux stimulateurs pour progresser jusqu'à la phase S (Pardee, A.B., *et al*, 1974 ).

Lors de la sénescence répllicative, les cellules se trouvent bloquées en phase G1 du cycle cellulaire. Cette incapacité de proliférer n'est pas due à un effondrement général des voies de transduction du signal déclenchées par les facteurs de croissance, mais plutôt à l'inhibition de certains gènes inductibles par les facteurs de croissance. Actuellement, on connaît 4 mécanismes permettant d'expliquer cet arrêt irréversible de division.

### 2.6.1. Les gènes de réponses précoces.

Les gènes de réponse précoce sont induits suite à la stimulation par des facteurs mitogènes. Leur induction est indépendante de l'expression d'autres gènes. Ils permettent la transcription de gènes tels que les cyclines, les CDK, et *qu'ef*.

Durant la sénescence, la plupart de ces gènes sont plus ou moins bien exprimés, cependant on a constaté une forte diminution du taux de transcription de *c-fos*, *Id<sub>1</sub>* et *Id<sub>2</sub>*. Les produits protéiques des protooncogène *c-fos* et *c-jun* constituent le facteur de transcription AP1, qui ne peut donc plus se former sous forme d'hétérodimère c-Fos/c-Jun.



**Figure I-4 :** Représentation schématique de l'intervention des différents complexes CDK :cycline pendant le cycle cellulaire (Lodish, H. *et al.*, 1995).

CDK	Poids moléculaire (kDa)	Sous-unité régulatrice	Inhibiteur	Fonctions cellulaires principales
CDK1	34	Cycline B Cycline A	p21 p27	Déclenchement de la mitose
CDK2	33	Cycline A Cycline E	p21 p27	Régulation de la réplication de l'ADN (par l'intermédiaire de E2F?) Phosphorylation de Rb
CDK3	36	?	?	Régulation de la phase G1?
CDK4	34	Cycline D	p21, p27, p15, p16	Phosphorylation de Rb
CDK5	35	Cycline D?	p21?	Participation au métabolisme
CDK6	40	Cycline D	p15, p16, p18	Phosphorylation de Rb
CDK7	42	Cycline H	?	Activation des autres kinases

**Tableau I-4 :** Propriétés des principales CDK (cyclin-dependent kinases) et leurs rôles cellulaires (d'après, Wolowiec, D. & French, M., 1996).

En fait, dans les cellules jeunes en conditions normales, les mitogènes induisent des voies de transduction du signal qui finissent par activer le gène *c-myc*. *C-Myc* est chargé d'activer SRF (serum response factor). SRF est une protéine qui va se fixer sur le site consensus SRE (serum response element) du promoteur du gène *c-fos* dont la transcription est alors déclenchée. Lors de la sénescence, SRF est hyperphosphorylé ce qui empêche sa liaison avec SRE. De ce fait, il en résulte une diminution du taux de transcription de *c-fos*.

Les gènes *Id<sub>1</sub>* et *Id<sub>2</sub>*, quant à eux, codent pour des régulateurs négatifs de facteurs de transcription hélice-boucle-hélice. Les mécanismes responsables de la répression de *Id<sub>1</sub>* et de *Id<sub>2</sub>* sont toujours inconnus.

### 2.6.2. Répression des gènes impliqués en fin de phase G1 et à la limite G1-S.

En second lieu, il a été observé que les cellules sénescents étaient déficientes en E<sub>2</sub>F, un facteur de transcription constitué de 2 sous-unités.

D'une part, soit E<sub>2</sub>F<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>F<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>F<sub>3</sub>, E<sub>2</sub>F<sub>4</sub> ou E<sub>2</sub>F<sub>5</sub>, d'autre part, soit DP<sub>1</sub> ou DP<sub>2</sub>. E<sub>2</sub>F est décrit comme un régulateur important de l'expression des gènes nécessaires à la phase S codant pour des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN.

En effet, de nombreux sites consensus de fixation d'E<sub>2</sub>F ont été identifiés au niveau du promoteur de plusieurs gènes de la phase S, comprenant *e<sub>2</sub>f<sub>1</sub>* lui-même mais également, *c-myc*, *cdc2*, la *cycline-D1*, la *dihydrofolate réductase* (DHFR), la *thymidine kinase* la *thymidine synthase*, la *thymidylate synthase*, la *ribonucléotide réductase*, etc...

E<sub>2</sub>F est inactivé lorsqu'il forme un complexe avec la protéine pRb hypophosphorylées (protéine du rétinoblastome). La phosphorylation de pRb par des complexes cyclines-CDK permet la libération d'E<sub>2</sub>F et rend l'entrée en phase S possible puisqu'E<sub>2</sub>F peut dès lors se lier à sa séquence consensus sur différents promoteurs et déclencher la transcription des gènes cités plus haut.

### 2.6.3. Répression de cyclines et de kinases dépendantes de cyclines (CDK).

Plusieurs cyclines et CDK nécessaires à la progression en G1 et G2 voient leur expression diminuer au cours du temps.

On assiste ainsi à l'arrêt transcriptionnel dans les fibroblastes âgés, de *cdk2*, *cycline A* et *B*, mais également à la perte d'activité enzymatique de complexe cycline-CDK dont la cycline E-CDK et la cycline D-CDK.

#### 2.6.4. p53, p21<sup>Waf-1</sup> et pRb.

Pour commencer, nous parlerons de la protéine p53. Cette protéine joue deux rôles : celui de "tumor suppressor", et celui de facteur de transcription.

Lorsque des cellules quiescentes sont stimulées par des mitogènes, l'activité de p53 décline brusquement avant l'entrée des cellules en phase S. Ce déclin de l'activité de p53 est dû à l'induction, en fin de phase G1, du gène *mdm2*. MDM2 encode une protéine qui se lie et inactive p53.

Dans les cellules sénescents, MDM2 n'est plus induite en présence de mitogènes et p53 peut alors jouer son rôle de « tumor suppressor ». En cas de dommages à l'ADN, p53 est activé par C-abl. p53 actif se lie à sa séquence consensus dans le promoteur de certains gènes nécessaires à la progression du cycle. Ceci empêche la liaison des facteurs de transcription à ces gènes, résultant en la suppression de leur transcription.

p53 exprime son rôle de facteur de transcription en se fixant sur le promoteur de p21<sup>Waf-1</sup> et en induisant sa transcription.

p53 et pRb sont surtout connues dans le domaine de la cancérologie. Si ces deux protéines sont mutées, elles ont de grandes chances de ne plus bloquer le cycle cellulaire et on a donc des risques accrus de transformation cellulaire.

Intéressons nous, ensuite, à la sur-expression de p21<sup>Waf-1</sup>.

p21<sup>Waf-1</sup> est un CdKI (inhibiteur de kinases dépendantes de cyclines), une protéine qui s'associe aux complexes CdK2/ cyclinesD ou E et qui inhibe l'activité kinasique des CDK.

Un classement de ces CdKi, sur base des homologies de séquence, a été réalisé.

La première famille est celle de Waf1/KIP1 dont les membres sont p21<sup>Waf-1</sup>, p27<sup>KIP-1</sup>, p57<sup>KIP-2</sup>. Leur expression est dépendante d'évènements tels que les dommages à l'ADN, l'inhibition de contact, l'absence de facteurs de croissance.

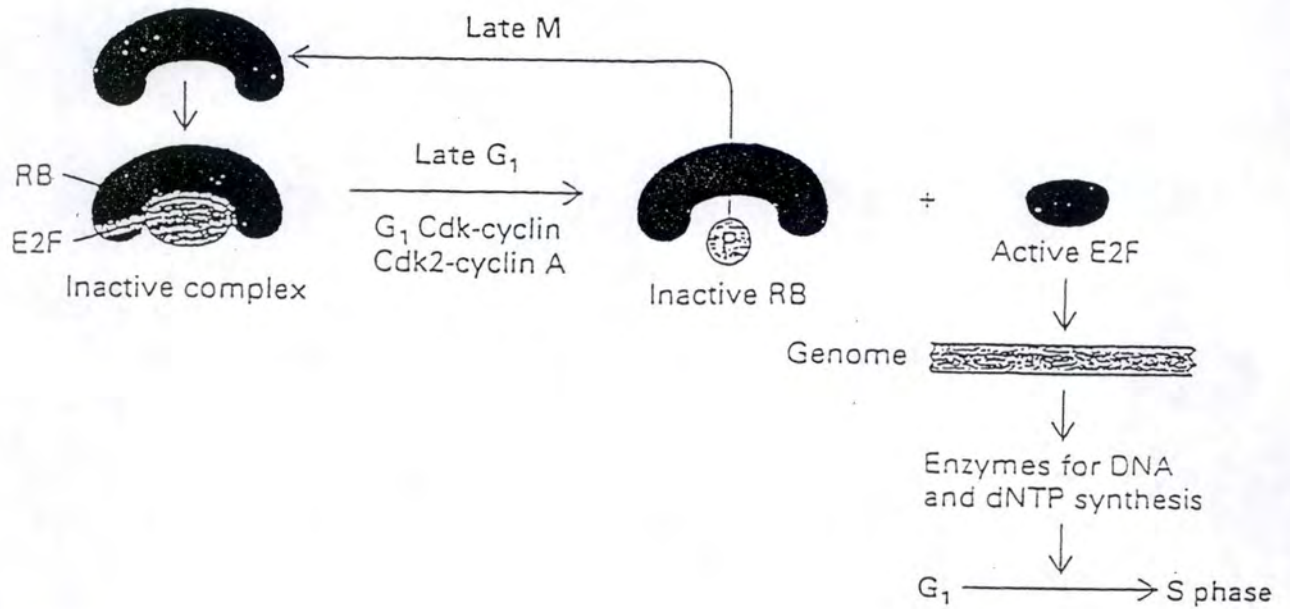
La seconde famille, INK4, est constituée des protéines p14<sup>INK-4c</sup>, p15<sup>INK-4d</sup>, p16<sup>INK-4a</sup> et p19<sup>INK-4b/ARF</sup>.

Une des conséquences de l'inhibition des complexes cycline/CdK par p21<sup>Waf-1</sup> est l'hypophosphorylation de pRb (**FigureI-5**).

Dans les cellules jeunes et non transformées, pRb devient normalement hyperphosphorylée suite à l'action de certains complexes cycline/CdK. Lorsque pRb est sous cette forme, elle est incapable de se lier et d'inhiber l'activité transactivatrice du facteur de transcription E2F. On assiste donc à la transcription des gènes nécessaires à la phase S et par conséquent à la progression du cycle cellulaire.

Par contre, en présence de la forme hypophosphorylée de pRb, les cellules ne sont plus capables de réaliser la phase S du cycle cellulaire.





**Figure I-5 :** Sous sa forme phosphorylée, pRB forme un complexe inactif avec E<sub>2</sub>F. Dans la phase G<sub>1</sub>, pRB est hyperphosphorylée par des complexes cyclines :CDKs, ce qui empêche sa liaison à E<sub>2</sub>F. Cela rend l'entrée en phase S possible (Lodish, H. *et al.*, 1995).

### **3. Relations entre stress et le vieillissement *in vitro*.**

Les fibroblastes humains perdent leur capacité de proliférer et entrent dans un état nommé sénescence répliquative après un nombre fini de divisions cellulaires.

Dans le cadre de ce travail, nous avons réalisé *in vitro* des stress radicalaires sur des fibroblastes de poumon fœtaux (IMR-90) au moyen de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

L' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tout comme le t-BHP, sont des molécules qui génèrent des radicaux libres à l'intérieur de la cellule. Les radicaux sont des molécules possédant un électron non apparié et sont de ce fait très réactionnels. Ces radicaux toxiques pour la cellule provoquent des modifications au niveau de l'ADN, des peroxydations lipidiques, et des inactivations de protéines.

Lorsque l'on soumet des cellules jeunes à des stress oxydatifs sublétaux avec du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), du *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP), des ultraviolets, ou encore de la mitomycine C, ces cellules subissent un vieillissement accéléré (Brack, C., *et al*, 2000).

En effet, lorsque l'on compare des cellules contrôle et stressées appartenant à un même passage en culture, on observe l'apparition de biomarqueurs de la sénescence répliquative environ 3 jours après les stress.

De travaux récents effectués dans ce laboratoire par P. Dumont sur des fibroblastes de la souche WI-38, vont dans ce sens.

Ces fibroblastes jeunes ont été exposés à 5 stress d'1 heure avec du *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP) 30 µM.

Les résultats montrent que les stress oxydatifs sublétaux au moyen de *t*-BHP induisent l'apparition prématurée de quelques biomarqueurs typiques de la sénescence répliquative *in vitro* chez les fibroblastes.

Tout d'abord, une diminution irréversible de la capacité proliférative des cellules traitées au *t*-BHP a été observée ainsi qu'une augmentation du pourcentage de fibroblastes présentant une activité β-galactosidase associée à la sénescence.

D'autre part, une sur-expression de p21<sup>Waf-1</sup> et une incapacité de phosphoryler la protéine pRb ont été constatées. Ces données confirment celles obtenues par Chen, Q.M., *et al* (1998) après des stress oxydatifs.

Enfin, on a montré une sur-expression de certains gènes soit 72 h après un stress unique à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, soit 72 h après 5 stress au *t*-BHP. Il s'agit de la fibronectine, l'ostéonectine, la SM22 (smooth muscle 22) et l'apolipoprotéine J (Dumont, P., *et al*, 2000).

La fibronectine est un composant essentiel de la matrice extracellulaire associée à diverses fonctions comprenant l'adhésion cellulaire, l'organisation du cytosquelette, la migration, la croissance et la différenciation cellulaire. Kumazaki *et al* ont proposé que la sur-expression de la fibronectine pendant la sénescence répliquative des fibroblastes pouvait contribuer aux changements

morphologiques rencontrés chez les cellules sénescents (Kumazaki, T., *et al*, 1993).

L'ostéonectine contribue au remodelage des tissus en induisant l'expression des Métalloprotéases (collagénase, gélatinase, stromélysine) dans les fibroblastes humains. Ces Métalloprotéases dégradent la matrice extracellulaire et les membranes basales. Or, on observe ces dégradations lors du vieillissement *in vivo* de la peau (Giacomini, P.U., et D'Alessio, P., 1996).

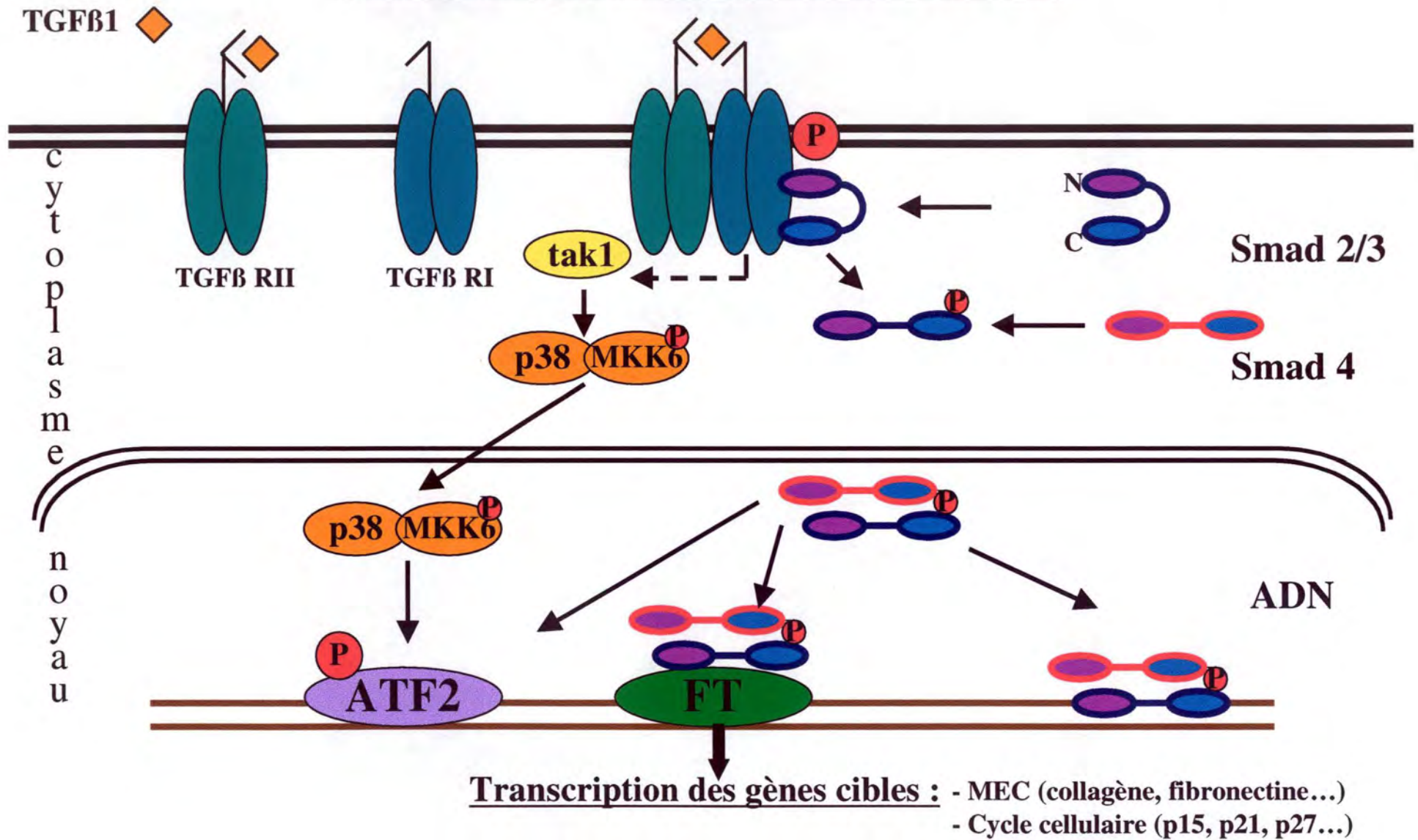
De plus, il a été démontré que l'ostéonectine était capable d'inhiber l'entrée des cellules endothéliales et des fibroblastes en phase S. En effet, cette protéine se fixe soit à la matrice extracellulaire, soit au PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) empêchant ainsi la reconnaissance par ce dernier de son récepteur spécifique (Pichler, R.H., *et al*, 1996).

En ce qui concerne l'apolipoprotéine J, on la soupçonne d'être une protéine chaperonne. Michel *et al* ont montré que les 14 paires de bases conservées dans le promoteur de ce gène sont spécifiquement reconnus par le facteur de transcription HSF1 (Heat Shock Factor). On pense que l'apolipoprotéine J pourrait protéger les cellules lors de stress oxydatifs en agissant en tant que chaperonne et en empêchant l'altération radicalaire de protéines. (Michel, D., *et al*, 1997).

D'autre part, l'apolipoprotéine J est retrouvée dans des maladies dégénératives comme la maladie d'Alzheimer où elle semble protéger les neurones contre la cytotoxicité du peptide A $\beta$ -40. En effet, elle se lie au peptide  $\beta$ -amyloïde bloquant ainsi l'aggrégation de ce peptide et empêchant donc la formation de plaques séniles de  $\beta$ -amyloïde.

Enfin, la SM22 est une protéine trouvée en abondance dans les cellules musculaires lisses.

## Transduction du signal du TGF- $\beta$ 1.



**Figure I-6 :** Représentation schématique illustrant la voie de transduction du signal du TGF- $\beta$ 1

## **Seconde partie : les effets du TGF- $\beta$ 1 sur la progression du cycle cellulaire.**

### **1. Généralités.**

Le TGF- $\beta$ 1 est un des membres de la superfamille de Transforming Growth Factor qui contrôle une variété de processus cellulaires comprenant la progression du cycle cellulaire, la différenciation cellulaire, l'adhésion des cellules ainsi que la synthèse de la matrice extracellulaire, et ce pour une variété de lignées cellulaires.

Les membres de cette famille transmettent leurs signaux à travers la membrane plasmique via un complexe hétérodimérique constitué des récepteurs Sérine/Thréonine Kinase de type I et de type II (**Figure I-6**).

Suite à la fixation du TGF- $\beta$ 1, le récepteur de type II phosphoryle le récepteur de type I et active ce dernier. Le signal intracellulaire induit par ce complexe est transmis par la famille des Smads. À ce jour, 8 protéines Smads ont été identifiées et chacune d'elles ont des rôles différents dans la transduction du signal.

Dans le cas du TGF- $\beta$ 1, Smad 2 et 3 s'associent au récepteur de type I qui les phosphoryle. Une fois phosphorylées, Smad 2 ou 3 peuvent se lier à la protéine Smad 4. Le complexe ainsi formé peut pénétrer à l'intérieur du noyau où il active soit directement la transcription de gènes cibles spécifiques, soit indirectement en coopérant avec d'autres facteurs de transcription (Attisano, L. et Wrana, J, 1998).

Un des facteurs de transcription sur lequel vient se fixer le complexe Smad est ATF2. Selon Hanafusa, *et al*, ATF2 serait indirectement transactivé par le TGF- $\beta$ 1 via la voie des Tak1. En effet, une fois Tak1 activé, il phosphoryle la protéine activatrice de p38, MKK6. Le complexe formé pénètre alors à l'intérieur du noyau où il active ATF2 en le phosphorylant (Hanafusa, H., *et al*, 1999).

### **2. Pourquoi s'intéresser au TGF- $\beta$ 1 ?**

Des études effectuées par Robson sur des cellules épithéliales de prostate humaine nous montre que le TGF- $\beta$ 1 bloque le cycle cellulaire. En effet, en présence de TGF- $\beta$ 1, une élévation du niveau du mRNA des CDKi p15<sup>INK-4d</sup>, p21<sup>WAF-1</sup>, p27<sup>KIP-1</sup> ainsi qu'une hypophosphorylation de pRb ont été observées. (Robson, N., *et al*, 1999)

Lorsque Hannon et Beach traitèrent leurs cellules HaCaT avec du TGF- $\beta$ 1, ils observèrent une séquence d'événements conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire : tout d'abord, une augmentation du niveau du mRNA de p15<sup>INK-4d</sup> d'environ 30 fois et cela 6 à 8 heures après le traitement au TGF- $\beta$ 1.

Ensuite, une augmentation de la liaison de p15<sup>INK-4d</sup> avec CDK4 et CDK6, conduisant à l'inhibition de l'activité de ces CDKs, ce qui entraîne l'arrêt de la phosphorylation de pRb et donc l'arrêt du cycle cellulaire (Hannon, J. et Beach, D., 1994). D'autre part, nous nous sommes dirigés vers le TGF- $\beta$ 1 car la littérature nous a appris que différents types cellulaires stimulés au TGF- $\beta$ 1 surexpriment certains gènes connus pour être surexprimés lors de la sénescence cellulaire normale ou induite prématurément par le stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Schoeckmann, H.O., *et al*, 1997) (Furukawa, Y., *et al*, 1992).

C'est à partir de ces arguments expérimentaux que nous avons décidé de nous intéresser à la voie de transduction du signal du TGF- $\beta$ 1 dans le cadre de la sénescence induite prématurément par les stress sublétaux sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **But du mémoire**

Les fibroblastes en culture et les fibroblastes *in vivo* acquièrent différents biomarqueurs spécifiques, lors de leur vieillissement. Par exemple, on note une augmentation des morphotypes post-mitotiques, une augmentation de la proportion de cellules positives pour l'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence, mais également le raccourcissement des télomères ou encore l'arrêt irréversible de la prolifération cellulaire.

Précédemment, il a été montré que l'expression du TGF- $\beta$ 1 pouvait potentiellement médier l'apparition de biomarqueurs lié au stress, ou à la sénescence. Au cours de ce travail, nous étudierons les effets à long terme du TGF- $\beta$ 1, plusieurs jours au moins après les stimulations au TGF- $\beta$ 1, sur le comportement cellulaire et en particulier sur le vieillissement cellulaire induit par les stress.

Dans un premier temps, nous allons tenter de savoir si le TGF- $\beta$ 1 est responsable de l'apparition de biomarqueurs du vieillissement cellulaire causé par ces stress. Dans ce cadre, nous nous focaliserons plus particulièrement sur trois types de modifications, l'apparition de la morphologie sénescence, de l'activité SA- $\beta$ -gal et la variation du niveau d'ARNm de quatre gènes connaissant des variations d'expression au cours de la sénescence normale.

Dans un second temps, nous tâcherons de découvrir le rôle que pourrait jouer le TGF- $\beta$ 1 dans l'arrêt du cycle cellulaire, lorsque les fibroblastes sont soumis à un stress à l' $H_2O_2$ .

Enfin, nous nous intéresserons à la voie de transduction du signal du TGF- $\beta$ 1 faisant intervenir les protéines Smads.

*Matériels*  
*et*  
*Méthodes*



## **1. La culture cellulaire.**

Durant ce travail, nous avons utilisé des fibroblastes humains de poumon foetal, issu de la souche IMR-90. Ces cellules ont été prélevées en 1961 par Hayflick et Moorhead, et conservées à « l'American Type Culture Collection ». Ces IMR-90 sont mises en culture dans des boîtes de culture stériles de 75 cm<sup>2</sup> (T75), contenant du milieu MEM + AB auquel on a ajouté 10 % de sérum de veau foetal. Ce sérum est indispensable en culture cellulaire car il contient de nombreux facteurs de croissance nécessaires à la survie et à la division des cellules.

Le matériel utilisé pour la culture cellulaire est le suivant :

- Milieu MEM + AB : milieu MEM (Modified Eagle Medium) enrichi d'antibiotiques :
  - Amphotéricine-B : 0,25 µg/ml (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).
  - Streptomycine sulfate : 100 µg/ml (Sigma, St Louis, USA).
  - Pénicilline : 100 U/ml (Sigma, St Louis, USA).
- Milieu MEM + AB + 10 % FBS : Milieu MEM additionné de 10 % de sérum de veau foetal (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne).
- MEM + AB + DMSO 10 % : Milieu MEM additionné de 10 % de Diméthylsulfoxyde. Le DMSO est un agent cryoprotecteur utilisé lors de la congélation des cellules (Accros Chimica, Geel, Belgique).
- Milieu de rinçage : Milieu MEM + AB
- Trypsine : Trypsine à 0,25 % dans un tampon Tris (0,4 g/KCl ; 2,2 g/NaHCO<sub>3</sub> ; 6,8 g/NaCl ; 1,0 g/glucose ; 0,5 mg/rouge de phénol) (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne)
- Boîtes de culture stériles de 25 cm<sup>2</sup> (T25) ou 75 cm<sup>2</sup> (T75) (Corning, Cambridge, USA)

### **1.1. Décongélation des cellules.**

- Plonger le cryotube dans un bain de 37°C, afin de décongeler les cellules le plus vite possible.
- Resuspendre les cellules dans un tube de 10 ml stérile, avec 5 ml de milieu MEM + AB + 10 % FBS.
- Centrifuger 10 min à 1000 rpm (centrifugeuse Hettich Universal) et décanter délicatement le surnageant.
- Resuspendre les cellules avec 5 ml de MEM + AB + 10 % FBS
- Repiquer les cellules dans une boîte de culture stérile de 75 cm<sup>2</sup> qui reçoit 15 ml de MEM + AB + 10 % FBS.
- Incuber la T75 dans une étuve à 37°C.

## **1.2. Repiquage des cellules.**

Les cellules sont dites confluentes lorsqu'elles forment une monocouche cellulaire couvrant l'entièreté de la surface de la boîte de culture. À ce moment, elles atteignent une densité de 40000 cellules par  $\text{cm}^2$  et doivent être repiquées dans des conditions stériles.

### **Méthode. (Figure II-1)**

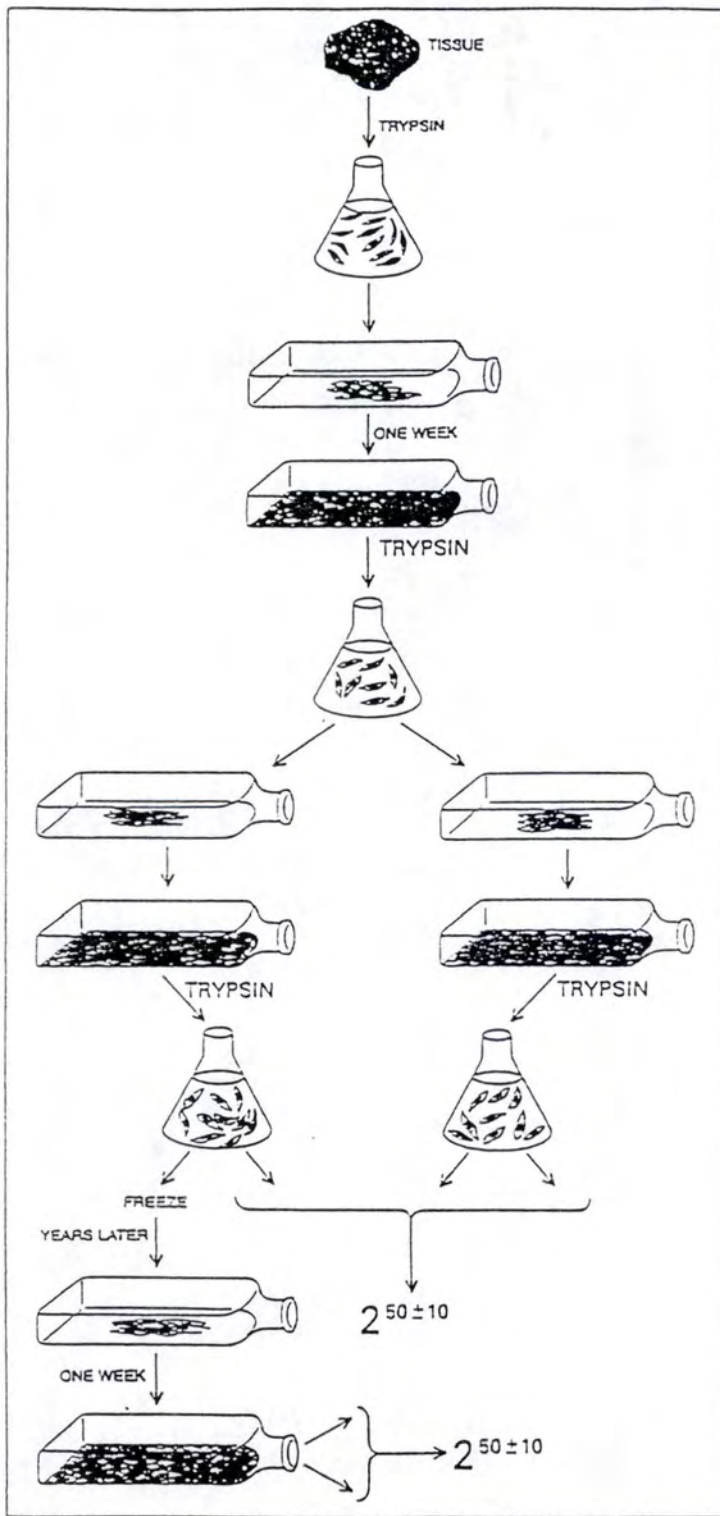
- Préchauffer à  $37^\circ\text{C}$  du milieu de rinçage, du milieu de culture (MEM + AB + 10 % FBS), et de la solution de trypsinisation.
- Décanter la boîte et rincer avec 10 ml de milieu de rinçage, pendant environ 1 min, pour une boîte de  $75 \text{ cm}^2$ . Ce lavage permet d'éliminer toute trace du sérum qui pourrait inhiber l'action de la trypsinase.
- Ajouter par boîte de T75, 2 ml de trypsinase pendant environ une minute. La trypsinase permet de détacher les cellules du fond de la boîte de culture. Ensuite, décanter l'excédent de trypsinase et réincuber les cellules à  $37^\circ\text{C}$  pendant une dizaine de minutes.
- Verser 10 ml de milieu de culture dans la T75 et rompre les agrégats cellulaires à l'aide d'une pipette pasteur.
- Après homogénéisation, répartir les cellules en 2 ou 4 boîtes et ajouter du milieu de culture afin d'obtenir un volume final de 15 ml par T75.
- Enfin, placer les boîtes dans l'étuve à  $37^\circ\text{C}$ .

## **1.3. La congélation des cellules.**

Nous congelons des cellules à  $-196^\circ\text{C}$  dans de l'azote liquide, afin de les conserver à un stade déterminé de leur développement.

### **Méthode.**

- Rincer et trypsiniser les cellules comme au point B.
  - Centrifuger 10 minutes à 1000 rpm (centrifugeuse Hettich Universal, Allemagne).
  - Éliminer le surnageant et resuspendre les cellules dans 0,4 ml de MEM + AB + 10 % DMSO comme agent cryoprotecteur.
  - Transférer la solution dans un cryotube (Nunc, Roskilde, Denmark).
- La congélation est réalisée en 2 étapes : la température est tout d'abord abaissée jusqu'à  $-40^\circ\text{C}$  à raison de  $1^\circ\text{C}$  par minute, puis rapidement jusqu'à  $100^\circ\text{C}$ . Enfin le cryotube est plongé dans l'azote liquide, à  $-196^\circ\text{C}$ .



**Figure II-1 :** Représentation schématique du principe de culture cellulaire (Hayflick, L., 1996).

## **1.4. Stress à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Les stress sublétaux sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Allemagne) sont utilisés pour accélérer le vieillissement des cultures de fibroblastes.

Nous réalisons dans ce travail un stress unique sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à une concentration de 150 µM durant 2 heures. Ensuite les cellules sont maintenues dans du MEM + 10 % de sérum.

### **Méthode.**

- Diluer l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans de l'eau désionisée. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est une molécule instable, les préparations doivent être en conséquence fraîches.
- Stériliser la solution en la passant sur filtre de 0,2 µm (Sartorius, Allemagne).
- Diluer ensuite pour obtenir la bonne concentration dans du milieu de culture avec sérum.
- Remplacer le milieu contenu dans la boîte de culture par celui de stress (15 ml par boîte de 75 cm<sup>2</sup>).
- Incuber 2 heures dans une étuve à 37°C.
- Décanter complètement le milieu de stress.
- Rincer les cellules avec 10 ml de milieu de rinçage (MEM sans sérum). Il faut mélanger très doucement lors de cette étape car les cellules fragilisées par le stress peuvent se détacher.
- Remettre 15 ml de MEM + 10 % sérum.

**N.B. :** En parallèle, pour tenir compte de l'effet généré par les changements de milieu seul et sans stress, il faut une boîte contrôle où l'on change le milieu en même temps que les cellules stressées.

## **2. Détection de l'activité SA- $\beta$ galactosidase.**

L'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence et détectée à pH 6 (SA  $\beta$ -gal) est un biomarqueur associé à la sénescence des cellules *in vitro* mais aussi *in vivo*. Cette activité spécifique n'est détectable qu'à pH 6 par une coloration spécifique. Elle diffère donc de l'activité  $\beta$ -gal normale des lysosomes qui est optimale à pH 4 et de celle des bactéries à pH 7.

### **Méthode.**

- Repiquer les cellules à faible densité dans une boîte de pétri de 35 mm de diamètre (Sarsted, Allemagne) contenant 2 ml de milieu de culture.
- Laisser 24 heures dans une étuve à 5 % de CO<sub>2</sub> et 37°C.
- Éliminer le milieu de culture, puis les cellules et les laver deux fois au PBS (Phosphate Buffer Saline)
- Fixer ensuite les cellules 5 minutes avec une solution de fixation.
- Les cellules sont ensuite rincées de nouveau 2 fois au PBS.
- Colorer pour l'activité  $\beta$ -gal (**Tableau II-1**).
- Incuber les cellules 20 heures à 37°C en absence de CO<sub>2</sub>.
- Retirer la solution de coloration.
- Laver les cellules 2 fois au PBS puis au méthanol (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Une fois les boîtes complètement sèches, on peut déterminer les proportions de cellules sénescents (colorées) et de cellules encore jeunes (non colorées).

<b>PBS(Phosphate Buffer Saline)</b>	Tampon phosphate additionné de NaCl 0,9%, pH 7,4
<b>Solution de fixation</b>	Solution aqueuse de dilué dans du PBS -Formaldehyde 2% (Belgolabo, Belgique) -Glutaraldéhyde 0,2% (Fluka, Pays –Bas)
<b>Solution de coloration</b>	Pour 20 ml : -4 ml de tampon 0,2M acide citrique/Na (SDS, France) tampon phosphate pH 6. -1 ml d'une solution 0,1M de ferrocyanure de K (K <sub>3</sub> FeCN <sub>6</sub> :Merck, Darmstadt, Allemagne). -1 ml d'une solution 0,1M de ferricyanure de K (K <sub>4</sub> FeCN <sub>6</sub> :Merck, Darmstadt, Allemagne). -0,6 ml d'une solution de NaCl 5M -40 µl d'une solution 1M de MgCl <sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Allemagne). -12,36 ml d'eau désionisée. -1 ml de solution de X-gal.
<b>Solution de X-gal</b>	20 mg/ml de 5-bromo-4-Chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside (X-gal :Promega) dilué dans du diméthylformamide (DMF :Sigma, USA). Le X-gal est conservé sous forme de solution dans du DMF à -20°C et n'est ajouté dans la solution de coloration qu'avant usage.

**Tableau II-1 :** Réactifs nécessaires à la visualisation de l'activité S-A β-gal.

### **3. Mesure de la synthèse d'ADN par incorporation de thymidine tritiée.**

#### **Matériel.**

- Trypsine 0,25 % (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).
- MEM + AB additionné de 10 % de sérum bovin fœtal (Flow Laboratories, Grande-Bretagne).
- Thymidine tritiée (CEN Saclay, France, temps de demi vie = 19 jours).
- PBS (Phosphate Buffer Saline, 10mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4).
- TCA 10 % (acide trichloroacétique) (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Éthanol (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- NaOH et HCl (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Aqualuma (Lumac, Landgraaf, Pays-Bas).

#### **Méthode.**

Les cellules cultivées en boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup> sont trypsinisées et resuspendues dans du MEM + AB + 10 % de sérum.

On réalise, à l'aide d'une chambre de Neubauer, une estimation de la densité cellulaire. Les cellules sont ensuite repiquées dans des boîtes de 24 puits (Corning, Cambridge, USA) à une densité de 50000 cellules par puits, chaque puits recevant 1 ml de MEM + AB + 10 % FBS contenant 1 µCi/ml de thymidine tritiée.

Les puits sont incubés pendant 24 h pour permettre l'incorporation de la radioactivité qui nous permettra de mesurer la prolifération ou la synthèse de l'ADN.

Une fois l'incubation en présence de thymidine tritiée terminée, les puits sont rincés, tout d'abord, 2 fois au moyen de PBS. Les puits reçoivent ensuite 0,5 ml d'une solution de TCA 10 % préalablement refroidie sur glace.

Les puits sont ensuite lavés 1 fois à l'éthanol 70 % et 1 fois au PBS.

Quand le dernier rinçage est accompli, 500 µl de NaOH 0,5 M sont ajoutés dans chaque puits.

Après 5 minutes d'incubation pour la lyse cellulaire, on neutralise au moyen de la même quantité d'HCl 0,5 M.

Après agitation au moyen d'une pipette pasteur, le contenu de chaque puits est récupéré dans une fiole et complété de 5 ml d'Aqualuma qui sert de molécule scintillante lors de la lecture au compteur de radioactivité. La fiole est agitée fortement et on réalise un comptage du nombre de coups par minute (cpm) pendant trois minutes grâce à un compteur à scintillation (Beckam LS 6000 IC, Belgique).

## **4. Extraction de protéines nucléaires.**

### **Matériel.**

#### **Tampon de lyse :**

- Hepes 10 mM (Janssen, Beerse, Belgique).
- KCl 5 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- $MgCl_2$  1,5 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- NaF 1 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- $Na_3VO_4$  1 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Phénylméthylsulfonylfluoride 1 mM (Sigma, St Louis, USA).
- DTT 1 mM (Sigma, St Louis, USA).

#### **Tampon de resuspension :**

- Hepes 20 mM (Janssen, Beerse, Belgique).
- KCl 450 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- EDTA 1mM (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- $Na_3VO_4$  1mM (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- NaF 1 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Phénylméthylsulfonylfluoride 1mM (Sigma, St Louis, USA).
- Glycérol 25 % (Merck, Darmstadt, Allemagne).

#### **Autres :**

- PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9 % à pH 7,4).
- Nonidet P-40 (Sigma, St Louis, USA).

### **Méthode.**

- Rincer les cellules 2 fois au moyen de PBS refroidi sur glace
- 10 ml de PBS sont ensuite déposés dans la boîte T75 et les cellules sont raclées à l'aide d'un râteau. Le tout est récupéré dans un tube de 10 ml.
- Centrifuger 10 min à 1000 rpm et décanter le surnageant.
- Resuspendre le culot avec 10 ml de tampon de lyse. Ce tampon se compose de sels, de détergent, d'anti-protéases et d'anti-phosphatases.
- Centrifuger 10 min à 1000 rpm et décanter le surnageant.
- Resuspendre les cellules gonflées dans 200  $\mu$ l de tampon de lyse auquel on a ajouté 0,1 % de NP-40.
- Lyser les cellules au douce de petit volume, et récolter la solution dans un tube de type eppendorf.
- Centrifuger 2 min à 13000 rpm et décanter le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 200  $\mu$ l de tampon de resuspension.
- Agiter délicatement 45 min à 4°C, puis centrifuger 30 min à 13000 rpm.
- Récupérer le surnageant contenant les protéines nucléaires dans un nouveau tube de type eppendorf, et congeler à -80°C. Une fraction de l'échantillon (20  $\mu$ l) est mise de côté pour effectuer un dosage des protéines.



## **5. Le dosage des protéines par la méthode de Bradford.**

### **Matériel.**

- Le colorant Bleu de Coomassie (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad Laboratories GmbH, 500-0006).

### **Méthode.**

- Diluer le colorant 5x dans de l'eau.
- Pour chaque test, ajouter 1 ml de colorant.
- Ajouter toutes les minutes une quantité donnée de protéines à doser (par exemple : 3 µl).
- Laisser agir 5 min.
- Doser au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm.
- Prévoir un tube avec l'étalon (n'ajouter que 3,7 µl), un avec le blanc étalon (ajouter 3,7 µl d'eau) et un blanc avec le tampon dans lequel se trouvent les protéines (tampon de resuspension).

La formule à utiliser pour estimer la quantité de protéines est la suivante :

$$\frac{((\text{Moyenne test} - \text{Moyenne blanc}) / (\text{Moyenne étalon} - \text{Moyenne Blanc étalon})) \times 5}{\text{Volume des échantillons}}$$

## **6. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).**

La technique de retard sur gel ou EMSA permet de mettre en évidence la (non) liaison d'une protéine avec une séquence d'ADN déterminée.

Un oligonucléotide contenant la séquence cible d'un facteur de transcription est incubé en présence d'un extrait cellulaire ou nucléaire avant d'être déposé sur un gel d'électrophorèse en conditions non dénaturantes permettant de séparer les molécules.

Si la molécule est présente dans l'extrait cellulaire, elle se lie à la séquence marquée, et la migration du complexe ADN-protéine sera retardée par rapport à la migration de la sonde seule. Un retard plus important peut également être mis évidence sur le gel par utilisation d'un anticorps dirigé contre le facteur de transcription étudié (supershift).

Les principales étapes de cette technique sont les suivantes : culture et le stress des cellules, le marquage de la sonde, la liaison entre les protéines et la sonde marquée, l'électrophorèse, la quantification et la révélation du gel.

### **6.1. Marquage et purification des sondes.**

Les sondes utilisées pour les EMSA sont préalablement marquées en radioactivité. Ce marquage s'effectue à l'aide d'ATP radioactif [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP. Le phosphore du groupement phosphate à l'extrémité 5' de la sonde est substitué par le phosphore du [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP et ceci grâce à une enzyme polynucléotide kinase et à son tampon d'activation.

#### **Matériel.**

- Mixture réactionnelle :
  - 2  $\mu\text{l}$  de la sonde à marquer.
  - 2  $\mu\text{l}$  de tampon de réaction 10 fois concentré.
  - 4  $\mu\text{l}$  de [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP (3000 Ci/mM).
  - 1  $\mu\text{l}$  de T4 polynucléotide kinase (10 U/ $\mu\text{l}$ ) (Boehringer Mannheim, Allemagne).
  - 11  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O distillée.
- Quick spin colonne : séphadex G-25.
- Aqualuma (Lumac, Landgraaf, Pays-Bas).
- Compteur à scintillation  $\beta$  (Beckam LS1801, USA).
- Instant Imager (Packard, Downers Grove, USA).
- Gel de polyacrylamide 10 % non dénaturant :
  - 17,5 ml d'acrylamide/bisacrylamide (la solution stock se compose de 30 % d'acrylamide pour 1 % de N,N'-méthylène bisacrylamide).

- 2,5 ml de TBE 10 X
- TRIS 0,9 M (Janssen Chimica, Beerse, Belgique).
- Acide borique 0,9 M (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- EDTA 0,02 M (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- 19,2 ml d'H<sub>2</sub>O distillée.
- 300 µl d'APS (voir verso).
- 25 µl de TEMED (Bio-Rad, Richmond, USA).

**N.B. :** Le TEMED et le persulfate d'ammonium sont ajoutés en dernier lieu puisque ce sont les agents polymérisateurs.

### Méthode.

- Après avoir chauffé un bain à 37°C et décongelé le [<sub>-</sub><sup>32</sup>P]-ATP, la mixture réactionnelle est préparée dans un microtube et incubée durant 30 min dans un bain à 37°C. Ensuite, les oligonucléotides sont séparés des nucléotides radioactifs grâce à une purification sur colonne.
- Resuspendre la résine de la colonne en vortexant gentiment.
- Enlever l'extrémité de la colonne et placer la dans un tube de type eppendorf.
- Ensuite la colonne va être tassée par une centrifugation de 1 min à 3000 rpm.
- Mettre la colonne dans un nouveau tube eppendorf, puis déposer l'échantillon au centre de la colonne et effectuer une centrifugation de 1 min à 3000 rpm.
- Transférer la colonne dans un nouveau tube eppendorf, ajouter 75 µl d'H<sub>2</sub>O distillée au centre de la colonne et centrifuger de nouveau.
- Ensuite on évalue la radioactivité contenue de 1 µl de sonde purifiée au compteur à scintillation .
- Afin de séparer la sonde double brin de la sonde simple brin, et pour éviter au maximum les liaisons non spécifiques des protéines nucléaires à l'ADN simple brin, la totalité du volume de sonde marquée est déposée sur un gel de polyacrylamide 10 % non dénaturant.
- Après une migration de 90 min à 200 V, le gel est passé à l'Instant Imager où la sonde double brin est localisée. Ensuite, on découpe le morceau de gel correspondant à la sonde double brin que l'on place dans 100 µl d'H<sub>2</sub>O pendant une nuit à 4°C afin que la sonde diffuse dans l'H<sub>2</sub>O.
- La phase liquide est récupérée et un comptage est de nouveau réalisé.

## **6.2. Liaison sonde–protéine et électrophorèse.**

### **Principe.**

Sur un gel de polyacrylamide, on charge des extraits de protéines nucléaires, issus de cellules stimulées (ou non). Ces extraits sont préalablement incubés avec une sonde ADN double brin liant le facteur de transcription dont on veut tester la liaison. Cette sonde est marquée radioactivement pour permettre une révélation par autoradiographie.

Après migration, la sonde libre se retrouve au bas du gel alors que, si le facteur de transcription en question s'y lie, le complexe formé est retardé sur le gel et l'on obtient un « signal EMSA », caractéristique de la liaison du facteur à sa séquence consensus.

### **Méthode.**

Ces expériences de retard sur gel ont été réalisées au moyen d'une sonde oligonucléotidique double brin liant le facteur de transcription p53, ATF2.

#### *Préparation des échantillons*

Chacune des pistes aménagées dans le gel recevra un mélange de 25 µl, contenant tout ce qu'il faut pour permettre la liaison éventuelle du facteur de transcription à sa séquence en cas d'activation :

- *Gel Shift Binding Buffer* (4 % glycérol; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 50 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,05 mg/ml poly-dIC)
- 5 µg d'extrait nucléaire
- 40000-50000 cpm de sonde radioactive

Dans certains échantillons, on remplace la sonde sauvage par de la sonde mutée, également marquée radioactivement. Le volume des différents échantillons est enfin ajusté à 25 µl avec de l'H<sub>2</sub>O distillée.

#### *Migration*

Les échantillons sont chargés dans les puits aménagés au sommet d'un gel coulé entre deux plaques de verre, polymérisé 45 min minimum à température ambiante et monté dans une cuve d'électrophorèse . Ce gel, dont la composition est détaillée ci-dessous, est préalablement soumis à un pré-run d'une heure (120 V) dans du tampon TBE 0,5x avant de recevoir les échantillons.

- 39,25 ml eau distillée.
- 8,75 ml d'une solution d'acrylamide 30 % (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne) et de bis-acrylamide 1 % (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).
- 2,5 ml TBE 10x (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne) (107,8 g Tris-base ; 55 g acide borique ; 7,44 g EDTA par litre).
- 300 µl ammonium persulfate (APS) 20 % (BioRad, Richmond, USA).
- 25 µl TEMED (N,N,N',N'-tétra-méthyl-éthylènediamine) (BioRad, Richmond, USA).

La migration des échantillons dure 1 h à 100 V

Le gel est ensuite séché sous vide à 80°C, pendant 45 min. Une pré-visualisation du résultat est effectuée à l'Instant Imager (Electronic Autoradiography, Packard, Canberra, Australie), ce qui permet de quantifier les signaux obtenus. Ensuite, on expose un film radiographique (Hyperfilm MP, Amersham, Grande-Bretagne) sur le gel pendant 24-48 h à -70°C avant de pouvoir révéler.

### *Révélation*

Après exposition, le film est plongé quelques minutes dans une solution de révélateur (Ilford 200RT, Ilford, Grande-Bretagne) puis lavé à l'eau distillée avant d'être fixé quelques minutes dans une solution de fixateur (Ilford 200RT, Ilford, Grande-Bretagne). Le film est ensuite bien rincé à l'eau pour éliminer toute trace de fixateur, et laissé sécher à l'air libre avant d'être scanné.

## **7. L'extraction d'ARN total de cultures cellulaires.**

L'ARN qui est extrait doit être de très bonne qualité, or ceci est rendu particulièrement difficile du fait de la présence de RNases tant endogènes qu'exogènes. Dès lors, pour empêcher leur action, différentes précautions doivent être prises. Tout d'abord, la plupart des opérations se déroulent à 4°C afin de bloquer toute action de nucléases, ensuite, le tampon de lyse contient du thiocyanate de guanidine et du  $\beta$ -mercaptoéthanol, qui sont des inhibiteurs de RNases. Enfin, toute contamination éventuelle par des RNases exogènes sera prévenue par l'utilisation exclusive de matériel libre de toute Rnase (« RNase free »), et l'expérimentateur se munira de gants.

### **Matériel.**

Pour cette étape, nous utilisons « Total RNA Isolation System » (Pharmingen, San Diego, USA). Ce kit comprend :

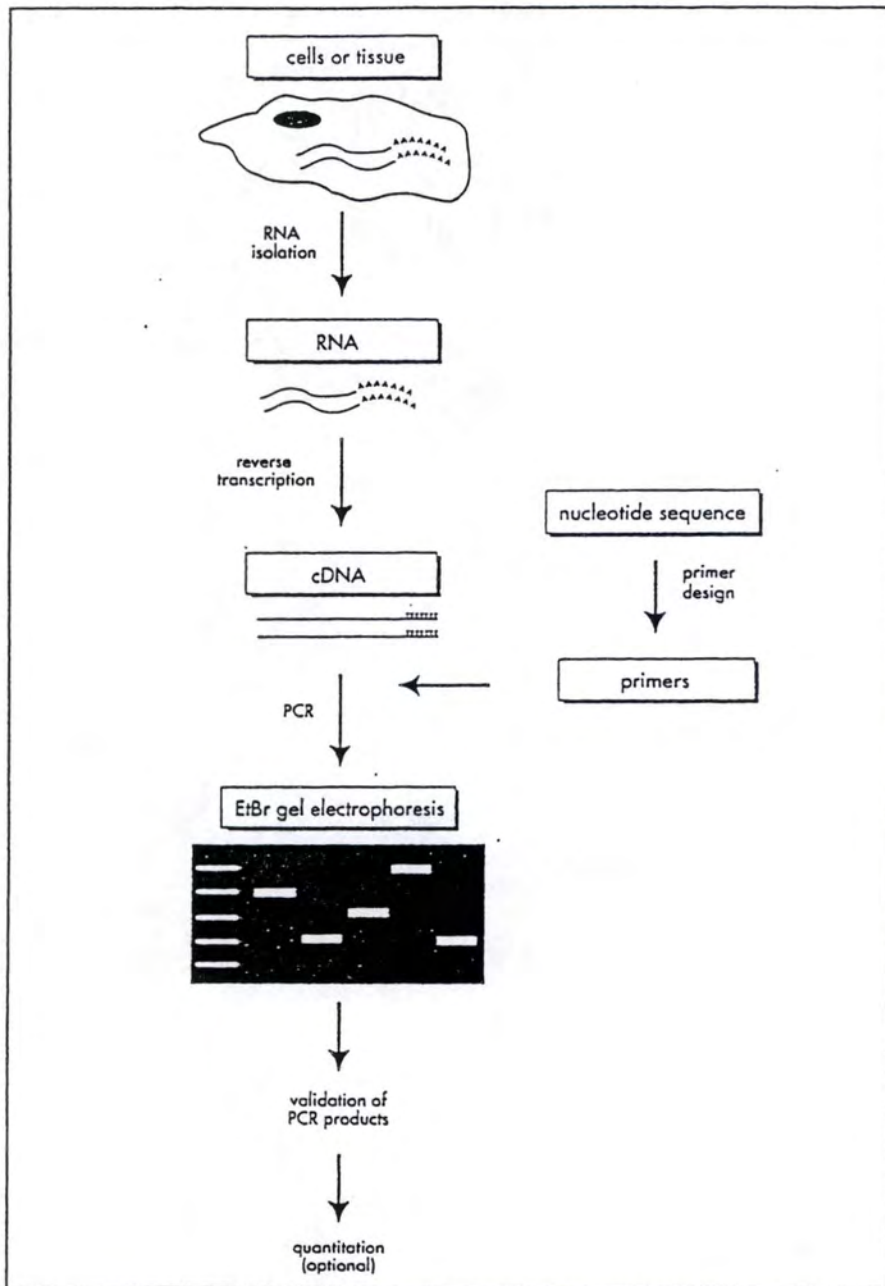
- Solution de dénaturation (Thiocyanate de guanidine et tampon citrate/sarcosine / -mercaptoéthanol ).
- Acétate de sodium 4 M.
- Phénol : chloroforme : alcool isoamylique en proportions 25 : 24 : 1, tamponné avec 42 mM de citrate de sodium, pH4, 3-4, 7 (Sigma, St Louis, USA).
- Isopropanol (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Éthanol absolu (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Eau sans nucléase.

### **Méthode.**

Les boîtes de culture sont sorties de l'étuve et sont déposées sur glace afin de bloquer toute action des nucléases. Les cellules sont rincées avec 10 ml de PBS froid, puis entraînées dans le fond de la boîte grâce à un « racloir ». On récupère le volume ajouté que l'on centrifuge 10 min à 1000 rpm. Après avoir décanté le surnageant, on ajoute 600  $\mu$ l de solution de dénaturation RNase free.

Ensuite, on ajoute 1/10 de volume en acétate de sodium (60  $\mu$ l), 1 volume en phénol (600  $\mu$ l) et 2/10 du volume en chloroforme (120  $\mu$ l). On vortexe le tout et on incube 15 min sur glace. Une centrifugation est ensuite réalisée à 12000 rpm pendant 20 min à 4 °C. La phase aqueuse est alors récupérée délicatement et transférée dans un nouveau microtube. Un volume d'isopropanol égal à la phase aqueuse est ajouté, et la solution, bien mélangée, est placée à - 20 °C pendant minimum 1 heure pour la précipitation de l'ARN. En fin de précipitation, l'ARN est culotté par centrifugation à 12000 rpm pendant 20 min à 4 °C. Le culot est suspendu dans 600  $\mu$ l de solution D et

vortexé. On ajoute ensuite 600 µl d'isopropanol, on mélange et incube 1 heure à - 20 °C. On centrifuge à nouveau à 12000 rpm pendant 20 min à 4 °C. Le culot est lavé 2 fois à l'aide d'éthanol 66 %, il s'en suit une nouvelle centrifugation de 20 min à 12000 rpm à 4 °C. Après séchage, le culot d'ARN est suspendu dans 20 µl d'eau distillée RNase free. Une fraction de 1 µl est prélevée, avant congélation, pour le dosage de l'ARN au spectrophotomètre. L'estimation de la quantité d'ARN se fait par lecture de l'absorbance des acides nucléiques à 260 nm au spectrophotomètre. Pour évaluer le degré de pureté de la préparation, on réalise également une lecture à 280 nm. Des préparations pures en ARN ont un rapport D.O.260 / D.O.280 compris entre 1,7 et 1,9. Des valeurs inférieures peuvent refléter une contamination de la préparation par du phénol ou par des protéines, une mauvaise dissolution de l'ARN (d'où l'intérêt de le chauffer à 55°C), ou encore une trop grande concentration d'ARN. La concentration d'ARN est calculée en sachant qu'une solution d'ARN d'une densité optique égale à 1 à 260 nm contient environ 40 µg d'ARN/ml.



**Figure II-2 :** Principe de la RT-PCR (D'après Clontech Laboratories, USA).



## 8. La Transcription inverse suivie d'une amplification par PCR).

L'étape de transcription inverse nous permet de synthétiser de l'ADN complémentaire (ADN-c) à partir de l'ARN extrait. Nous utilisons des amorces poly-T qui s'hybrident à la queue poly-A des ARNm. Lors de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), nous amplifions de manière spécifique les ADNc néo-synthétisés. Nous utilisons 2 types d'amorces : l'amorce poly-T ayant servi à la transcription inverse et une amorce arbitraire aléatoirement choisie (**Figure II-2**).

### 8.1. Préparation du mix réactionnel et conditions RT-PCR.

#### Matériel.

- Appareil PCR utilisé : Gene Amp PCR system 9700.
- Tubes PCR (Biozym, Landgraaf, Pays-Bas).
- Kit de RT-PCR : (Access RT-PCR system, Promega, Madison, USA).
  - AMV reverse transcriptase 5 unités/ $\mu$ l.
  - Tfl ADN polymérase (de *Thermus flavus*), 5 unités/ $\mu$ l.
  - Tampon de réaction 5 x.
  - Sulfate de magnésium 25 mM ( $MgSO_4$ ).
  - dNTP à une concentration de 10 mM.
- [ $\gamma$ - $^{32}P$ ] dCTP (3.000 Ci:mmole) (NEN, Boston, USA).
- Les amorces décrites dans le **tableau II-2** :

Gène	Paire d'amorces nucléotidiques	Position	Taille des amplicons
<b>GAPDH</b> (Sewing, A. et al., 1993)	5'-CGT CTT CAC CAT GGA GA-3 5'-CGG CCA TCA CGC CCA CAG TTT-3'	333 à 353 640 à 659	299bp
<b>Ostéonectine</b>	5'-CTG TGG GAG CTA ATC CTG-3' 5'-GGG TGC TGG TCC AGC TGG-3'	181 à 199 765 à 783	602bp
<b>Fibronectine</b>	5'-GAT TGC CTG TTC TGC TTC-3' 5'-TTG GGT GAC TTT CCT ACT-3'	360 à 378 502 à 520	160bp
<b>Apolipo-protéine J</b>	5'-CGG GGT GAA ACA GAT AAA G-3' 5'-TGC GGT CAC CAT TCA TCC A-3'	69 à 87 373 à 391	322bp
<b>SM22</b>	5'-TGG CGT GAT TCT GAG CAA-3' 5'-CTG CCA AGC TGC CCA AGG-3'	249 à 267 470 à 488	239 bp

**Tableau II-2.** Amorces utilisées au cours des différentes RT-PCR.

<b>Amorces</b>	Décrites dans le tableau II-2.
<b>Kit de RT-PCR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 500 unités d'<i>AMV reverse transcriptase</i>.</li> <li>- 500 unités de <i>tfl ADN polymérase</i>.</li> <li>- 1 ml de tampon de réaction 5X.</li> <li>- 1,2 ml de <i>MgSO<sub>4</sub></i> 25mM</li> <li>- 100 µl d'un mélange de <i>dATP, dCTP, dGTP, dTTP</i> à une concentration de 10mM.</li> <li>- 13 ml d'eau Rnase free pour obtenir un volume de 50 µl.</li> </ul>
<b>[<math>\alpha</math>-<sup>32</sup>P] dCTP</b>	-(3000Ci/mme) (NEN Dupont, USA)
<b>Thermo-cycleur</b>	(Gene AMP 2400, Perkin Elmer, USA).

**Tableau II-3 :** Matériel utilisé pour la RT-PCR en 1 étape.

## Méthode.

Le système de RT-PCR de Promega permet de réaliser la transcription inverse et l'amplification par PCR d'un ARN spécifique à partir d'ARN totaux dans un seul tube. Ceci est réalisable grâce à un tampon de réaction qui permet une activité maximale pour les 2 enzymes : la transcriptase inverse d'AMV et l'ADN polymérase d'une archéobactérie marine hyperthermophile : *Thermus flavus*. Il n'y a donc pas lieu de changer de tampon ni d'ajouter l'ADN polymérase entre l'étape de reverse transcription et l'étape de PCR. Cela simplifie la procédure et réduit les risques de contamination éventuelle avec les brins d'ADN exogène.

La transcriptase inverse d'AMV peut travailler à des températures élevées (48°C, dans le tampon de réaction) ce qui minimise les problèmes encourus avec les structures secondaires dans l'ARN et facilite donc la synthèse de longs brins d'ADNc. L'ADN polymérase de *Thermus flavus* réalise l'élongation de manière rapide.

On prépare le mélange réactionnel repris dans le **tableau II-3**. Les échantillons sont ensuite mis dans le thermo-cycleur qui réalise des cycles de température décrits dans les **tableaux II-4**. On analyse les produits soit sur un gel d'agarose (pour une RT-PCR non radioactive) soit sur un gel de polyacrylamide (pour une RT-PCR radioactive).

## 8.2. Electrophorèse en gel d'agarose

Pour mettre au point les conditions de PCR (nombres de cycles, température d'hybridation, ect), nous avons choisi d'analyser, les produits provenant de RT-PCR non radioactive sur gel d'agarose. L'électrophorèse en gel d'agarose est une méthode simple et rapide de séparation des fragments d'ADN en fonction de leur taille. Des gels de pourcentage élevé en agarose sont requis pour une séparation optimale des fragments de petites tailles et inversement (**Tableau II-5**)

Les fragments d'ADN sont visualisés par marquage au bromure d'éthidium. Cette substance contient des groupes plans qui s'intercalent entre les bases de la double hélice d'ADN (**Figure II-3**).

L'ADN est ainsi fluorescent sous illumination ultraviolette. Il est cependant important de noter que cette fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN mais aussi à la taille des fragments. Celle-ci est estimée grâce à l'utilisation d'un marqueur dont les tailles des fragments sont connues.

<b>A. Activation de la transcriptase inverse d'AMV et étape de reverse transcription</b>		
- 48°C pendant 1 h		
.....		
<b>B. Inactivation de la transcriptase inverse d'AMV et dénaturation des brins ARN/ADNc</b>		
- 94°C pendant 2 min		
.....		
<b>C. Synthèse du brin complémentaire de l'ADN puis amplification par PCR</b>		
A. 20 cycles	- 94°C/30 sec	Dénaturation des doubles brins.
	- 60°C/30 sec	Hybridation dont la température est définie en fonction de la séquence des amorces (Elle correspond environ à la température à laquelle 50% des amorces sont hybridées(température de fusion)) .
	- 68°C/45 sec	Extension d'amorces, donc polymérisation
B. 1 cycle	- 68°C/7 min	Extension finale
C. 1cycle	- 4°C	Stockage

**Tableau II-4a :** Cycles de température lors de la RT-PCR du GAPDH.

<b>A. Activation de la transcriptase inverse d'AMV et étape de reverse transcription</b>		
- 48°C pendant 1 h		
.....		
<b>B. Inactivation de la transcriptase inverse d'AMV et dénaturation des brins ARN/ADNc</b>		
- 94°C pendant 2 min		
.....		
<b>C. Synthèse du brin complémentaire de l'ADN puis amplification par PCR</b>		
D. 24 cycles	- 94°C/30 sec	Dénaturation des doubles brins.
	- 56°C/50 sec	Hybridation dont la température est définie en fonction de la séquence des amorces (Elle correspond environ à la température à laquelle 50% des amorces sont hybridées(température de fusion)) .
	- 68°C/45 sec	Extension d'amorces, donc polymérisation
E. 1 cycle	- 68°C/7 min	Extension finale
F. 1cycle	- 4°C	Stockage

**Tableau II-4b :** Cycles de température lors de la RT-PCR de TGF-β<sub>1</sub>.

<b>A. Activation de la transcriptase inverse d'AMV et étape de reverse transcription</b>		
- 48°C pendant 1 h		
.....		
<b>B. Inactivation de la transcriptase inverse d'AMV et dénaturation des brins ARN/ADNc</b>		
- 94°C pendant 2 min		
.....		
<b>C Synthèse du brin complémentaire de l'ADN puis amplification par PCR</b>		
D. 27 cycles	- 94°C/30 sec	Dénaturation des doubles brins.
	- 68°C/30 sec	Hybridation dont la température est définie en fonction de la séquence des amorces (Elle correspond environ à la température à laquelle 50% des amorces sont hybridées(température de fusion)) .
	- 72°C/40 sec	Extension d'amorces, donc polymérisation
E.1 cycle	- 68°C/7 min	Extension finale
F.1cycle	- 4°C	Stockage

**Tableau II-4c :** cycles de température lors de la RT-PCR de la fibronectine.

<b>A. Activation de la transcriptase inverse d'AMV et étape de reverse transcription</b>		
- 48°C pendant 1 h		
.....		
<b>B. Inactivation de la transcriptase inverse d'AMV et dénaturation des brins ARN/ADNc</b>		
- 94°C pendant 2 min		
.....		
<b>C. Synthèse du brin complémentaire de l'ADN puis amplification par PCR</b>		
D. 22 cycles	- 94°C/30 sec	Dénaturation des doubles brins.
	- 56°C/30 sec	Hybridation dont la température est définie en fonction de la séquence des amorces (Elle correspond environ à la température à laquelle 50% des amorces sont hybridées(température de fusion)) .
	- 68°C/30 sec	Extension d'amorces, donc polymérisation
E. 1 cycle	- 68°C/7 min	Extension finale
F. 1cycle	- 4°C	Stockage

**Tableau II-4d :** Cycles de température lors de la RT-PCR de l'ostéonectine.

<b>A. Activation de la transcriptase inverse d'AMV et étape de reverse transcription</b>		
- 48°C pendant 1 h		
.....		
<b>B. Inactivation de la transcriptase inverse d'AMV et dénaturation des brins ARN/ADNc</b>		
- 94°C pendant 2 min		
.....		
<b>C. Synthèse du brin complémentaire de l'ADN puis amplification par PCR</b>		
D. 20 cycles	- 94°C/30 sec	Dénaturation des doubles brins.
	- 56°C/30 sec	Hybridation dont la température est définie en fonction de la séquence des amorces (Elle correspond environ à la température à laquelle 50% des amorces sont hybridées(température de fusion)) .
	- 68°C/40 sec	Extension d'amorces, donc polymérisation
E. 1 cycle	- 68°C/7 min	Extension finale
F. 1cycle	- 4°C	Stockage

**Tableau II-4e :** Cycle de températures de la RT-PCR de l'apolipoprotéine J.

<b>A. Activation de la transcriptase inverse d'AMV et étape de reverse transcription</b>		
- 48°C pendant 1 h		
.....		
<b>B. Inactivation de la transcriptase inverse d'AMV et dénaturation des brins ARN/ADNc</b>		
- 94°C pendant 2 min		
.....		
<b>C. Synthèse du brin complémentaire de l'ADN puis amplification par PCR</b>		
D. 23 cycles	- 94°C/30 sec	Dénaturation des doubles brins.
	- 57°C/30 sec	Hybridation dont la température est définie en fonction de la séquence des amorces (Elle correspond environ à la température à laquelle 50% des amorces sont hybridées(température de fusion)) .
	- 68°C/30 sec	Extension d'amorces, donc polymérisation
E. 1 cycle	- 68°C/7 min	Extension finale
F. 1cycle	- 4°C	Stockage

**Tableau II-4f :** Cycles de température de la RT-PCR de SM22.

Concentration en agarose (%)	Séparation efficace de molécule d'ADN (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7,0
1,2	0,4-6,0
1,5	0,2-3,0
2,0	0,1-2,0

**Tableau II-5 :** Concentration optimale en agarose à utiliser selon la taille des molécules d'ADN à séparer.

**Matériel.** (Tableau II-6)

**Méthode.**

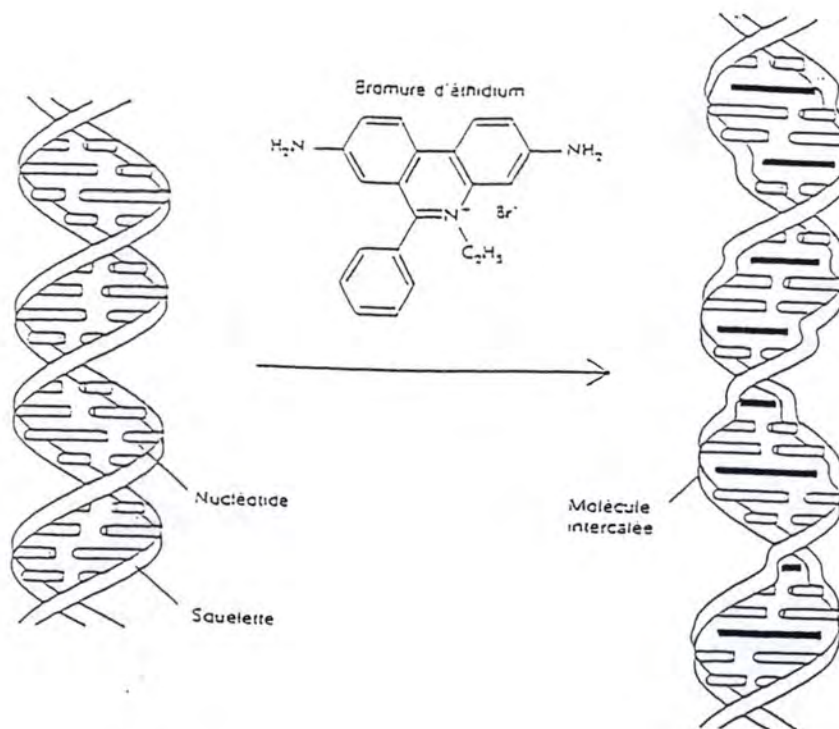
- Porter à ébullition un volume approprié de tampon TBE1 fois additionné d'agarose (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne) jusqu'à obtenir une solution limpide.
- Ajouter le bromure d'éthidium (Sigma, St Louis, USA) pour obtenir une concentration finale de 2 µg/ml.
- Couler sur le support *ad hoc* muni de peignes et laisser polymériser.
- Immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse (remplie de TBE 1 fois).
- Déposer les échantillons auxquels on a ajouté une solution d'alourdisseur (Tampon d'échantillon) dans les puits et effectuer la migration au voltage désiré.
- Visualiser le gel sous UV (Transilluminateur, longueur d'onde 302 nm).

**8.3. Electrophorèse en gel de polyacrylamide non dénaturant.**

L'acrylamide est un monomère. En présence de radicaux, qui sont fournis par le persulfate d'ammonium (APS) et stabilisé par le TEMED (N,N,N',N'-tetraméthyléthyléthyldiamine), une réaction en chaîne est initiée et les monomères d'acrylamide polymérisent en longues chaînes. Lorsque le N,N'-methylènebisacrylamide est ajouté, ces longues chaînes se polymérisent pour former un gel poreux. Plus le pourcentage d'acrylamide du gel est important, plus la résolution de la migration de l'ADN est meilleure (**Tableau II-7**), ce qui permet d'obtenir des gels résolutifs à la base près.

Cuve à électrophorèse	(Horizon <sup>r</sup> 11-14, Gibco, Paisley, Grande -Bretagne).
Transilluminateur	(Longueur d'onde: 302nm, Analis, Belgique).
Appariel Polaroid	(Modèle 44-16 MP4 Instant Camera System, USA).
Film Polaroid	(Duofilm, 667 Iso 3000 / 36°C, Janssen, Beerse, Belgique).
<b>TBE IX</b> On le prépare à partir d'une solution stock TBE 10 X. <b>Agarose</b> (Ultra Pure Grade Agarose, Biorad, Belgique) <b>Bromure d'éthidium</b> (stock : 500 µg/ml, Sigma, USA).	<b>Tampon d'échantillon</b> - Glycérol 50 % (Merck, Allemagne) - EDTA 100 mM (Merck, Allemagne) - SDS 1 % (Merck, Allemagne) - Bleu de bromophénol 0,1 % (Across, Belgique) <b>Marqueur de poids moléculaire</b> - 100bp DNA Ladder ( Promega, USA)

**Tableau II-6 :** Matériel utilisé pour l'électrophorèse en gel d'agarose.



**Figure II- 3:** Localisation du bromure d'éthidium dans une molécule d'ADN

(Watson, J.D et al., 1989).



% d'acrylamide	taille des fragments d'ADN (bp)
3,5	100-2000
5,0	80-500
8,0	60-400
12,0	40-200
15,0	25-150

**Tableau II-7 :** Concentration en acrylamide à utiliser selon la taille des protéines à séparer

### Matériel

- Pour la réalisation de ce gel, nous avons besoin
  - Acrylamide (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).
  - N-N'-méthylènebisacrylamide (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).
  - TBE 10 × (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).
  - Ammonium persulfate (APS) (Boehringer, Mannheim, Allemagne).
  - N, N, N', N'-tetra-méthyl-éthylènediamine (TEMED) (Biorad, Richmond, USA).
  - Eau distillée
- Pour le chargement des échantillons.
  - Tampon d'échantillon:
  - Glycérol 50 % (Merck, Darmstadt, Allemagne).
  - EDTA 100 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne).
  - SDS 1 % (Merck, Darmstadt, Allemagne).
  - Bleu de bromophénol 0,1 % (Accros, Geel, Belgique).
  - ADN-c amplifié par PCR
  - Cuves d'électrophorèse (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).
- Pour le démoulage du gel.
  - Papier Whatman
  - Film Saran
  - Cassettes pour autoradiographie
- Pour le développement du film en chambre noire
  - Solution de révélation (Ilford, Mobberley, Grande-Bretagne).
  - Solution de fixation (Ilford, Mobberley, Grande-Bretagne).

### Méthode

Pour un gel 5 % non dénaturant, mélanger :

- Acrylamide 30 % 8,75 ml.
- TBE 10 × 2,5 ml.
- H<sub>2</sub>O distillée porter à 50 ml.
- APS (0,1 g/ml) 300 µl.

- TEMED 25  $\mu$ l.

- Couler le gel dans la cuve et placer le peigne.
- Laisser polymériser 1 heure.
- Placer le gel dans sa cuve et remplir celle-ci de TBE 1 fois (0,1 M Tris-HCl, pH 8,4 ; 0,9 M Acide borique ; 0,01 M EDTA).
- Déposer les échantillons auxquels on a ajouté une solution d'alourdisseur (Tampon d'échantillon) dans les puits et effectuer la migration à un voltage de 120V.
- Quand la migration est terminée, on pose le gel du côté de la petite plaque. Le gel est ensuite absorbé sur une feuille de papier Whatman. Il est mis en contact avec un film Saran avant d'être séché une heure à 80 °C. Enfin, on dépose le gel dans une cassette
- On développe le film en chambre noire par passage de quelques secondes dans la solution de révélation (diluée 5 $\times$ ), quelques minutes dans l'eau distillée afin de le rincer puis, 3 min dans la solution de fixation (diluée 5 $\times$ ). Pour terminer, le film est rincé et séché à température ambiante.

## **9. RPA (RNase Protection Assay).**

La RPA est une technique d'hybridation où des sondes de nature ribonucléique marquées [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ], forment des duplex stables avec leur cible de type ARN. Les produits de l'hybridation sont soumis à une digestion enzymatique par la RNase. Tout les ARN non hybridés, ainsi que les sondes en excès, sont alors dégradés.

Après une électrophorèse sur gel d'acrylamide des produits de la digestion, puis auto radiographie, seuls les ARN hybridés (protégés par une sonde) sont détectables.

Cette technique permet, à la fois, la détection et la quantification de l'expression de plusieurs gènes

L'ARN étant très fragile, chaque étape de ce protocole doit être effectuée de manière RNase free.

### **9.1. Synthèse de la sonde.**

#### **Matériel.**

- Le kit RPA : (Pharmlingen, San Diego, USA).
  - Tampon d'hybridation 1x.
  - Tampon RNase 1x.
  - RNase A + T1 Mix (RNase A :80 ng/ $\mu\text{l}$ ) ( T1 : 250 U/ $\mu\text{l}$ ).
  - Protéinase K (10 mg/ml).
  - Tampon Protéinase K 1x.
  - ARNt de levure (2 mg/ml).
  - Acétate d'ammonium 4 M.
  - Loading buffer 1x.
- $\beta$ -mercaptoethanol.
- Phénol saturé en  $\text{H}_2\text{O}$
- Chloroforme/alcool isoamylique (Sigma, St Louis, USA).
- Isopropanol.
- Éthanol (100 % et 66 %) (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Eau RNase free.

#### **Méthode.**

- Pour chaque synthèse de sondes, ajouter, dans cet ordre, dans un tube de type eppendorf :
  - 1  $\mu\text{l}$  de RNasin.
  - 1  $\mu\text{l}$  de GACU.
  - 2  $\mu\text{l}$  de DTT.

- 4  $\mu\text{l}$  de tampon de transcription 5x.
- 1  $\mu\text{l}$  d'amorces RPA.
- 10  $\mu\text{l}$  de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ .
- 1  $\mu\text{l}$  de T7 RNA polymérase (conserver à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation).
- Mélanger doucement avec une pipette et centrifuger rapidement à 12000 g. Incuber à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 1 heure.
- Terminer la réaction en ajoutant 2  $\mu\text{l}$  de DNase. Mélanger doucement en inversant les tubes et passer rapidement à la centrifugeuse à 12000 g. Incuber à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 30 minutes.
- Ajouter dans chacun des tubes et dans cet ordre :
  - 26  $\mu\text{l}$  de EDTA 20 mM.
  - 25  $\mu\text{l}$  de phénol saturé en Tris.
  - 25  $\mu\text{l}$  de chloroforme:alcool isoamylique (50 :1).
  - 2  $\mu\text{l}$  d'ARNt de levure.
- Vortexer jusqu'à obtenir une émulsion et centrifuger pendant 5 minutes à température ambiante.
- Transférer la phase aqueuse supérieure dans un nouveau tube eppendorf et ajouter 50  $\mu\text{l}$  de chloroforme : alcool isoamylique (50 :1). Vortexer et centrifuger 2 minutes à température ambiante.
- Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube eppendorf et ajouter 50  $\mu\text{l}$  d'acétate d'ammonium 4M et 250  $\mu\text{l}$  d'éthanol 100 % glacé. Mélanger les tubes par renversement et incuber 30 minutes à  $-70^{\circ}\text{C}$ , puis centrifuger à 15000 g pendant 15 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Décanter le surnageant et resuspendre le culot avec 100  $\mu\text{l}$  d'éthanol 90 % froid. Centrifuger à 15000 g pendant 5 min à  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Décanter tout le surnageant et sécher le culot à l'air pendant 5 à 10 minutes, ensuite ajouter 50  $\mu\text{l}$  de tampon d'hybridation et solubiliser le culot en vortexant doucement pendant environ 20 secondes. Centrifuger rapidement à 12000 g.
- Quantifier les produits en mettant 1  $\mu\text{l}$  de sonde dans 5 ml de liquide scintillation et en plaçant le mélange dans un compteur à scintillation (de  $3 \times 10^5$  à  $3 \times 10^6$  CPM/ $\mu\text{l}$ ). Stocker les sondes à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

## **9.2. Préparation de l'ARN et hybridation.**

- Ajouter la quantité désirée d'ARN total cible (1 à 20  $\mu\text{g}$ ) dans des tubes eppendorf et inclure un tube contenant de l'ARN de transfert de levure comme contrôle de fond.
- Si l'ARN a été stocké dans de l'eau, il faut congeler les échantillons pendant 15 min à  $-70^{\circ}\text{C}$  et ensuite sécher dans une centrifugeuse à évaporation sous vide.
- Ajouter 8  $\mu\text{l}$  de tampon d'hybridation dans chaque échantillon et solubiliser l'ARN en vortexant pendant 3 à 4 minutes. Centrifuger à 12000 g.

- Diluer les sondes avec le tampon d'hybridation pour obtenir la concentration appropriée. (Tableau II- ) et ajouter 2 µl de celle-ci dans chaque échantillon d'ARN. Mélanger avec une pipette et ajouter une goutte d'huile minérale dans chaque tube et centrifuger rapidement à 12000 g.
- Placer les échantillons dans un bain préchauffé à 90°C, puis diminuer la température à - 56°C et incuber pendant 12 à 16 heures.
- Enfin, diminuer la température du bain à 37°C pendant 15 minutes avant le traitement à la RNase.

### **9.3. Traitement des échantillons à la RNase.**

- Préparer le cocktail RNase suivant (pour 20 échantillons) :
  - 2,5 ml de Tampon RNase.
  - 6 µl de RNase A + T1 mix.
- Retirer les échantillons d'ARN du bain et ajouter 100 µl du cocktail RNase sous la goutte d'huile (dans la phase aqueuse). Centrifuger pendant 10 secondes et incuber 45 minutes à 30°C.
- Avant la fin de la digestion RNase, préparer le cocktail Protéinase K (pour 20 échantillons).
  - 390 µl de tampon Protéinase K.
  - 30 µl de Protéinase K.
  - 30 µl de ARNt de levure.
- Mélanger et ajouter 18 µl de ce cocktail dans de nouveaux tubes eppendorf.
- Extraire le produit de la digestion par la RNase en évitant la goutte d'huile et la transférer dans les tubes contenant la solution Protéinase K. Vortexer rapidement, centrifuger à 12000 g et incuber pendant 15 minutes à 37°C.
- Ajouter 65 µl de phénol saturé en Tris et 65 µl de chloroforme : alcool isoamylique (50 :1)  
Vortexer jusqu'à obtenir une émulsion et centrifuger pendant 5 minutes à température ambiante.
- Extraire la phase aqueuse supérieure et la transférer dans un nouveau tube eppendorf. Ajouter 120 µl d'acétate d'ammonium 4M et 650 µl d'éthanol 100 % froid. Mélanger en retournant les tubes eppendorf et incuber 30 minutes à -70°C. Centrifuger à 15000 g, 15 minutes à 4°C.
- Retirer le surnageant et ajouter 100 µl d'éthanol 90 % glacé. Centrifuger à 15000 g, 5 minutes à 4°C.
- Retirer le surnageant et sécher le culot complètement (ne pas utiliser une centrifugeuse à évaporation sous vide). Ajouter 5 µl de tampon de chargement 1x, vortexer 2 à 3 minutes et centrifuger rapidement à 12000 g. Avant de charger les échantillons sur le gel, chauffer les échantillons à 90°C pendant 3 minutes et les placer ensuite immédiatement dans la glace.

## **9.4. Migration.**

- Avant de réaliser le montage des plaques d'électrophorèse pour couler le gel, la grande plaque est traitée au diméthylchlorosilane pour permettre un démoulage plus aisé du gel.
- La composition du gel d'acrylamide est la suivante (pour 74,5 ml) :
  - 5 % d'acrylamide/ N-N-méthylène bisacrylamide (19 :1).
  - 35,8 g d'urée.
  - 7,5 ml de tampon TBE (0,1 M Tris-HCl, 0,9 M acide borique, 0,01 M EDTA).
  - Porter à volume avec de l'eau désionisée.
  - Dégazer le mélange grâce à une pompe à vide pendant 10 minutes.
  - 450 µl d'ammonium persulfate 10 % (APS).
  - 60 µl de TEMED.
- Couler le gel immédiatement, sans bulle, placer le peigne approprié.
- Après polymérisation (1 heure), retirer le peigne et laver les puits avec du TBE 0,5 x. Faire pré-migrer à une puissance constante de 40 W pendant 45 minutes, avec du TBE 0,5 x comme tampon de migration. Le gel peut atteindre une température de 50°C.
- Laver encore les puits avec du TBE 0,5 x puis charger les échantillons et le marqueur de poids moléculaire. Faire migrer le gel à 50 W jusqu'à ce que le front de bleu de bromophénol atteigne 30 cm.
- Désassembler le gel du moule et l'absorber sur du papier Whatman. Placer une feuille de Cellophane sur le gel et le sécher entièrement (1 h à 80°C).
- La radioactivité peut être lue par phosphoimaging avant que le gel séché ne soit mis avec un film (Kodak X-AR) dans une cassette et placer à -70°C (le temps d'exposition varie en fonction de l'application).

## **10. Immunofluorescence**

L'immunofluorescence est une technique qui permet de localiser des protéines au sein des cellules grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques de la protéine recherchée. Ces anticorps sont ensuite détectés au moyen d'anticorps anti-immunoglobuline qui sont par ailleurs couplés chimiquement à des fluorochromes comme la rhodamine qui émet une lumière rouge quand on l'irradie avec la fréquence d'excitation appropriée.

### **Matériel.**

- Boîtes de Pétri de 3,5 cm de diamètre (Falcon, Plymouth, Grande-Bretagne).
- Lamelles couvre-objet de 2 x 2 cm (Vel, Knittel Glaser, Allemagne).
- Lame porte-objet de 2,6 x 7,6 cm (Vel, Knittel Glaser, Allemagne).
- PBS (Phosphate Buffer Saline).  
Pour 100 ml : - 0,9 g de NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne).  
                  - 2 ml de tampon  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 mM pH 7,4.  
                  - Porter à volume avec de l'eau distillée.
- Paraformaldéhyde 4 % dans du PBS (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Triton X-100 1 % dilué dans du PBS (Sigma, St Louis, USA).
- PBS + BSA 3 % : PBS pour diluer les anticorps contenant 3 % d'albumine de sérum bovin (Sigma, St Louis, USA).
- Anticorps primaires : anticorps anti-SMAD4 dilué 200 x dans du PBS.
- Anticorps secondaires : anticorps anti-IgG de lapin marqués à l'ALEXA dilué 1000 x dans du PBS + BSA 3 %.
- Méwiol (Sigma, St-Louis, USA).

### **Méthode.**

Après avoir été repiquées dans des boîtes de Pétri contenant une lamelle porte-objet, les cellules sont rincées avec 1 ml de PBS. Ensuite, les cellules sont fixées sur les lamelles avec 1 ml de PBS + paraformaldéhyde 4 % pendant 10 minutes à température ambiante avant d'être à nouveau rincées 3 x avec 1 ml de PBS. Leurs membranes sont alors perméabilisées avec 2 ml de Triton X-100 1 % pendant 5 minutes afin de permettre l'entrée de l'anticorps dans les cellules.

On décante et on réalise ensuite le marquage spécifique des cellules en les incubant en présence d'anticorps primaires pendant 2 heures à température ambiante. Après avoir rincé les cellules avec 3 x 1 ml de PBS + BSA 3 %, on ajoute alors l'anticorps secondaire pendant 1 heure à température ambiante dans l'obscurité. Les cellules sont rincées une dernière fois avec 3 x 1 ml de PBS + BSA 3 % avant de monter les lamelles dans une goutte de méwiol sur une lame porte-objet. Le tout est placé dans l'obscurité jusqu'à observation au microscope à fluorescence.

## **11. Séquençage.**

La technique de séquençage utilisée est un séquençage à fluorescence par PCR avec le système ABI.PRISM Dye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Perkin-Elmer (Roche), USA).

On réalise sur le fragment à séquencer une PCR en présence d'une seule des 2 amorces permettant l'amplification en PCR simplex. Le mix PCR contient un mélange adéquat de nucléotides terminateurs marqués par un agent fluorescent (fluorescéine, rhodamine,...) bloquant l'élongation lorsqu'ils sont insérés dans l'amplicon, et de nucléotides non marqués permettant l'élongation.

La réaction PCR produit alors un ensemble d'amplicons de taille variable et terminés par un nucléotide fluorescent. Cette population ensuite déposée sur un gel d'acrylamide à haute résolution migre suivant la taille des fragments. Sur ce profil de migration passe un laser qui excite les marqueurs fluorescents réémettant sous une longueur d'onde qui leur est propre, la succession des réémissions donnant la séquence.

La séquence sens s'obtiendra si on met l'amorce anti-sens et inversement pour la séquence anti-sens.

### **Méthode.**

- Placer dans un tube à PCR 100 à 150 ng de matrice à séquencer.
- Ajouter l'amorce sens ou anti-sens à une concentration finale de 3,2 pmoles.
- Compléter avec de l'eau pour obtenir un volume final de 10 µl après ajout du mix de nucléotides.
- Mettre 4 µl de terminator Ready Reaction Mix (Perkin-Elmer (Roche), USA) contenant la polymérase, les dNTPs, les dNTPs terminateurs fluorescents et le tampon PCR.
- Réaliser 25 cycles PCR dans les conditions :
  - Dénaturation à 96°C 10 secondes
  - Hybridation à 50°C 5 secondes
  - Élongation à 60°C pendant 4 minutes
- Pour chaque réaction de séquençage, préparer un tube de type eppendorf de 1,5 ml dans lequel on place 25 µl d'éthanol 95 % (Merck, Darmstadt, Allemagne), 1 µl de NaAc 3 M pH 4,6 ou 5,2 (Merck, Darmstadt, Allemagne) et les 10 µl de la réaction PCR de séquençage.
- Agiter fortement et placer sur glace 10 minutes.
- Centrifuger 30 minutes à 15000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379, Belgique), 4°C.
- Éliminer le surnageant.
- Laver avec 250 µl d'éthanol 70 % (Merck, Darmstadt, Allemagne).



- Centrifuger 15 minutes à 15000 rpm (Heraus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379, Belgique), 4°C.
- Éliminer le surnageant et sécher le culot sous vide.
- Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel d'acrylamide 4 %, la lecture de la séquence étant effectuée de manière automatique par l'appareil ABI.PRISM.
- Une fois la séquence obtenue, on vérifie son identité sur un programme informatique appelé Blast NCBI ou BCM search launcher disponibles sur internet aux adresses respectives:
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-blast?Jform=0>
- <http://kiwi.imgem.bcm.tcm.edu:8088/search-launcher.html>.

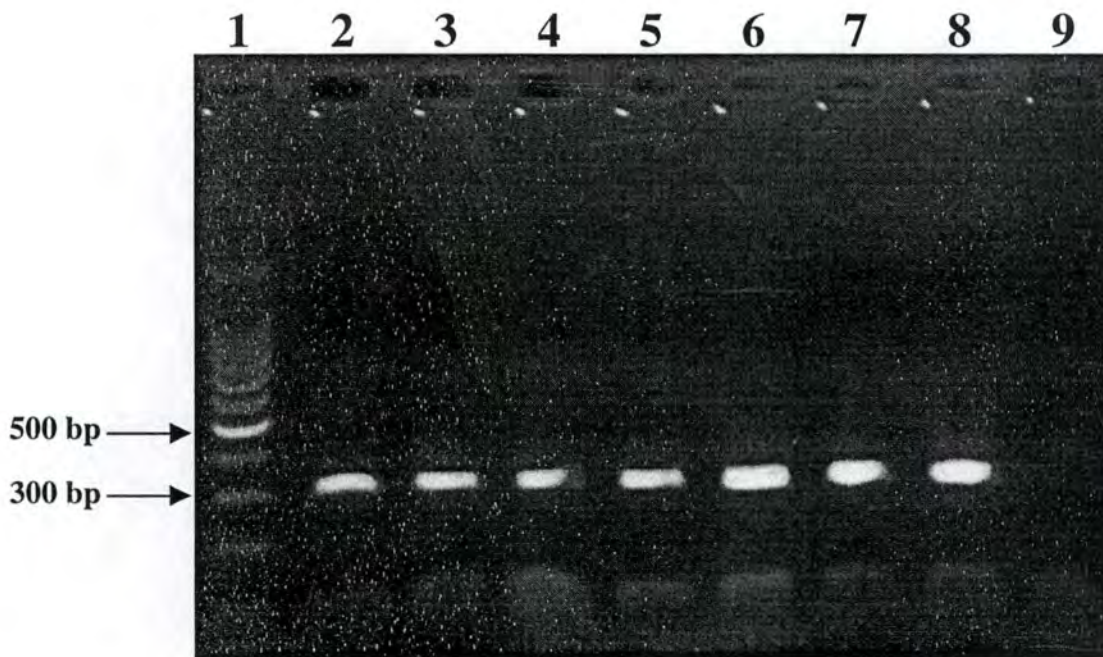
*Résultats*  
*et*  
*discussions*

## 1. Etude de l'expression du TGF- $\beta$ 1 au cours du temps lors du vieillissement accéléré par des stress oxydatifs.

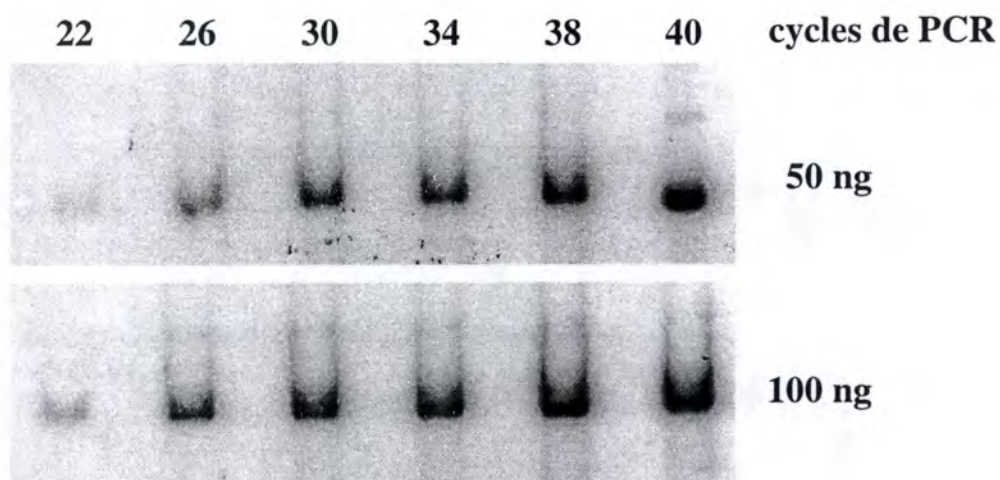
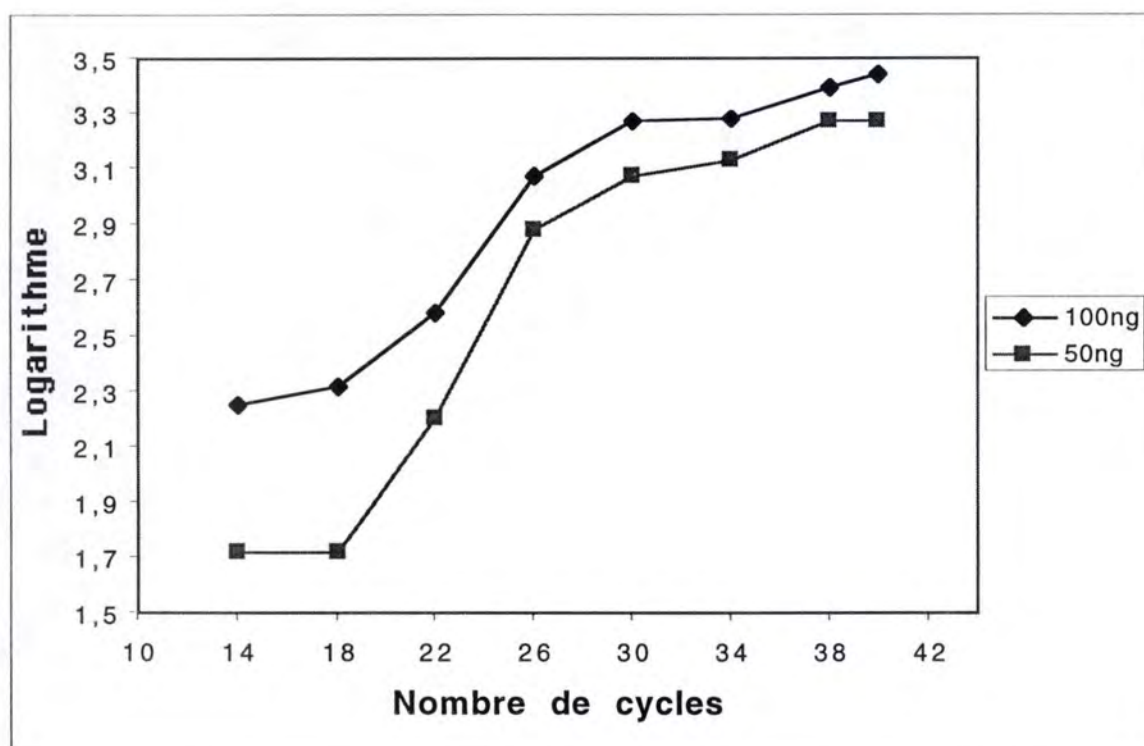
Dans un premier temps, nous avons étudié le niveau d'ARNm du TGF- $\beta$ 1 après un stress de 2 heures avec de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  150  $\mu\text{M}$ , à l'aide de la technique de RT-PCR semi-quantitative. Les cellules ont été lysées 3, 6, 12, 24, 48 et 72 heures après le stress. Des cellules contrôles ont été incubées avec du milieu MEM + sérum. Les ARN totaux ont été extraits. Nous avons réalisé des RT-PCR semi-quantitatives et avons comparé le niveau d'amplification obtenu pour le TGF- $\beta$ 1 au niveau de transcription obtenu pour un gène constitutif de la glycolyse : la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase humaine (GAPDH). D'autres expériences réalisées au laboratoire ont permis de savoir que le niveau d'ARNm de GAPDH ne varie pas dans les conditions étudiées. Les conditions de RT-PCR ont été mises au point pour ces deux gènes. Nous avons utilisé 100 ng d'ARN total extrait des cellules stressées pendant 2 heures à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Après 40 cycles d'amplification, nous observons une seule bande correspondant à des amplicons de taille attendue de 299 bp, d'intensité similaire dans tous les échantillons testés (**Figure III-1**).

Après cette RT-PCR préliminaire, nous avons fait varier le nombre de cycles d'amplification du TGF- $\beta$ 1 afin de situer la phase exponentielle de la PCR en partant de 50 et 100 ng d'ARN total. Nous avons analysé les produits obtenus sur un gel de polyacrylamide 5 % non dénaturant. En ce qui concerne le TGF- $\beta$ 1, sur l'autoradiographie du gel obtenu à partir des ARN de fibroblastes, l'intensité de ces bandes augmente avec le nombre de cycles d'amplification (**Figure III-2a**). Lorsque nous quantifions les bandes obtenues à l'Instant Imager (**Figure III-2b**), nous observons une relation linéaire entre le nombre de cycles PCR allant de 22 à 26 cycles. Au-delà de 26 cycles, la courbe s'infléchit témoignant d'un début de saturation au niveau de la PCR. Pour rester dans la phase exponentielle de la PCR, nous avons choisi 24 cycles d'amplification dans les RT-PCR réalisées sur le gène TGF- $\beta$ 1. Pour la GAPDH, nous avons choisi, selon une procédure similaire, un nombre de cycles égal à 20.

Les conditions de la RT-PCR étant fixées, nous avons étudié l'influence d'un stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  sur le niveau d'expression d'ARNm du TGF- $\beta$ 1. Parallèlement, nous avons réalisé des RT-PCR avec des amorces s'hybridant à l'ARNm du TGF- $\beta$ 1 et de GAPDH. Cela nous a permis de rapporter la quantité d'amplicons TGF- $\beta$ 1 à la quantité d'amplicons GAPDH trouvés dans chaque échantillon et par conséquent de comparer le niveau d'ARNm de TGF- $\beta$ 1 dans les différentes conditions. Nous obtenons aussi une seule bande, correspondant ici à des amplicons de taille attendue de 326 bp. Les résultats obtenus se trouvent sur la **figure III-3 (autoradiographie) et III-4 (quantifications)**.



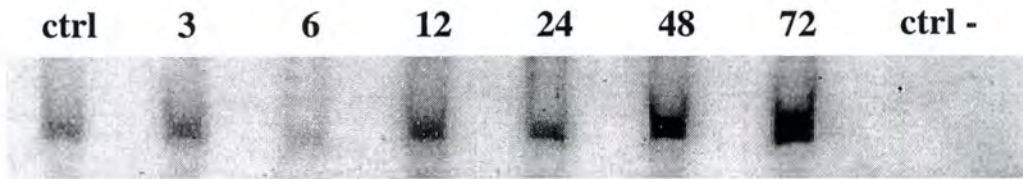
**Figure III-1 :** Amplification obtenue par RT-PCR à partir de l'ARNm de GAPDH et donnant des fragments de taille attendue de 300 paires de bases.  
Piste 1 : Etalon de poids moléculaire.  
Piste 2 : Cellules non stressées.  
Piste 3 : IMR-90 lysées 3 heures après un stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ .  
Piste 4 : IMR-90 lysées 6 heures après un stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ .  
Piste 5 : IMR-90 lysées 12 heures après un stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ .  
Piste 6 : IMR-90 lysées 24 heures après un stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ .  
Piste 7 : IMR-90 lysées 48 heures après un stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ .  
Piste 8 : IMR-90 lysées 72 heures après un stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ .  
Piste 9 : Contrôle négatif (pas d'ARN).

**A.****B.**

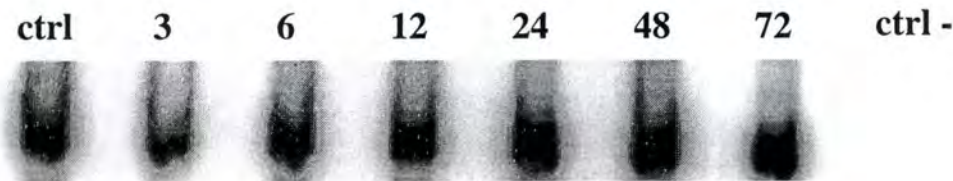
**Figure III-2 :** Analyse par RT-PCR radioactive de l'expression de TGF- $\beta$ 1 en fonction du nombre de cycles. La RT-PCR a été réalisée à partir de 50 ng et 100 ng d'ARN total extrait de fibroblastes IMR-90. Les amplicons ont été analysés sur un gel de polyacrylamide (5%). Les bandes correspondant aux amplicons TGF- $\beta$ 1 ont été quantifiées à l'aide de l'Instant Imager.

A. Autoradiographie du gel de polyacrylamide.

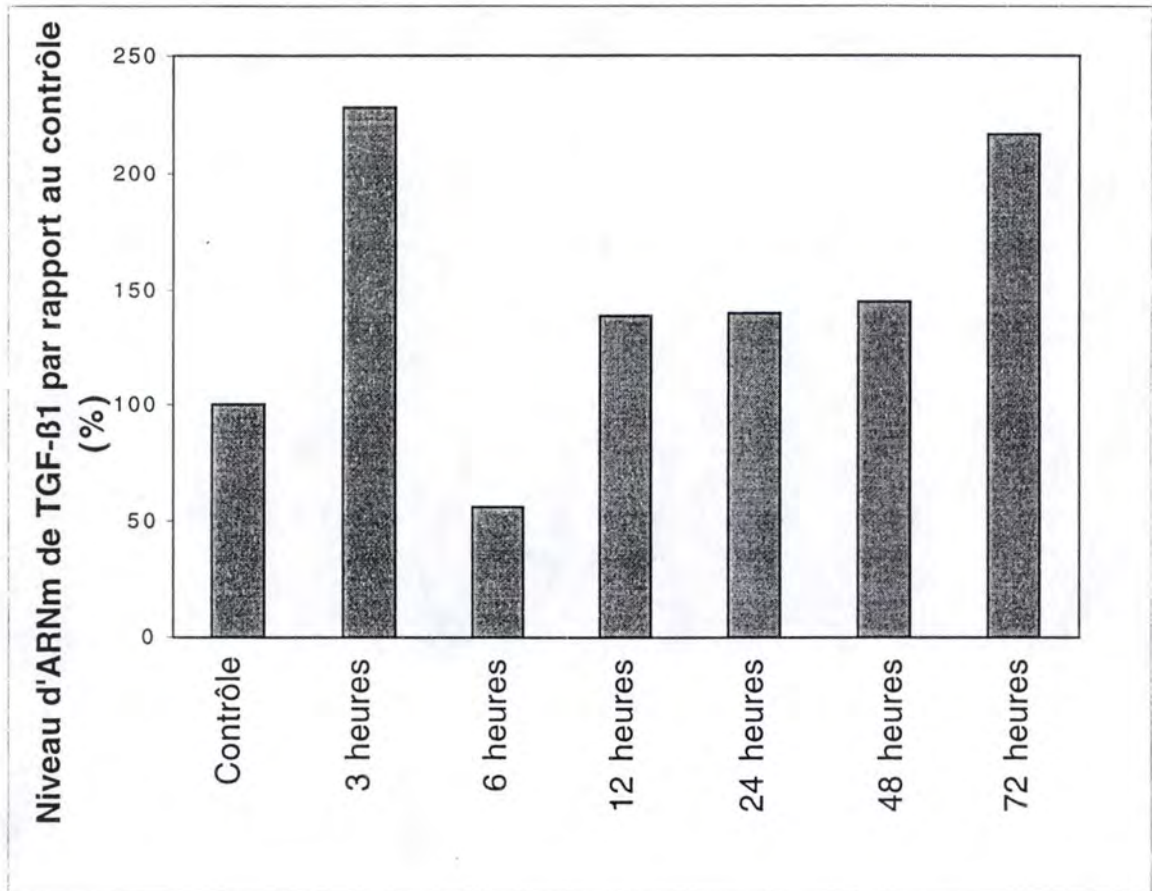
B. Quantification des bandes obtenues sur gel de polyacrylamide correspondant aux amplicons de TGF- $\beta$ 1 à l'aide de l'Instant Imager.



**Figure III-3a :** Niveau d'ARNm du TGF- $\beta_1$  en fonction du temps après un stress de 2 heures sous 150  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Autoradiographie des différentes bandes obtenues par RT-PCR semi-quantitative à partir de 100 ng d'ARN total en utilisant des amorces spécifiques du TGF- $\beta_1$ .



**Figure III-3b :** Niveau d'ARNm de GAPDH en fonction du temps après un stress de 2 heures sous 150  $\mu\text{M}$  d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Autoradiographie des différentes bandes obtenues par RT-PCR semi-quantitative à partir de 100 ng d'ARN total en utilisant des amorces spécifiques de la GAPDH.



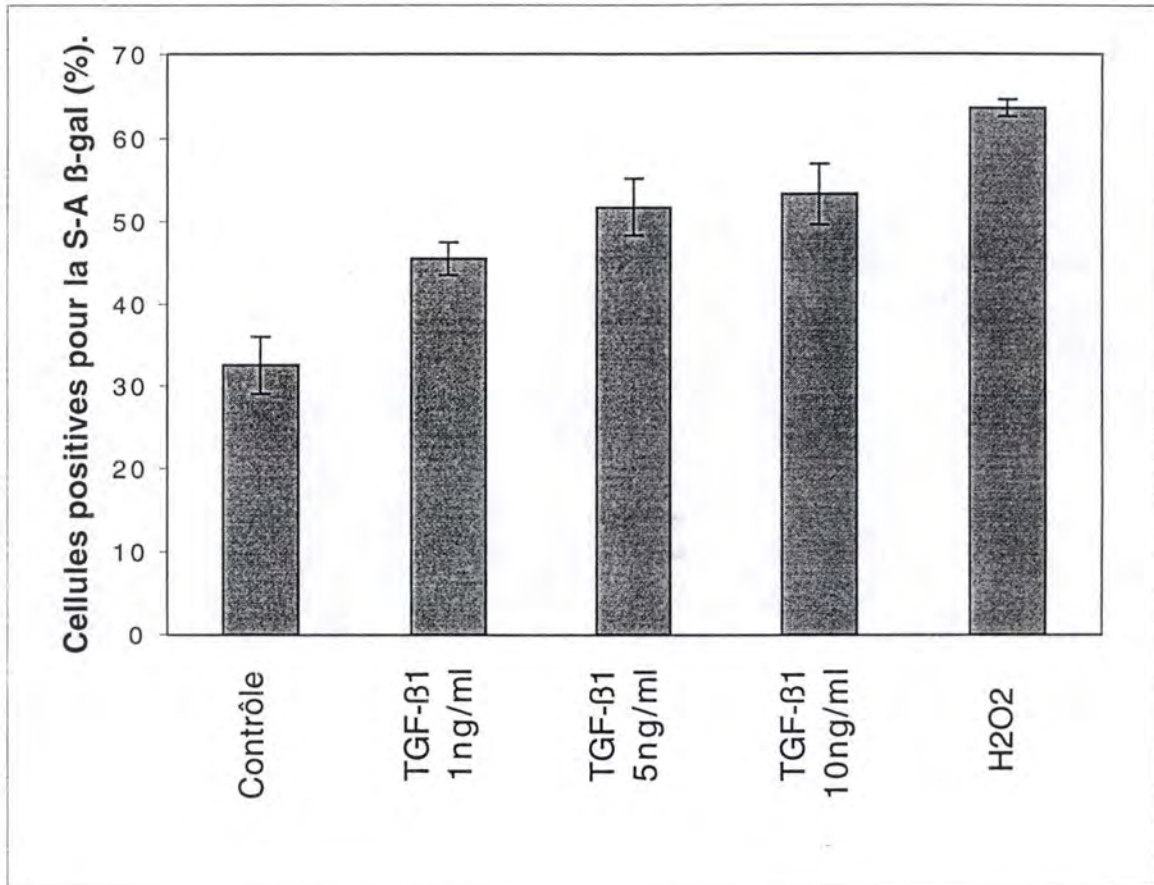
**Figure III-4 :** Effet d'un stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $150 \mu\text{M}$ ) pendant 2 heures sur le niveau d'ARNm du TGF- $\beta$ 1 au cours du temps après le stress. Quantifications obtenues à partir des autoradiographies présentées à la Figure III-3a et III-3b.

Par comparaison avec les cellules contrôles, on observe que le niveau d'ARNm du TGF- $\beta$ 1 semble augmenter fortement dès les trois premières heures où le niveau d'ARNm de TGF- $\beta$ 1 est 2,3 fois plus élevé dans les cellules stressées à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  par rapport aux cellules contrôles. Cet effet stimulateur de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  s'atténue après 6 heures, pour augmenter de nouveau à 12 heures atteignant un pic à 2,2 fois, à 72 heures.

D'après ces résultats, il semble donc que le niveau d'ARNm du TGF- $\beta$ 1 connaisse deux vagues d'accroissement après un stress de 2 heures avec de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , dans les fibroblastes IMR-90. La première vague semble être de durée assez limitée alors que la seconde vague s'étale au moins sur 60 heures.

Ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse que l'élévation du niveau d'ARNm du TGF- $\beta$ 1, suite à un stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , se déroulerait en deux étapes bien distinctes. On aurait d'abord induction d'une sur-expression du TGF- $\beta$ 1 à court terme, donc, directement après le stress. Ensuite, avec le temps, d'autres mécanismes moléculaires se mettraient en route et expliqueraient la seconde vague observée.





**Figure III-5:** Effet du TGF-β<sub>1</sub> et de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la proportion de cellules présentant une activité S-A β-gal. Les cellules ont été incubées pendant 72 heures avec du TGF-β<sub>1</sub> à des concentrations de 1 à 10 ng/ml. Le stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM a duré 2 heures et la proportion de cellules positives pour la S-A β-gal a été déterminée au jour 3 après le stress.

## **2. Apparition de biomarqueurs de la sénescence réplivative après stimulation des fibroblastes IMR-90 avec du TGF- $\beta$ 1.**

Les fibroblastes humains *in vitro* comme *in vivo*, acquièrent différents biomarqueurs lors de leur vieillissement. Par exemple, on note l'activité S-A  $\beta$ -gal, le raccourcissement des télomères, l'arrêt irréversible de la prolifération cellulaire et des modifications de l'expression du niveau d'expression de certains gènes (Dumont, P., *et al*, 2000).

Dans l'introduction, nous avons également mentionné que des stress oxydatifs sublétaux appliqués à des cultures de fibroblastes humains jeunes IMR-90 induisent un vieillissement prématuré de celles-ci et donc l'apparition de ces biomarqueurs.

D'autre part, les résultats que nous avons obtenus au point précédent montrent une augmentation du niveau d'ARNm du TGF- $\beta$ 1 chez des fibroblastes IMR-90 ayant subi un stress oxydatif d'intensité conduisant à la sénescence réplivative.

Sur base de ces observations, nous avons posé comme première hypothèse qu'une stimulation de nos cellules par le TGF- $\beta$ 1 pourrait induire l'apparition de biomarqueurs de la sénescence cellulaire.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'apparition de l'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence. Par la suite, nous nous sommes attardés à la variation du niveau d'ARNm transcrit à partir de gènes connaissant une variation d'expression lors de la sénescence.

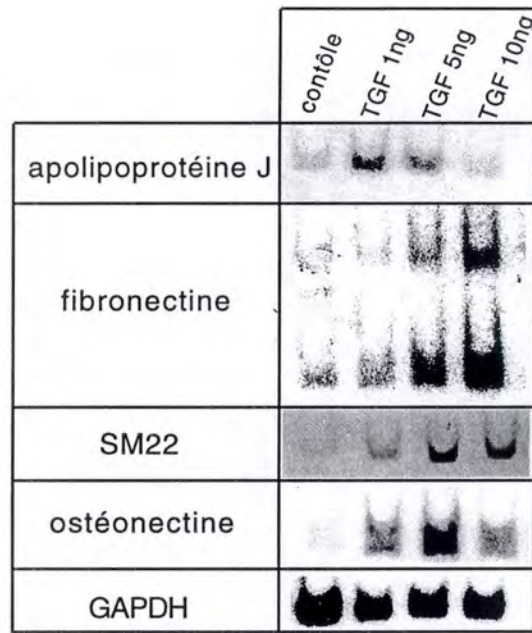
### **2.1. Effet du TGF- $\beta$ 1 sur l'activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence.**

Il existe une activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (S-A  $\beta$ -gal). Les cellules possédant cette activité se colorent en bleu à pH 6, lorsqu'on les incube avec un substrat artificiel, le 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranosine (X-gal). Cette activité est présente dans les cellules sénescents et ne se retrouve ni dans les cellules immortalisées, ni dans les cellules jeunes normales.

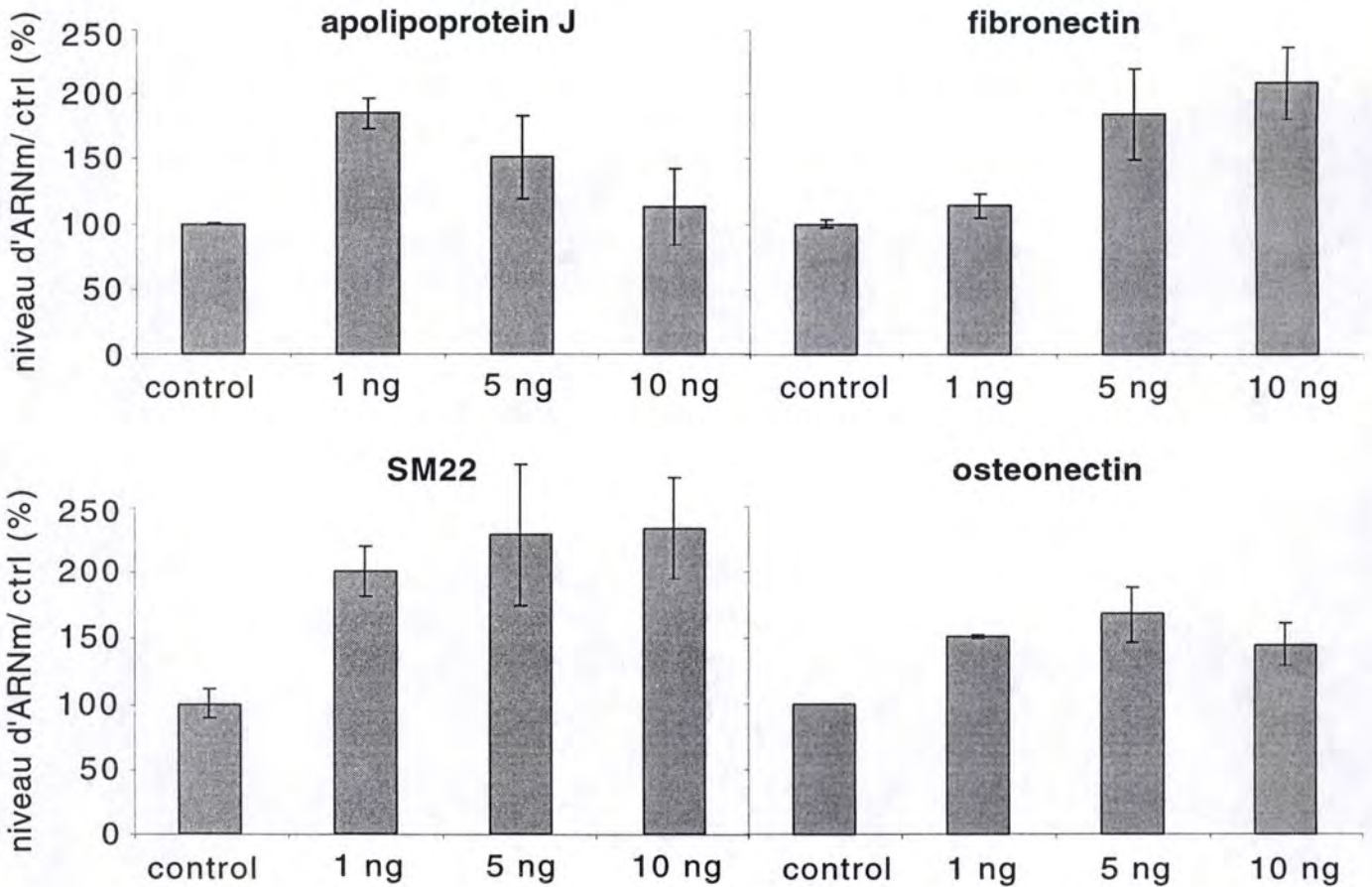
Nous montrons que la proportion de cellules positives pour la S-A  $\beta$ -gal par rapport aux cellules jeunes, augmentait de 31 % pour les fibroblastes jeunes stressés à l' $H_2O_2$  et de 13, 19 et 21 % pour les fibroblastes IMR-90 stimulés respectivement au TGF- $\beta$ 1 à 1, 5 et 10 ng/ml par rapport aux cellules contrôles (**Figure III-5**).

En conclusion, nous démontrons donc que le TGF- $\beta$ 1 induit un accroissement de la proportion de cellules présentant cette activité  $\beta$ -gal associée à la sénescence.

**A.**



**B.**



**Figure III-6 :** Effet du TGF- $\beta$ 1 sur le niveau d'ARNm de l'apolipoprotéine J, de la fibronectine, de SM22 et de l'ostéonectine de fibroblastes IMR-90. Les cellules ont été incubées pendant 72 heures avec du TGF- $\beta$ 1 à des concentrations de 1 à 10 ng/ml.

A. Autoradiographie des différentes bandes obtenues par RT-PCR semi-quantitatives à partir de 100ng d'ARN total en utilisant les amorces spécifiques de ces gènes.

B. Quantification des différentes bandes obtenues par l'InstantImager. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle.

## 2.2. Effet du TGF- $\beta$ 1 sur l'expression de 4 gènes ayant une variation d'expression spécifique de la sénescence.

Afin d'étudier le niveau de transcription de ces gènes, chez les cellules contrôles ou ayant subi des stimulations au TGF- $\beta$ 1 à différentes concentrations, l'ARN total de 4 populations fibroblastiques a été extrait.

- Population 1 : Fibroblastes IMR-90 jeunes, donc à faible nombre de passages en culture.
- Population 2 : Fibroblastes IMR-90 jeunes ayant subi, 72 heures avant extraction d'ARN, une stimulation au TGF- $\beta$ 1 à 1 ng/ml.
- Population 3 : Fibroblastes IMR-90 jeunes ayant subi, 72 heures avant extraction d'ARN, une stimulation au TGF- $\beta$ 1 à 5 ng/ml.
- Population 4 : Fibroblastes IMR-90 jeunes ayant subi, 72 heures avant extraction d'ARN, une stimulation au TGF- $\beta$ 1 à 10 ng/ml.

Si nous avons extrait l'ARN total des populations cellulaires à 72 heures après les stimulations, c'est pour étudier les effets à long terme du TGF- $\beta$ 1 sur la transcription des gènes d'intérêt. En effet, afin de savoir si les cellules ayant subi des stimulations au TGF- $\beta$ 1 possèdent le phénotype sénescence, les niveaux de transcription observés ne doivent pas correspondre à la réponse immédiate au TGF- $\beta$ 1, mais bien à une transcription présente à long terme après la stimulation au TGF- $\beta$ 1. Nous avons choisi 72 heures car nous savons que le phénotype sénescence s'installe 3 jours après des stress sublétaux sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dumont, P., *et al*, 2000).

Ici aussi, des RT-PCR semi-quantitatives radioactives ont été réalisées en utilisant l'ARNm de la GAPDH comme référence. Les RT-PCR semi-quantitatives sont pratiquées au nombre de cycles de PCR dans la zone d'amplification exponentielle, respectivement pour GAPDH et chacun des ARNm d'intérêt à savoir la fibronectine, l'ostéonectine, l'apolipoprotéine J et SM22. Ces gènes ont été choisis d'après l'étude de Dumont *et al*, 2000. Nous avons déterminé que le nombre de cycles de PCR à réaliser pour rester dans la zone exponentielle d'amplification de la PCR était respectivement de 27, 22, 20 et 23 pour la fibronectine, l'ostéonectine, l'apolipoprotéine J et SM22.

Dans les quantifications, le niveau de base d'expression (100 %) est celui des cellules jeunes non stressées (**Figure III-6**).

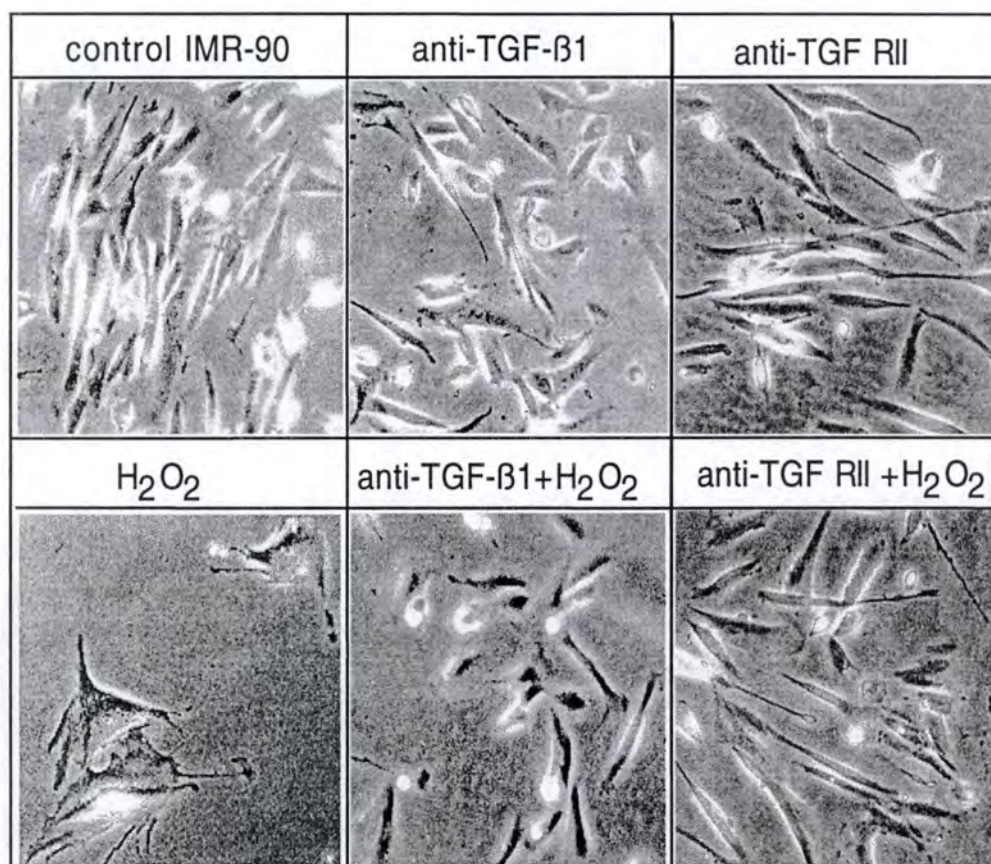
D'une manière générale, nous observons une élévation de la quantité des ARNm codant pour ces gènes chez les fibroblastes à 72 heures de stimulation au TGF- $\beta$ 1. Voyons maintenant au cas par cas. Pour la fibronectine, on observe deux transcrits qui passent de 100 % à 113 %, 184 % et 208 % respectivement pour les fibroblastes jeunes ayant subi une stimulation au TGF- $\beta$ 1 à 1, 5 et 10 ng/ml de milieu de culture.

En ce qui concerne SM22, on observe aussi une augmentation de son niveau d'ARNm en relation directe avec la concentration en TGF- $\beta$ 1. Ici, on dépasse au moins 200 % à chaque concentration en TGF- $\beta$ 1.

Dans le cas de l'ostéonectine, son expression est 1,5 fois, 1,7 fois et 1,4 fois plus élevée dans les cellules stimulées respectivement avec 1, 5 et 10 ng/ml de TGF- $\beta$ 1.

Quant à l'apolipoprotéine J, celle-ci voit son niveau d'ARNm augmenter après les stimulations au TGF- $\beta$ 1 à 1 et 5 ng/ml atteignant les valeurs respectives de 176 et 138 %. Nous observons une faible sur-expression non significative de 110 % à 10 ng/ml en TGF- $\beta$ 1. Ces résultats suggèrent que l'augmentation la plus marquée du niveau d'ARNm de l'apolipoprotéine J correspond à une stimulation en présence de la plus faible concentration en TGF- $\beta$ 1 à l'inverse de ce qui est observé pour la fibronectine, l'ostéonectine et SM22.

En conclusion, nous constatons que 72 heures d'incubation de fibroblastes IMR-90 en présence de TGF- $\beta$ 1 peuvent induire une augmentation du niveau d'ARNm des 4 gènes étudiés. Ce modèle cellulaire constitue donc aussi un système expérimental permettant d'étudier la régulation de l'expression de ces gènes par le TGF- $\beta$ 1.



**Figure III-7 :** Effet d'anticorps anti-TGF-β RII sur la morphologie des fibroblastes IMR-90 obtenue 72 heures après un stress de 2 heures avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 150 μM. Les cellules stressées sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou non ont été incubées 72 heures en présence soit de l'anticorps anti TGF-β1 (3 μg/ml), soit de l'anticorps anti TGF-β RII (10 μg/ml).

### 3. Etude de la morphologie, de la S-A $\beta$ -gal et de l'expression de 4 gènes, après neutralisation du TGF- $\beta$ 1.

En réalisant des stress oxydatifs sublétaux au moyen d' $H_2O_2$ , les cellules subissent un vieillissement accéléré tout en restant encore longtemps viables. Ce vieillissement se caractérise par une augmentation importante de morphotypes post-mitotiques et dégénératifs, ainsi qu'une augmentation du pourcentage de cellules présentant une activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence

Les résultats précédents suggèrent que des stimulations au TGF- $\beta$ 1 sur des fibroblastes IMR-90 induisent une augmentation de la proportion de cellules présentant une activité S-A  $\beta$ -gal et une augmentation du niveau d'ARNm de 4 gènes, tout comme lors de la sénescence normale.

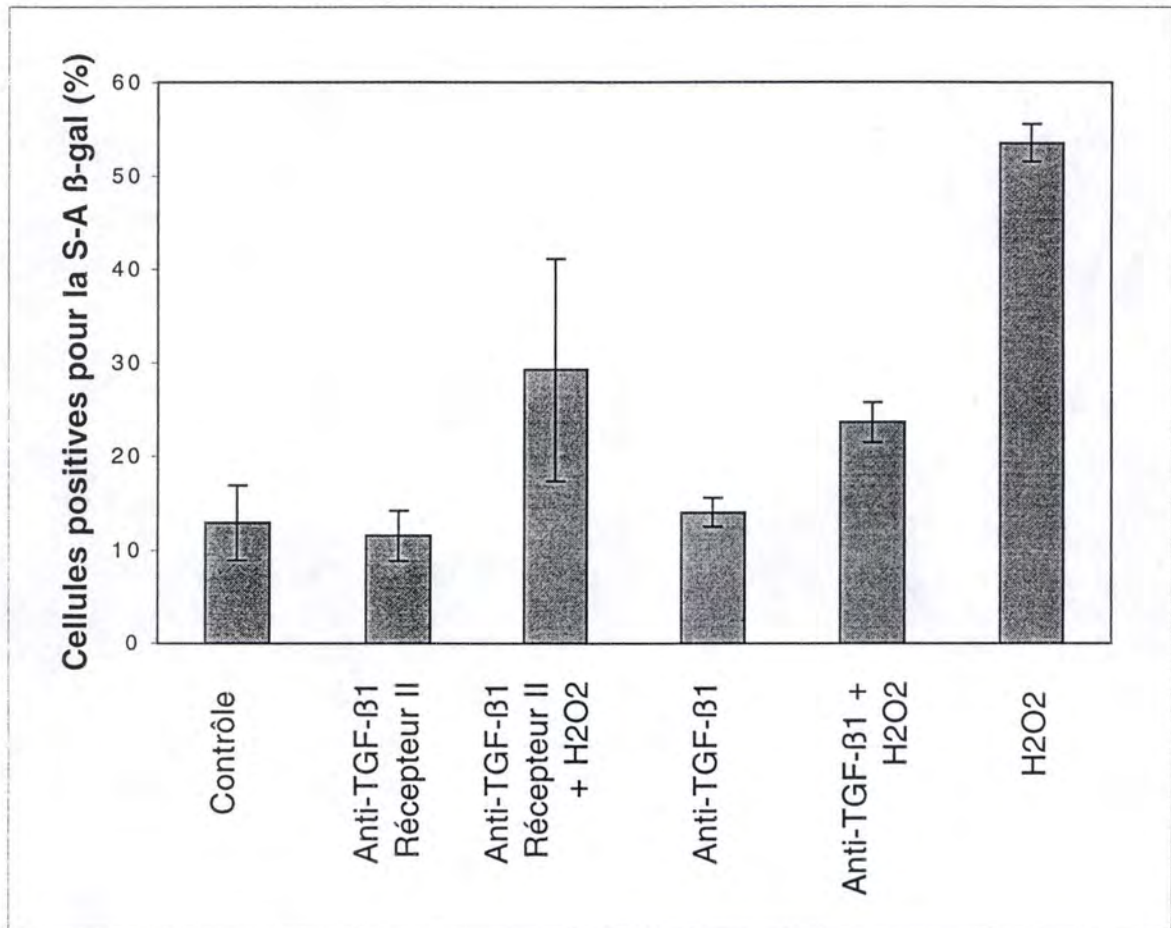
Pour savoir si le TGF- $\beta$ 1 joue un rôle dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence après stress sous  $H_2O_2$ , nous avons voulu bloquer la stimulation réalisée par le TGF- $\beta$ 1. Pour ce faire, nous avons utilisé un anticorps anti-TGF- $\beta$ 1 à une concentration de 3  $\mu$ g/ml de milieu de culture, et un anticorps anti-récepteur II du TGF- $\beta$ 1 (anti-TGF- $\beta$  RII) à une concentration de 10  $\mu$ g/ml de milieu de culture.

Une première expérience consistait à observer la morphologie des fibroblastes IMR-90 stressés ou non après stimulation au TGF- $\beta$ 1 en présence ou non de ces anticorps. De jeunes cellules ont été soumises à un stress de 2 heures au moyen d' $H_2O_2$  150  $\mu$ M dilué dans du milieu de culture MEM contenant 10 % de sérum bovin fœtal. Ensuite, le milieu de stress a été remplacé par du milieu de culture auquel nous avons ajouté, pendant trois jours consécutifs, un ou l'autre de ces deux anticorps. Nous avons réalisé un contrôle avec des cellules cultivées dans du milieu MEM + sérum. Des cellules non stressées ont aussi été incubées avec les anticorps cités plus haut.

Lorsqu'on analyse **la figure III-7**, on remarque que les fibroblastes IMR-90 jeunes stressés pendant 2 heures à l' $H_2O_2$  150 $\mu$ M présentent la morphologie de cellules sénescents. Par contre, si l'on observe les fibroblastes stressés et incubés en présence des anticorps anti-TGF- $\beta$ 1 ou anti-récepteur II du TGF- $\beta$ 1, on observe une morphologie cellulaire très comparable à celle des cellules jeunes contrôles (non stressées).

Cette expérience fait donc apparaître que la présence d'anticorps bloquant la liaison du TGF- $\beta$ 1 à son récepteur empêche l'apparition de morphologie sénescents lors de stress sous  $H_2O_2$  induisant normalement cette morphologie.

Le TGF- $\beta$ 1 semble donc intervenir dans les changements morphologiques qui s'opèrent au cours de la sénescence cellulaire induite par les stress.



**Figure III- 8 :** Effet des anticorps anti-TGF-β<sub>1</sub> et anti-TGF-β<sub>1</sub>RII sur la proportion de cellules présentant une activité S-A β-gal à 72 heures, après un stress de 2 heures sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM. Les cellules ont été incubées respectivement avec 3 μg/ml et 10 μg/ml d'anticorps anti-TGF-β<sub>1</sub> et anti-TGF-β<sub>1</sub>RII pendant 72 heures après avoir été stressées ou non.



Nous avons effectué un second type d'expérience. Celui-ci consistait à déterminer la proportion de cellules présentant une activité S-A  $\beta$ -gal chez des fibroblastes stressés dont le milieu de culture contenait des anticorps anti-TGF- $\beta$ 1, ou anti-TGF- $\beta$ 1 RII. On constate que la proportion de fibroblastes IMR-90 présentant une activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence est plus de 4 fois plus élevée chez les cellules stressées sous  $H_2O_2$  par rapport aux cellules contrôles (**Figure III-8**).

Les fibroblastes non stressés dont le milieu contenait des anticorps soit anti-TGF- $\beta$ 1 soit anti-TGF- $\beta$  RII ont une proportion de cellules présentant l'activité S-A  $\beta$ -gal identique à celle des cellules contrôles non stressées.

Plus intéressant, les cellules stressées dont le milieu contenait un de ces deux anticorps connaissent une augmentation de la proportion des cellules positives pour la S-A  $\beta$ -gal, mais cette augmentation est beaucoup plus faible que dans le cas des cellules stressées et non incubées avec ces anticorps. En effet, alors que la proportion de cellules positives pour la S-A  $\beta$ -gal atteint près de 55 % de cellules après un stress, on n'atteint plus, en présence d'anticorps anti-TGF- $\beta$ 1, ou anti-TGF- $\beta$  RII, respectivement, que 30 % et 27 % de cellules positives chez les cellules stressées.

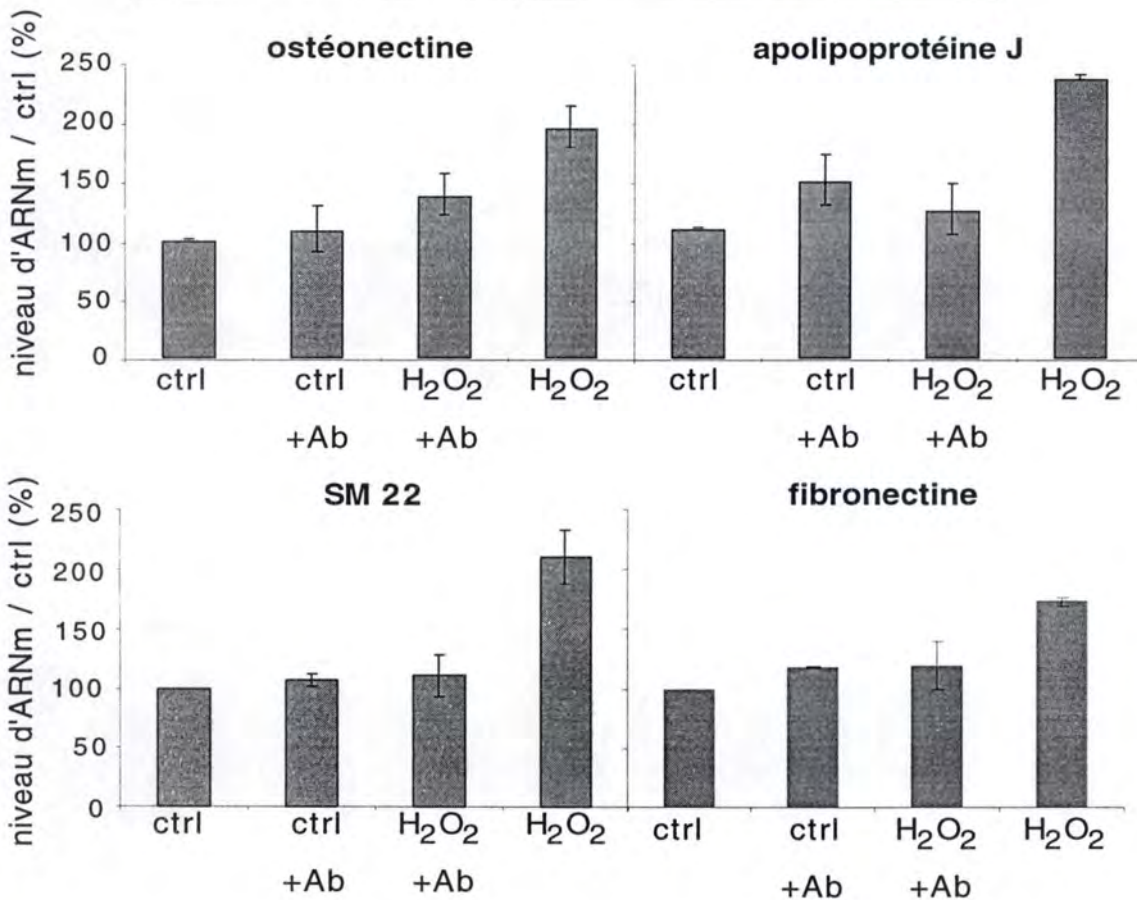
Enfin, nous avons étudié le niveau d'ARNm de la fibronectine, l'ostéonectine, l'apolipoprotéine J et SM22, 72 heures après stress sous  $H_2O_2$ , en présence ou non d'anticorps anti-TGF- $\beta$  RII.

Lorsqu'on analyse la **figure III-9**, on constate une élévation de la quantité d'ARNm codant pour ces gènes chez les fibroblastes stressés à l' $H_2O_2$ , atteignant au moins 220 % pour l'apolipoprotéine J et SM22, et 184 % et 173 % respectivement pour les gènes de l'ostéonectine et la fibronectine.

Les fibroblastes non stressés dont le milieu contenait les anticorps anti-TGF- $\beta$  RII ont un niveau d'ARNm codant pour ces gènes qui est similaire à celui du contrôle. Quant à l'apolipoprotéine J, elle voit son niveau en ARNm atteindre une valeur de 136 %. Par contre, en ce qui concerne les fibroblastes stressés dont le milieu contenait l'anticorps anti-TGF- $\beta$  RII, ils connaissent aussi une élévation du niveau d'ARNm codant pour ces 4 gènes. Cependant, cette élévation est beaucoup plus faible que dans le cas des cellules stressées. En effet, les cellules stressées en présence d'anti-TGF- $\beta$  RII présentent des niveaux d'ARNm ne dépassant pas les 120 % du contrôle que ce soit pour l'apolipoprotéine J, la fibronectine et SM22. Pour l'ostéonectine, ce niveau d'ARNm n'est que de 140 %.

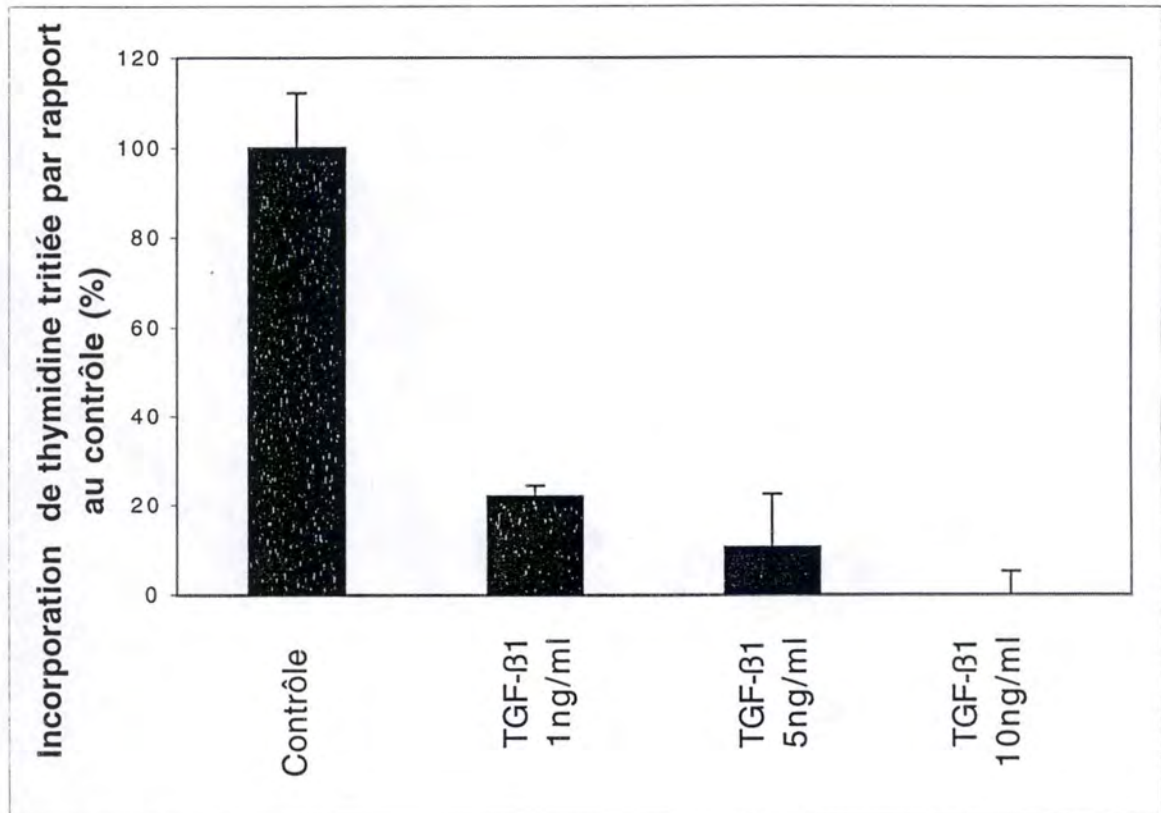
En conclusion, le fait d'incuber les fibroblastes stressés à l' $H_2O_2$  avec des anticorps anti-TGF- $\beta$ 1 ou anti-TGF- $\beta$  RII entraîne une apparition beaucoup moins marquée de biomarqueurs de la sénescence.

	ctrl	ctrl	H2O2	H2O2	-
		+Ab	+Ab		
ostéonectine					
apolipoprotéine J					
SM22					
fibronectine					
GAPDH					



**Figure III-9 :** Effet d'anticorps anti-TGF- $\beta$ 1RII (10  $\mu$ g/ml) sur le niveau d'ARNm de l'apolipoprotéine J, de la fibronectine, de SM22 et de l'ostéonectine des fibroblastes IMR-90, 72 heures après un stress ou non de deux heures avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 150  $\mu$ M. Autoradiographie de différentes bandes obtenues par RT-PCR semi-quantitatives à partir de 100 ng d'ARN total en utilisant les amorces spécifiques de ces gènes. Quantification des différentes bandes obtenues par l'InstantImager. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle.

L'arrêt irréversible de prolifération caractérisant aussi la sénescence prématurément induite par les stress, nous avons voulu savoir si le TGF- $\beta$ 1 était impliqué dans cet arrêt de prolifération.



**Figure III-10 :** Effet du TGF-β1 sur la prolifération des fibroblastes et estimée par la méthode d'incorporation de thymidine tritiée. Les fibroblastes stressés ou non ont été incubés 72 heures en présence de TGF-β1 à 1, 5 et 10 ng/ml. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle.

#### **4. Effet du TGF- $\beta$ 1 sur la capacité proliférative des fibroblastes IMR-90, 72 heures après un stress.**

Dans la littérature, le TGF- $\beta$ 1 est souvent cité pour ses effets anti-prolifératifs sur des fibroblastes humains (Zhang, D., *et al*, 1996). Nous avons voulu vérifier si le TGF- $\beta$ 1 a un effet anti-prolifératif sur les fibroblastes IMR-90 dans nos conditions expérimentales. Pour ce faire, des fibroblastes ont été incubés pendant 24 heures avec du TGF- $\beta$ 1 à 1, 5 et 10 ng/ml en présence de thymidine tritiée. Les résultats obtenus par la mesure de l'incorporation de thymidine dans l'ADN des cellules montrent un effet anti-prolifératif flagrant du TGF- $\beta$ 1, les cellules n'incorporant plus du tout de thymidine dans leur ADN à 10 ng/ml en TGF- $\beta$ 1 (**Figure III-10**).

Nous avons voulu savoir si le TGF- $\beta$ 1 est responsable de l'arrêt du cycle cellulaire observé dans la sénescence induite prématurément par les stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Des cellules jeunes ont été soumises à un stress de 2 heures avec 150  $\mu$ M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> réalisé comme décrit dans le matériels et méthodes.

Ensuite, le milieu de stress a été remplacé par du milieu de culture + sérum auquel nous avons ajouté des anticorps soit anti-TGF- $\beta$ 1 à 3  $\mu$ g/ml de milieu, soit anti-TGF- $\beta$  RII à 10  $\mu$ g/ml de milieu, comme précédemment.

Nous avons aussi prévu des cellules contrôles cultivées dans du milieu MEM + sérum seul ainsi que sur des cellules non stressées dont le milieu contenait un ou l'autre des anticorps cités ci-dessus.

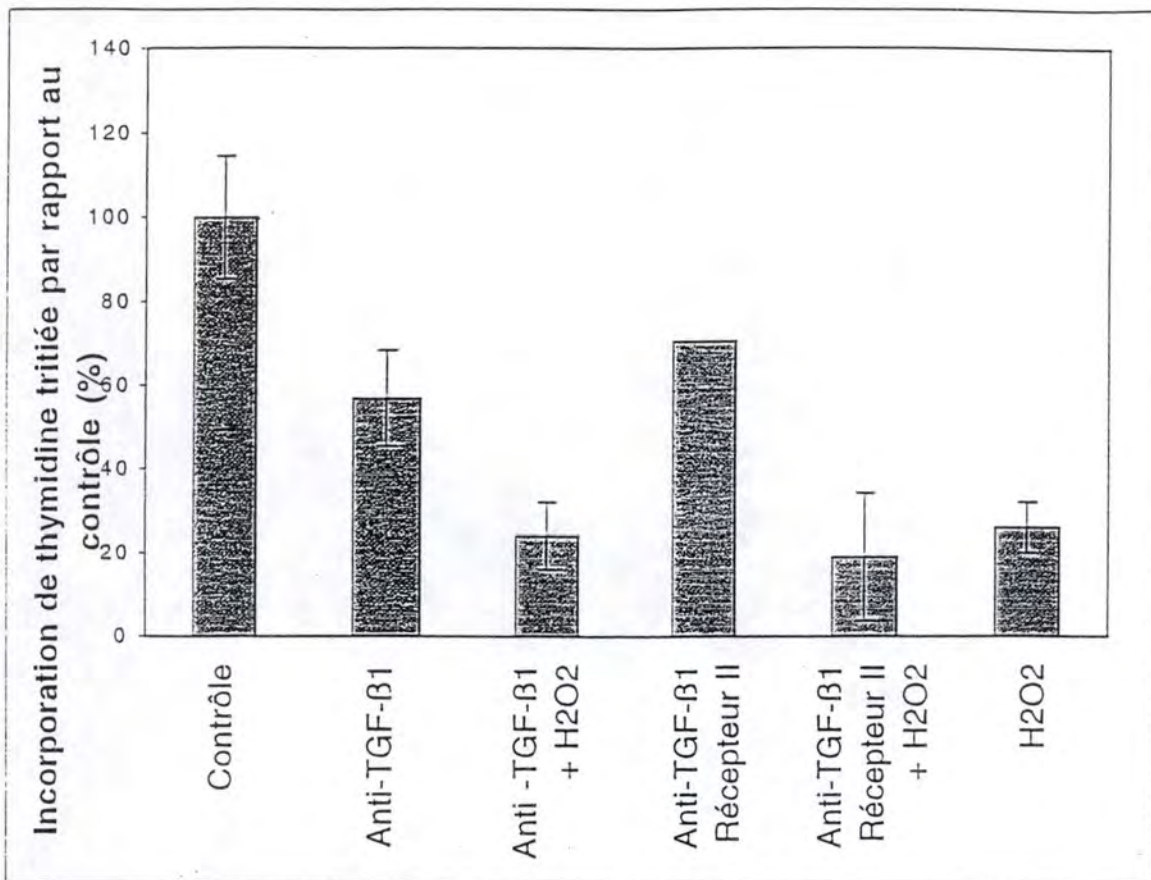
Après 72 heures, nous avons mis ces cellules en présence de thymidine tritiée pendant 24 heures et nous avons quantifié son incorporation dans l'ADN des cellules.

**La figure III-11** montre que les cellules soumises à un stress à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150  $\mu$ M) présentent une incorporation de thymidine tritiée diminuée de 76 % par rapport aux cellules contrôles, ce qui correspond aux données de la littérature (Chen, Q.M., *et al*, 1998). Ces résultats suggèrent que l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire est fortement réduite dans ces conditions.

Les autres résultats de ces expériences doivent être interprétés avec de plus amples précautions. En effet, nous avons vu ci-dessus que le TGF- $\beta$ 1 était anti-prolifératif lorsqu'il est ajouté au milieu de culture (**de 1 à 10 ng/ml, voir figure III-10**)

D'autre part, on sait que les cellules produisent du TGF- $\beta$ 1 en conditions normales et nous avons détecté l'ARNm du TGF- $\beta$ 1 en conditions normales dans ce travail. Du TGF- $\beta$ 1 a été détecté par un test ELISA (travail de C. Fripiat au laboratoire).

On pourrait donc s'attendre à ce que l'incubation de fibroblastes avec les anticorps anti-TGF- $\beta$ 1 ou anti-TGF- $\beta$  RII ait un effet pro-prolifératif ou



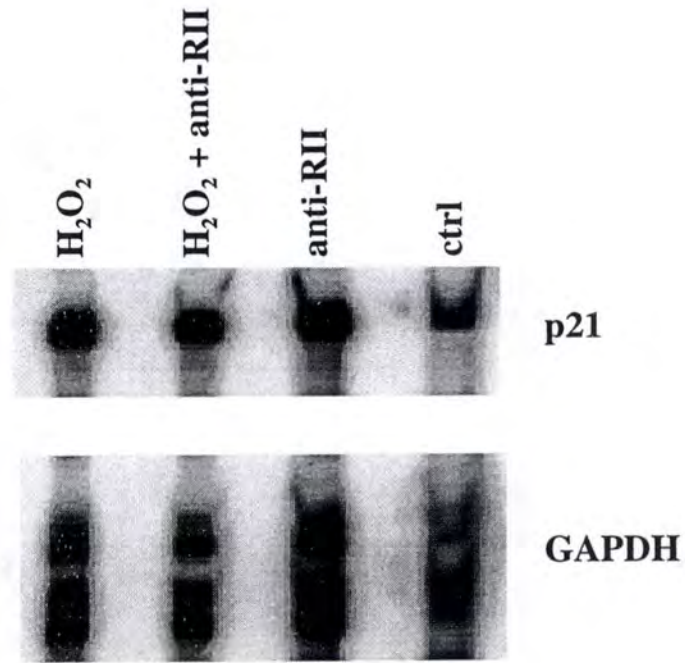
**Figure III-11 :** Effet du TGF- $\beta_1$  sur la prolifération des fibroblastes et estimée par la méthode d'incorporation de thymidine tritiée.

Les fibroblastes stressés ou non ont été incubés 72 heures avec soit de l'anti-TGF- $\beta_1$  (3  $\mu\text{g/ml}$ ) soit de l'anti-RII (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle.

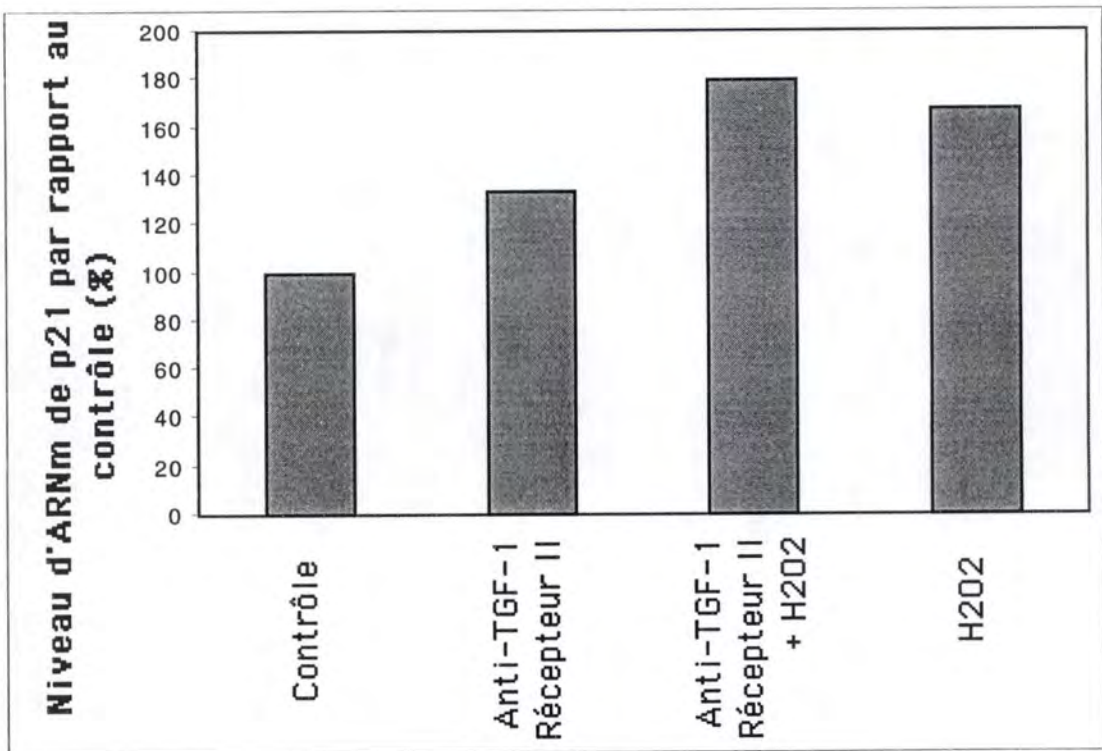
pas d'effet sur la prolifération. Or, nous observons ici un effet anti-prolifératif de ces anticorps, avec une incorporation de thymidine tritiée tombant respectivement de 43 % et de 31 %. Il semble donc que les fibroblastes IMR-90 soient très sensibles à une variation du niveau du TGF- $\beta$ 1 extracellulaire puisqu'une élévation ou une diminution de cette concentration, de même que la liaison d'anticorps bloquant l'accès du TGF- $\beta$ 1 à son récepteur, a un effet sur la prolifération cellulaire. D'autres effets de ces anticorps ne sont pas exclus.

Il est dès lors très difficile d'interpréter les résultats d'incorporation de thymidine tritiée obtenus en présence des anticorps après un stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . En tout cas, un possible effet anti-prolifératif de ces anticorps ne semble pas s'additionner à l'effet anti-prolifératif de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

A.



B.



**Figure III-12 :** Effet des anticorps anti-TGF- $\beta$ 1 RII sur le niveau d'ARNm de p21<sup>Waf</sup>

A. Autoradiographie d'un gel issu d'une expérience de RNase Protection Assay (RPA). Les fibroblastes ont été stressés ou non avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150  $\mu$ M) en présence ou non d'anticorps anti-récepteur II du TGF- $\beta$ 1 (10  $\mu$ g/ml).

B. Quantification des bandes observées sur l'autoradiographie à l'aide de l'Instant Imager. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle.



## 5. Etude de l'influence du TGF- $\beta$ 1 sur l'expression de p21<sup>Waf-1</sup> 72 heures après un stress au peroxyde d'hydrogène.

La voie classique impliquée dans l'arrêt en phase G1/S du cycle cellulaire lors de la sénescence est caractérisée par un contrôle de p53 activé sur pRb via l'activation de p21<sup>Waf-1</sup>. Cependant, selon la littérature, l'expression de p21<sup>Waf-1</sup> serait indépendante du facteur de transcription p53, 72 heures après un stress à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> infligé aux fibroblastes IMR-90 (Chen, Q.M., *et al*, 1998). D'autre part, certains auteurs ont démontré une augmentation de l'expression de p21<sup>Waf-1</sup> lorsqu'ils incubaient leurs fibroblastes avec du TGF- $\beta$ 1 (Robson, N., *et al*, 1999). C'est pourquoi, on s'est interrogé, de manière parallèle, sur le rôle potentiel que pourrait jouer le TGF- $\beta$ 1 sur le niveau d'ARNm de p21<sup>Waf-1</sup>, 72 heures après un stress à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Afin d'étudier le niveau de transcription de p21<sup>Waf-1</sup>, l'ARN total de 4 populations fibroblastiques a été extrait.

- Population 1 : Fibroblastes IMR-90 jeunes, donc à faible nombre de passages en culture.
- Population 2 : Fibroblastes IMR-90 jeunes dont le milieu a contenu des anticorps anti-TGF- $\beta$  RII, à 10 ng/ml pendant 72 heures.
- Population 3 : Fibroblastes IMR-90 ayant subi un stress à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150  $\mu$ M pendant 2 heures et dont le milieu a contenu des anticorps anti-TGF- $\beta$  RII, pendant 72 heures après le stress.
- Population 4 : Fibroblastes IMR-90 ayant subi un stress à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150  $\mu$ M pendant 2 heures et maintenu dans un milieu normal pendant 72 heures après le stress.

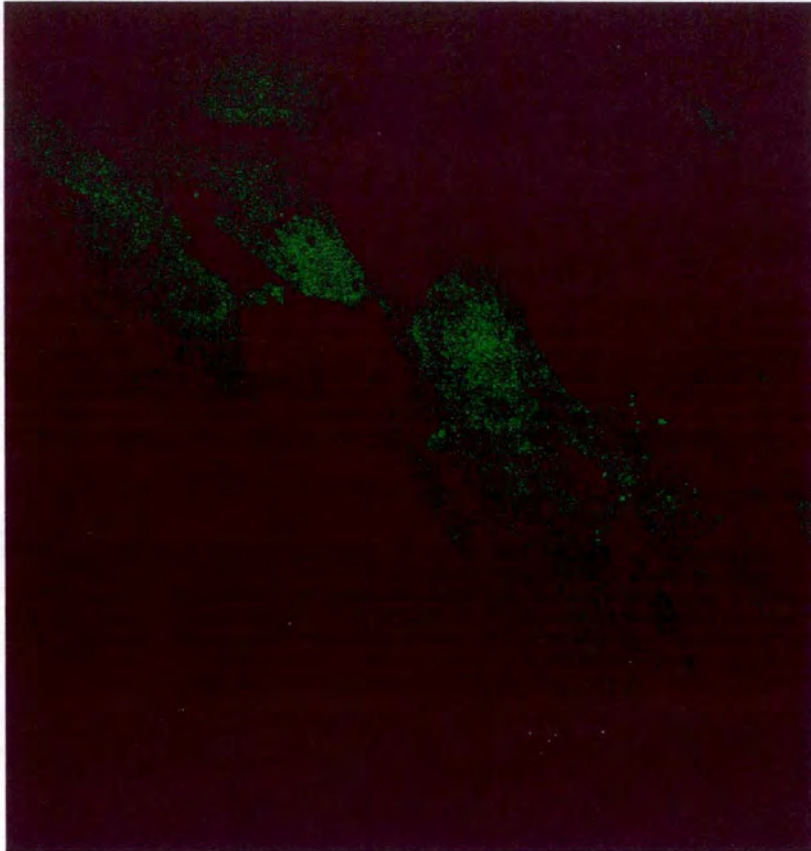
Nous avons ensuite réalisé une « RNase protection assay » (RPA) pour détecter le niveau de l'ARNm de p21<sup>Waf-1</sup>.

La **figure III-12** montre une augmentation d'environ 70 % du niveau d'ARNm de p21<sup>Waf-1</sup> pour les cellules stressées ce qui confirme les données de la littérature (Chen, Q.M., *et al*, 1998). Une augmentation d'environ 30 % du niveau d'ARNm de p21<sup>Waf-1</sup> est observée pour les cellules non stressées et mises en présence de l'anticorps anti-TGF- $\beta$  RII. Ces résultats vont donc dans le même sens que ceux obtenus pour l'incorporation de thymidine tritiée : les anticorps anti-TGF- $\beta$  RII seuls semblent avoir un effet anti-prolifératif. Il est tout aussi difficile d'interpréter les résultats obtenus. En tout cas, il semble que l'on n'obtienne pas un effet additif important de la présence des anticorps anti-TGF- $\beta$  RII et du stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En effet, les niveaux d'ARNm de p21<sup>Waf-1</sup> observés, dans ces deux conditions, semblent très proches.

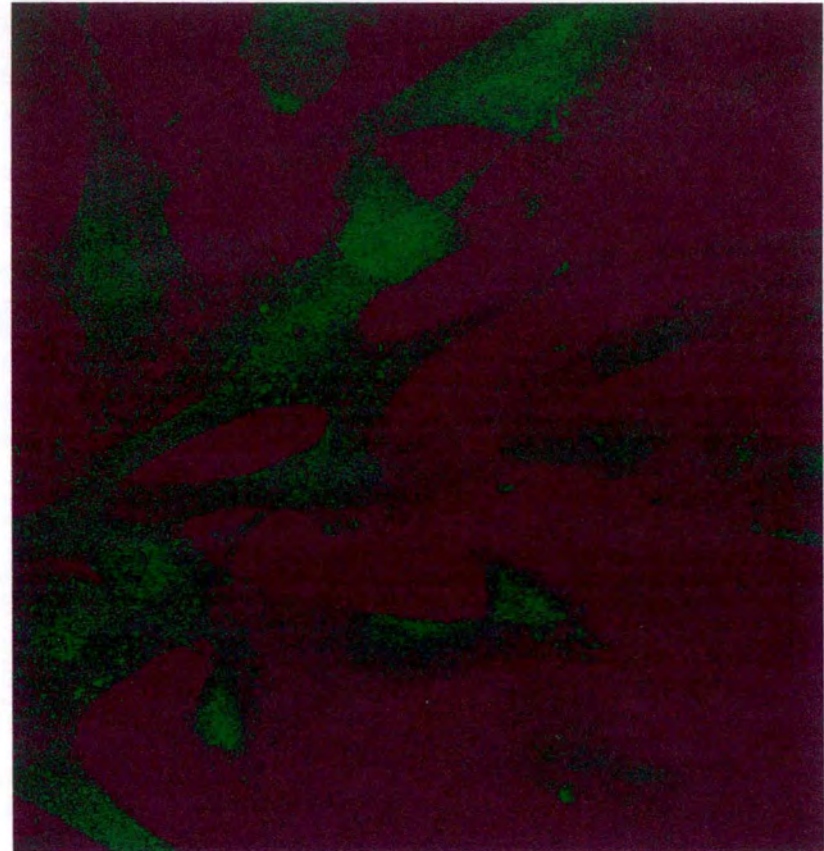
En conclusion, s'il n'est pas clair que le TGF- $\beta$ 1 module l'arrêt de prolifération causé par les stress, il semble en tout cas qu'il soit capable de réguler l'apparition d'autres biomarqueurs de la sénescence comme la morphologie sénescence, l'activité S-A  $\beta$ -gal et l'augmentation du niveau d'ARNm de 4 gènes connaissant une augmentation similaire de ce niveau lors de la sénescence.

D'autre part, ces résultats suggèrent que la quantité de TGF- $\beta$ 1 présente dans le milieu de culture et l'accessibilité du TGF- $\beta$ 1 à son récepteur soient des régulateurs très sensibles de la capacité proliférative des cellules.

**A. Cellules contrôles**



**B. Cellules stressées**



**Figure III- 13 :** Détection par immunofluorescence de la translocation de la protéine Smad 4 chez les fibroblastes de poumon humain IMR-90 ayant subi un stress à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**B**) ou non (**A**).

## 6. Etude de la translocation des Smad à l'intérieur du noyau suite à un stress à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Les protéines Smad 4 activées par liaison du TGF-β1 à son récepteur, sont transloquées vers le noyau. Ces protéines interviennent dans la transduction du signal du TGF-β1, depuis le cytosol vers la machinerie transcriptionnelle du noyau.

Dans une expérience préliminaire, nous avons voulu tester, par immunofluorescence, si la protéine Smad 4 est bien transloquée dans le noyau 72 heures après un stress au peroxyde d'hydrogène.

Nous avons stressé les fibroblastes IMR-90 avec 150 μM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 2 heures. Après 72 heures de récupération, les cellules ont été incubées avec un anticorps de lapin anti-Smad 4, puis avec un anticorps anti-lapin couplé au fluorochrome Alexa 488 nm. On observe une fluorescence localisée au niveau des noyaux et du cytosol, que ce soit dans les cellules stressées ou non (**Figure III-13**). La comparaison entre cellules contrôles et stressées ne nous permet pas d'affirmer qu'il y ait translocation de Smad 4 vers le noyau dans les cellules stressées à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette expérience a été réalisée 2 fois, avec des résultats comparables.

Pourquoi n'observe-t-on pas de différences entre les cellules contrôles et stressées? Une hypothèse serait que la translocation des Smad 4 à l'intérieur du noyau soit réalisée en permanence suite à la présence d'un niveau basal en TGF-β1 dans le milieu de culture, d'où absence de différence avec ou sans stress à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

*Conclusions*  
*et*  
*perspectives*

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la sénescence induite prématurément par des stress oxydatifs sublétaux à l' $H_2O_2$ . Plus précisément, nous avons voulu savoir si le TGF- $\beta$ 1 jouait un rôle dans ce processus.

Nous nous sommes dirigés vers le TGF- $\beta$ 1 car la littérature nous a appris que différents types cellulaires stimulés au TGF- $\beta$ 1 surexpriment certains gènes connus pour être sur-exprimés lors de la sénescence cellulaire normale ou induite prématurément par le stress sous  $H_2O_2$  (Schoecklmann, H.O., *et al*, 1997) (Furukawa, Y., *et al*, 1992).

C'est donc tout naturellement que nous avons testé si le TGF- $\beta$ 1 pouvait induire l'expression de ces gènes (fibronectine, ostéonectine, SM22, apolipoprotéine J) dans nos conditions d'étude de la sénescence induite prématurément par les stress sous  $H_2O_2$ . Le TGF- $\beta$ 1 étant effectivement capable d'induire ces surexpressions chez les fibroblastes IMR-90, nous avons testé si l'apparition d'autres biomarqueurs de la sénescence cellulaire est aussi contrôlée par le TGF- $\beta$ 1. De fait, le TGF- $\beta$ 1 induit bien une morphologie de type sénescence (non montré) et une augmentation du pourcentage de cellules présentant une activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence.

Ensuite, nous nous sommes posé la question de savoir si l'expression du TGF- $\beta$ 1 pouvait augmenter après des stress sublétaux sous  $H_2O_2$ , expliquant ainsi l'apparition de biomarqueurs de la sénescence. Nous avons montré que la quantité d'ARNm du TGF- $\beta$ 1 augmentait après ces stress, en deux vagues successives, une courte de quelques heures juste après le stress suivie d'une plus longue et plus tardive, s'étalant de 12 à 72 heures après le stress. Notons qu'on a observé au laboratoire que la sénescence induite prématurément par les stress s'installe 72 heures après le stress (Dumont, P., *et al*, 2000). De plus, par ELISA, on a montré au laboratoire que la quantité de TGF- $\beta$ 1 actif est largement augmentée à 36 heures après le stress.

Pour cette raison, nous avons testé si la neutralisation du TGF- $\beta$ 1, libéré par les cellules, pouvait empêcher l'apparition des biomarqueurs de la sénescence induite prématurément par les stress. Dans ce but, nous avons incubé les cellules avec des anticorps spécifiques soit du TGF- $\beta$ 1, soit du récepteur II du TGF- $\beta$ , après que les cellules aient été soumises à un stress sublétal sous  $H_2O_2$ . Nous montrons que, en présence de ces anticorps, l'apparition des biomarqueurs de la sénescence est beaucoup moins marquée, que ce soit au niveau de la morphologie, de l'activité  $\beta$ -galactosidase liée à la sénescence ou de la surexpression de la fibronectine, de l'ostéonectine, de SM22 et de l'apolipoprotéine J.

En ce qui concerne ces gènes, nous montrons dans ce travail que leur surexpression diminue fortement, en présence des anticorps anti-TGF- $\beta$  RII. Notre laboratoire a aussi réalisé le même type d'expérience, mais cette fois en présence d'anticorps anti-TGF- $\beta$ 1, et des résultats similaires ont été obtenus (Frippiat C., *et al*, en préparation).

Nos résultats suggèrent donc que le TGF- $\beta$ 1, libéré après des stress sublétaux sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, contrôle l'apparition des biomarqueurs de la sénescence testés.

Bien évidemment, certaines questions se posent encore. Parmi celles-ci, on peut se demander s'il est nécessaire d'incuber les cellules, pendant 72 heures après les stress avec les anticorps anti-TGF- $\beta$ 1 ou anti-récepteur II du TGF- $\beta$ .

En effet, on observe deux pics d'ARNm du TGF- $\beta$ 1, après les stress. De plus, il n'y a que peu de recouvrement entre, d'une part, la variation de la quantité d'ARNm de TGF- $\beta$ 1, au cours du temps après le stress et, d'autre part, la variation de la quantité de TGF- $\beta$ 1 libéré dans le milieu de culture, avec au moins un pic à 36 heures après le stress. Il y a peut-être d'autres pics de libération du TGF- $\beta$ 1 dans le milieu de culture. On pourrait donc réaliser des stress sublétaux sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et incuber les cellules avec des anticorps anti-TGF- $\beta$ 1, ou anti-TGF- $\beta$  RII, commençant ces incubations à différents moments après le stress, et pour des durées de temps variables, pour savoir si le TGF- $\beta$ 1 joue un rôle prépondérant à un moment donné.

On pourrait aussi étendre le nombre de biomarqueurs de la sénescence testés pour savoir si ce contrôle effectué par le TGF- $\beta$ 1, est plus général.

C'est d'ailleurs dans cette optique que nous avons voulu savoir si le TGF- $\beta$ 1 intervient dans le blocage irréversible du cycle cellulaire se mettant en place lors de la sénescence cellulaire induite par un stress sublétal sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En suivant une logique similaire à celle utilisée pour les autres biomarqueurs, nous avons tout d'abord testé si l'incubation de fibroblastes IMR-90 avec le TGF- $\beta$ 1, a pour effet de bloquer la prolifération de ces cellules. Nous montrons que l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN de ces cellules est d'autant plus réduite que la concentration en TGF- $\beta$ 1 est élevée. Ceci va dans le sens d'un effet anti-prolifératif du TGF- $\beta$ 1 sur ces cellules.

Encouragés par ces résultats, nous avons pensé que le TGF- $\beta$ 1 pourrait être responsable de l'arrêt de prolifération causé par un stress sublétal avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De plus, d'autres travaux ont montré que la sur-expression de p21<sup>Waf-1</sup>, inhibiteur de l'activité kinasique des complexes cyclines/kinases dépendante de cyclines observée 72 heures après les stress ne dépend pas de la protéine p53. Par contre, cette sur-expression de p21<sup>Waf-1</sup> observée juste après le stress dépend bien de p53. Personne ne sait actuellement ce qui conduit à la surexpression de p21<sup>Waf-1</sup> à 72 heures après les stress. Ceci nous a tout naturellement conduit à penser au TGF- $\beta$ 1 comme inducteur possible de p21<sup>Waf-1</sup> (directement ou indirectement).

Selon cette hypothèse, nous nous attendions à ce qu'une incubation de fibroblastes IMR-90 avec les anticorps anti-TGF- $\beta$ 1, ou anti-récepteur II du TGF- $\beta$ , lève quelque peu l'inhibition de prolifération observée à 72 heures après le stress et abaisse le niveau d'ARNm de p21<sup>Waf-1</sup> à 72 heures après le stress.

Nous n'avons pas obtenu les résultats escomptés. D'une part, nous observons que l'incubation de cellules avec un ou l'autre des deux anticorps utilisés abaisse quelque peu le niveau d'incorporation de thymidine tritiée. D'autre part, par RNase protection assay, nous avons montré que la présence d'un ou l'autre anticorps utilisés, entraîne une élévation du niveau d'ARNm de p21<sup>Waf-1</sup>. Ces expériences doivent bien sûr être répétées. Quelle est la cause de ces résultats? Une première expérience contrôle devra montrer si ces effets sont spécifiques à ces anticorps ou non. Si ces effets anti-prolifératifs sont spécifiques de ces anticorps, comment ces effets sont-ils médiés ?

Par ailleurs, on sait que le milieu de culture des cellules contient toujours un peu de TGF-β1, puisqu'elles en produisent en permanence. De plus, des expériences préliminaires semblent suggérer que la voie de transduction du signal du TGF-β1, mettant en jeu la protéine Smad4, soit toujours activée même en conditions normales. En effet, lors d'expériences d'immunofluorescence utilisant des anticorps primaires anti-Smad4, nous observons un marquage fluorescent à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme. Bien sûr, des expériences supplémentaires devront être réalisées en utilisant d'autres anticorps anti-TGF-β1 pour éviter les problèmes de spécificité des anticorps utilisés actuellement.

D'après ces observations, on peut émettre l'hypothèse que le TGF-β1, est peut-être nécessaire, à faible concentration, pour la prolifération des cellules. Ces effets passant par la voie des Smads, alors qu'il devient anti-prolifératif à plus haute concentration.

Selon cette hypothèse, si l'on incube les cellules avec des concentrations importantes en anticorps anti-TGF-β1, ou anti-récepteur II du TGF-β, on devrait avoir un effet anti-prolifératif de ces anticorps. Il faudrait alors savoir si la voie des Smads est toujours activée en présence des concentrations en anticorps utilisées dans ce travail. Si l'activation de cette voie disparaît en présence des anticorps à ces concentrations, on pourrait faire une courbe de concentrations plus faibles en anticorps et voir à partir de quelle concentration on « réallume » la voie des Smads.

Selon cette même hypothèse, une augmentation de la concentration en TGF-β1 au delà de la concentration normale aurait un effet anti-prolifératif qui pourrait passer par une voie différente de celle des Smads et induire des gènes anti-prolifératifs comme p21<sup>Waf-1</sup>. Ici, nous devons réaliser des incubations de cellules avec du TGF-β1 en conditions normales, et voir si p21<sup>Waf-1</sup> est induite. Ensuite, la voie alternative de transduction du signal de TGF-β1 qui pourrait avoir des effets anti-prolifératifs, pourrait être la voie de la TAK (TGF-β1 activated kinase), dont on sait qu'elle interagit avec la voie des « Stress-activated protein Kinases » comme les Jun-c-terminal kinase ou p38, que la littérature cite comme ayant des effets anti-prolifératifs lors de certains types de stress.



Il serait aussi intéressant de savoir ce qui provoque la surexpression de la protéine p21<sup>Waf-1</sup> à 72 heures après les stress. Nous avons commencé à nous intéresser à cette problématique pendant notre mémoire. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique des gènes rapporteurs. Une équipe japonaise a accepté de nous envoyer des constructions plasmidiques contenant le promoteur de p21<sup>Waf-1</sup> lié au cDNA codant pour une luciférase. Deux types de constructions nous ont été envoyées. Le premier type de promoteur contenait un site consensus de fixation pour p53, six sites consensus de liaison à SP1 et une TATA box. Le second type de promoteur de p21<sup>Waf-1</sup> ne contenait plus de site consensus de fixation de p53 et avait perdu deux sites consensus de SP1. De manière concomitante, nous avons mis au point la technique de gènes rapporteur dans notre système. Il fallait, en effet, optimiser la transfection pour qu'on puisse encore observer une production de lumière par la luciférase près de 4 jours après transfection. Ces 4 jours étaient nécessaires de manière à pouvoir transfecter les cellules, les stresser 24 heures plus tard et attendre 72 heures après le stress, moment où nous pourrions savoir si une activité transactivatrice était encore présente si le site consensus de fixation de p53 était délété ou non. Nous avons reçu les constructions plasmidiques japonaises après avoir optimisé les conditions des transfactions. A ce moment, après séquençage, nous nous sommes rendus compte du fait que l'on nous avait envoyé des plasmides ne correspondant pas au promoteur de p21<sup>Waf-1</sup>. Nous pourrions réaliser ces expériences lorsque nous pourrions utiliser les bonnes constructions plasmidiques.

En guise de conclusion générale, nous pouvons dire que le TGF- $\beta$ 1 est responsable de l'apparition de certains biomarqueurs de la sénescence induite prématurément par les stress sublétaux à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En ce qui concerne le contrôle du cycle cellulaire, la réalité est apparemment fort complexe. D'une part, on sait que p53 est activé juste après le stress et que p53 ne régule plus l'expression de p21<sup>Waf-1</sup> à 72 heures après le stress car p53 n'est plus exprimé à ce moment (Chen, Q., *et al*, 1998). D'autre part, la régulation du cycle cellulaire par le TGF- $\beta$ 1 semble, elle aussi, assez complexe. En effet, l'inhibition des effets du TGF- $\beta$ 1 semble entraîner un arrêt de prolifération. Ici, il ne semble pas que le manque d'efficacité des anticorps utilisés soit responsable des observations effectuées. De fait, ces anticorps sont capables d'inhiber l'apparition des biomarqueurs de la sénescence comme la morphologie sénescence, l'activité S-A  $\beta$ -gal ou l'expression de 4 gènes. Nous avons proposé plusieurs types d'expériences à réaliser pour mieux comprendre le rôle du TGF- $\beta$ 1 dans le contrôle du cycle cellulaire et pour savoir quelles sont les voies de transduction du TGF- $\beta$ 1 impliquées. De toute façon, les résultats obtenus suggèrent d'ores et déjà qu'il faudra aussi tenir compte de l'activation ou non de certaines voies considérées isolément mais aussi dans leurs interactions mutuelles au cours du temps, après le stress.

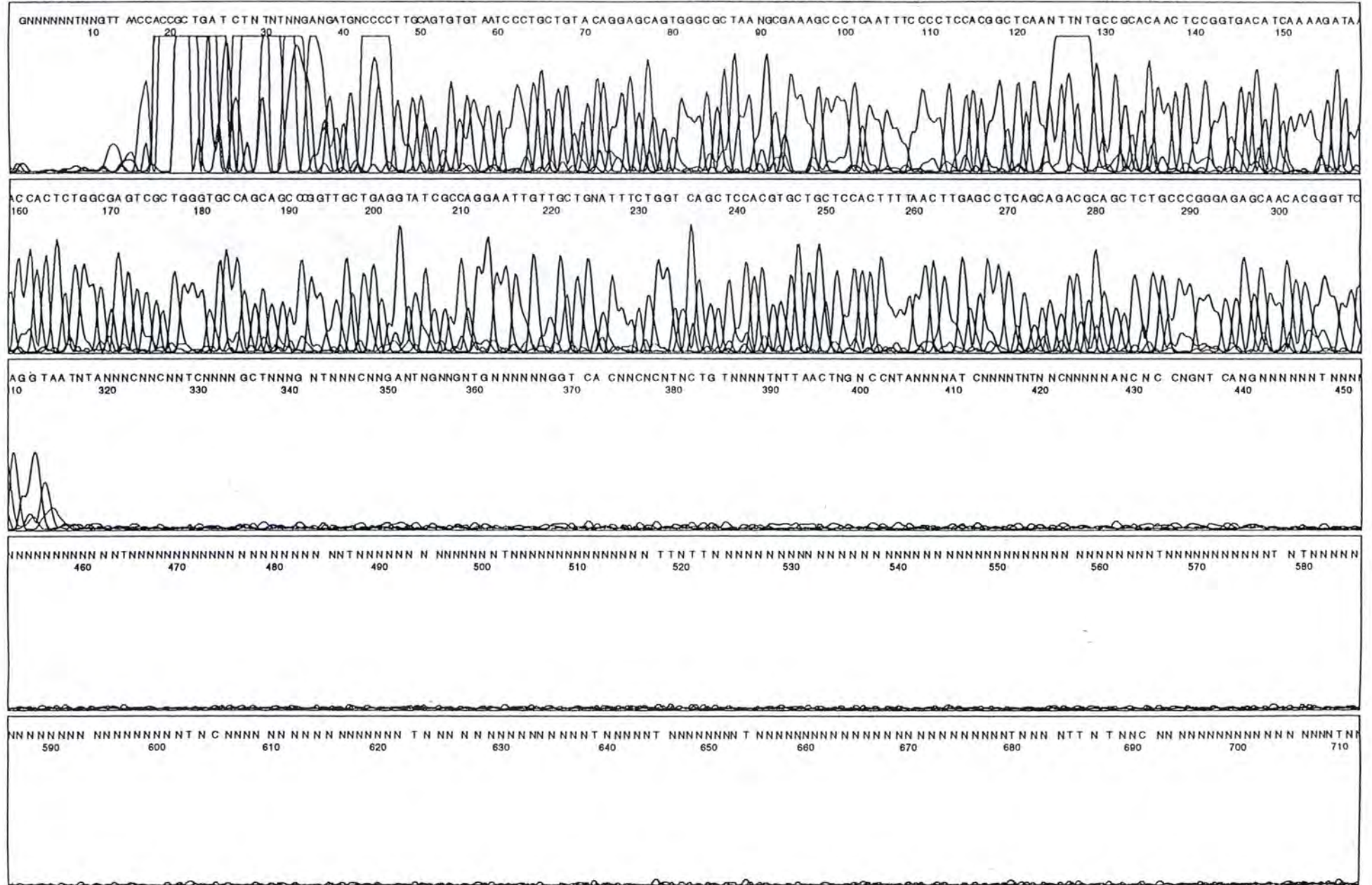
# *Bibliographie*

1. Attisano, L. & Wrana, J. (1998) Mads and Smads in TGF $\beta$  signalling. *Current opinion in Cell Biology*. **10**: 188-194.
2. Bayreuther, K., Rodermann, H.P., Francz, P.I. et Maier, K. (1988) Differentiation of fibroblast stem cells. *J. Cell. Sci. Suppl.* **10**: 115-130.
3. Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C-P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S. & Wright, W.E. (1998) Extension of Life-Span by Introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. **279**: 389-352.
4. Brack, C., Lithgow, G., Osiewacz, H. & Toussaint, O. (2000) Molecular and cellular gerontology . The *EMBO journal*. **19**: 1929-1934.
5. Campisi, J., Dimri, G. & Hara, E. (1996) Control of replicative senescence. *Handbook of the Biology of Aging* 121-149.
6. Chen, Q.M., Bartholomew, J.C., Campisi, J., Acosta, M., Reagan, J.D. & Ames, B.N.(1998) Molecular analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblast : p53 and Rb control G<sub>1</sub> arrest but not cell replication. *Biochem. J.* **332** : 43-50.
7. Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelly, C., Medranos, E., Linskens, M., Rubeli, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M. et Campisi, J. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9363-9367.
8. Dumont, P., Burton, M., Chen, M., Gonos, E., Fripiat, C., Mazarati, JB, Eliaers, F., Remacle, J. & Toussaint, O. (2000) Induction of replicative senescence biomarquers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radical Biology & Medecine*. **28**: 361-373.
9. Ezhevsky, S.A., Nagahara, H., Vocero-Akbani, A.M., Gius, D.R., Wei, M.C. & Dowdy, S.F. (1997) Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D :Cdk4/6 complexes results in active pRb. *Cell Biology*. **94**: 10699-10714.
10. Fripiat, C., Dumont, P., Bosseaux, B., Remacle, J., Chen, Q.M. & Toussaint, O. (1999) Role of p53, Rb and E<sub>2</sub>F<sub>1</sub> in cell cycle and gene expression in stress-induced premature senescence of human fibroblasts.
11. Furukawa, Y., Uenoyama, S., Ohta, M., Tsunoda, A., Griffin, J.D. et Saito, M. (1992) TGF- $\beta$  Inhibits phosphorylation of the retinoblastoma susceptibility in human monocytic leukemia cell line JOSK-1. *The journal of Biological Chemistry*. **267**: 17121-17127.
12. Giacomoni, P.U. et D'Alessio, P.(1996). Skin ageing : the relevance of antioxydants. *In Molecular Gerontology* Rattan, S.I.S. & Toussaint, O. Eds. 177-191, New York, Plenum Press.
13. Hanafusa, H., Ninomiya-Tsuji, J., Masuyama, N., Nishita, M. Fujisawa, JI., Shibuya, H., Matsumoto, K. & Nishida, E. (1999) Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor- $\beta$ -induced gene expression. *J. Biol. Chem.* **274**: 27161-27167.

14. Hannon, J. & Beach, D. (1994) P15<sup>INK4B</sup> is a potential effector of TGF- $\beta$ -induced cell cycle arrest. *Nature*. **371**: 257-260.
15. Harley, C., Futcher, A. et Greider, C. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. **345**: 458-680.
16. Hayflick, L. (1996) *How and why we age*, Ballantine books edition, New-York.
17. Hayflick, L. et Moorhead, P.S. (1961) The serial cultivation of human diploid cells stains. *Exp. Cell Res.* **25**: 585-621.
18. Kumazaki, T., Kobayashi, M. & Mitsui, Y. (1993) Enhanced expression of fibronectin during *in vivo* cellular aging of human vascular endothelial cells and skin fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **205**: 396-402.
19. Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. et Darnell, J. (1995) *Mol. Cell Biol.* New York, Scientific American Book, pp 1187.
20. Martin, M., Sprague, C.A. et Epstein, C.J. (1970) Replicative life-span of cultivated human cells. effects of donor's age, tissue and genotype. *Lab. Invest.* **23**: 86-92.
21. Michel, D., Chatelain, G., North, S. et Brun, G. (1997). Stress-induced transcription of the Clusterin/ Apo J Gene. *Biochemistry* . **328**: 45-50.
22. Mocali, A., Caldini, R., Chevanne, M. & Paoletti, F. (1995) Induction, effects and quantification of sublethal oxidative stress by hydrogen peroxyde on cultured human fibroblasts. *Experimental cell research.* **216**:388-395.
23. Pardee, A.B. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **71**: 1286-1290.
24. Pichler, R. H., Bassuk J. A., Hugo C., Reed M. J., Eng E., Gordon K. L., Pippin J., Alpers C. E., Cousers W. G., Sage E. H. (1996). SPARC is expressed by mesangial cells in experimental mesangial proliferative nephritis and inhibits platelet-derived-growth-factor-mediated mesangial cell proliferation in vitro. *An. J. Pathol.* **148**:1153-1167.
25. Polyak, K., Kato, J., Solomon, M., Sherr, C., Massague, J., Roberts, J. & Koff, A. (1994) p27<sup>Kip1</sup>, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor- $\beta$  and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes & Development.* **8** : 9-22.
26. Ravitz, MJ. & Wenner, CE. (1997) Cyclin-dependant kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF- $\beta$ . *Cancer Research.* 165-207.
27. Remacle, J., Houbion, A. et Houben, A. (1980). Subcellular fractionation of WI-38 fibroblasts. Comparaison between young and old cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **630** : 57-70.
28. Robson, N., Gnanapragasam, V., Byrne, RL., Collins, AT. & Neal, DE. (1999) Transforming growth factor- $\beta$ 1 up-regulates p15, p21 and p27 and blocks cell cycling in G1 in human prostate epithelium. *Endocrinology.* **160**: 257-266.
29. Schoecklmann, H.O., Rupprecht, H.D., Zauner, I. et Sterzel, R.B. (1997) TGF- $\beta$ 1-induced cell cycle arrest in renal mesangial cells involves inhibition of cyclin E-cdk 2 activation and retinoblastoma protein phosphorylation. *International Society of Nephrology.* **51**: 1228-1236.
30. Sewing, A., Burger, C., Brusselbach, S., Schalk, C., Lucibello, F.C. et Muller, R. (1993) Human cyclin D1 encodes a labile nuclear protein whose sunthesis is directly induced by growth factors and suppressed by cyclin AMP. *J. Cell Sci.* **104**: 545-555.

31. Sowa, Y., Orita, T., Minamikawa, S., Nakano, K., Mizuno, T., Nomura, H ; & Sakai, T. (1997) Histone deacetylase inhibitor activates the WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites. *Biochemical and biophysical Research communications*. **241**: 142-150.
32. Stone, D.J., Rozovsky, I., Morgan, T.E., Anderson, C.P., Finch, C.E. (1998) Increased synaptic sprouting in response to estrogen via an apolipoprotéin E-Dependent Mechanism : Implications for Alzheimer's Disease. *J. Neurosci*. **18**: 3180-3185 .
33. Toussaint, O. (1992) Approche globale du vieillissement cellulaire à partir de la théorie des systèmes ouverts. Facultés universitaires Notre-Dame de la Paix.
34. Toussaint, O., Houbion, A.& Remacle, J. (1994) Effects of modulations of the energetic metabolism on the mortality of cultured cells. *Biochimica Biophysica Acta*. **1186**: 209-220.
35. Toussaint, O., Raes, M., Michiels, C. & Remacle, J. (1998) La réponse des cellules aux stress : relation avec le processus de vieillissement et la pathologie. *Medecine/Sciences*. **14**: 622-635.
36. Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Argetsinger Steitz, J. & Weiner, A.M. (1989) Biologie Moléculaire du gène. *Menlo Park, InterEditions*.
37. Zhang, D. et Jacobberger, J.W. (1996). TGF- $\beta$ 1 perturbation of the fibroblast cell cycle during exponential growth: switching between negative and positive regulation. *Cell Prolif*. **29**: 289-307.

# *Annexe*



Annexe : Séquence du TGF-β1.

16 JUN 2000

Piera PORFIDO-BON  
SECRETARIAT BIOLOGIE F.u.N.D.P.  
Rue de Bruxelles, 59  
B-5000 NAMUR (Belgique)  
Tél. 081/72 44 26 - Fax 081/72 44 20