

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Étude de l'expression génique lors du vieillissement cellulaire normal ou accéléré par des stress sublétaux

Chainiaux, Florence

*Award date:*  
1999

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[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.



---

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR

Faculté des Sciences

**Etude de l'expression génique lors du vieillissement cellulaire normal ou  
accéléré par des stress subtiléaux**

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

Florence CHAINIAUX

Juin 1999

173 20 049755

Etude de l'expression génique lors du vieillissement cellulaire normal ou accéléré par des stress sublétaux

Florence CHAINIAUX

ERRATA

Liste des abréviations

Remplacer : - AND            acide désoxyribonucléique par **ADN**  
              - TBE            tampon *trisborate*-EDTA par tampon **tris-borate**-EDTA

Introduction

p.1: lire " ... tous les effets du temps qui passe **selon** leur expression génique,..." au lieu de "... tous les effets du temps qui passe *suivant selon* leur expression génique,..."

p.16 : lire "..., la **thymidylate** synthase..." au lieu de "..., la *thymidilate* synthase"

p.16 : lire " Une **hypophosphorylation** de pRB..." et non "Une *hyperphosphorylation* de pRB..."

Résultats

p.62 : lire " La quantité de protéines obtenue après 5 stress de 30 µM en t-BHP **est proche de celle des cellules "jour 0"**" au lieu de " La quantité de protéines obtenue après 5 stress de 30 µM en t-BHP *n'est pas significativement différente de celle obtenue au jour 0*"

p.62 : lire " De plus, la quantité de protéines cellulaires après 5 stress sous éthanol 5% **n'est pas significativement différente de celle obtenue au jour 0**" au lieu de " De plus, la quantité de protéines cellulaires après 5 stress sous éthanol 5% *est proche de celle des cellules "jour 0"*"

p.65 : lire " Dés lors, nous avons **décidé**..." au lieu de "Dés lors, nous avons *décider*..."

p.66 : lire " ...et à au moins un type de **stress**..." au lieu de " ...et à au moins un type de *stress*..."

fig. III-7 : lire "Variations communes à la sénescence **et à au moins un type de stress**" au lieu de "Variations communes à la sénescence *à à au moins un type de stress*"

fig. III-8 : Ajouter que le chiffre "1" dans le tableau signifie une sur-expression de la bande dans cette population.

Remplacer fig. 3-9a et 3.9b par fig. **III-9a** et **III-9b**

fig. III-13 et p.67 : remplacer *pGEMT-easy* par **pGEM-T Easy**

+ p.67 !



AT B 4 / 1999 / 24

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>

## Etude de l'expression génique lors du vieillissement cellulaire normal ou accéléré par des stress sublétaux

CHAINIAUX Florence

### Résumé

Des études antérieures ont montré que l'exposition répétée de cellules prolifératives humaines à des stress non létaux entraîne l'apparition de nombreux biomarqueurs du vieillissement. Dans ce travail, nous avons recherché la présence de transcrits exprimés de façon similaire chez des cellules stressées au *tert*-butylhydroperoxyde (t-BHP) ou à l'éthanol et chez des cellules sénescents, par rapport à des cellules jeunes. Par la technique du differential display, nous avons pu isoler 4 gènes dont l'expression variait avec la même intensité chez les cellules soumises à des stress et sénescents par rapport aux cellules jeunes : *Rad17*, *KNP-I*, *p34 Arc* et *SAP 145*, de même que 2 EST. Des vérifications de l'expression différentielle sont encore à réaliser par d'autres techniques d'analyse différentielle telles que la technique des biochips ou le Northern blot. Néanmoins, au vu des 156 différences observées entre les différentes situations, on peut espérer que de nombreux gènes sont réellement différentiellement exprimés dans ces systèmes.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 1999

**Directeur de mémoire:** Olivier Toussaint

**Promoteur:** Prof. J. Remacle

*Et voici que se clôturent 4 années d'étude, tout a passé si vite...*

*Au terme de ce travail, je voudrais vous remercier vous tous qui m'avez soutenu pendant ces quelques mois et plus particulièrement...*

*Monsieur le Professeur Remacle, merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et de m'avoir donné le goût à la biochimie durant ces années d'étude,*

*Merci à toi, Olivier, travailler dans ton équipe est un réel plaisir. Merci pour tes idées éclairées, tes encouragements et ce petit côté chaleureux que tu tiens sans doute de tes origines gaumaises...*

*Restons encore un instant dans cette région « oh combien merveilleuse » de notre pays, Thierry, je voudrais particulièrement te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi durant ces quelques mois, merci pour ta patience, tes conseils, ta bonne humeur communicative, tes petits pains au chocolat le matin ... encore mille fois merci.*

*Merci à vous Patrick et Christophe, d'avoir toujours été là pour me donner un petit coup de pouce, c'est bien ça la solidarité typique des « GRAS ».*

*Merci à toi Jean-Jean, pour m'avoir confié ton bureau bien-aimé. Je peux te rassurer, il a toujours été le plus rangé des 4, enfin, tout est relatif...*

*Merci aussi à toi Brice. Merci aussi à vous tous URBCéens : Manu, Gaëtan, Isabelle pour votre bonne humeur quotidienne, merci à toi François pour l'apprentissage des rudiments de la mise en culture, merci à tous, Madame le Professeur Raes, Anne-*



*Catherine, Laurence, Janique, Nath. C., Fred, Mumu, Najat, Carine, Maggy, Datsy, Dominique, Thierry, Isabelle A., Marc, Stéphanie, Benoît, Nathalie D., Sabine, Sandrine, Françoise, Nathalie Z., Anne, Noëlle, Rose, Valérie, Catherine, Nathalie H., Martine, Edouard, Andrée, Joseph et Marie, merci pour votre aide et vos encouragements quotidiens.*

*Merci à tous les mémorands et plus précisément tous ceux avec qui j'ai partagé ces quelques mois : Sophie, Denis, Stéphanie, Frédo, Franck, Jean-Michel et Jacinthe. Merci aussi à vous Marie, Véronique, Michèle et Stéphanie pour votre amitié pendant ces années passées ensemble.*

*Je ne pourrais terminer cette longue liste sans vous remercier, vous, mes parents, qui avez toujours été là pour m'encourager et me soutenir depuis le début de mes études. Merci aussi à toi Thomas.*

*Enfin, merci à toi, Christophe pour ta présence, ton soutien et ton réconfort.*

# I. INTRODUCTION

## **1. Le vieillissement : approche générale**

## **2. Les théories du vieillissement cellulaire**

2.1. Modes de classement des théories du vieillissement cellulaire

2.2. Théories générales et environnementales du vieillissement cellulaire

2.2.a. *Notions préliminaires*

2.2.b. *Méthode Théories génétiques et déterministes*

2.2.c. *Théories génétiques et stochastiques*

- Théorie de la régulation génique
- Théorie de la différenciation terminale et de l'association des gènes au vieillissement
- Théorie de l'instabilité du génome
- Théorie du soma disponible (« *disposable soma* »)

2.2.d. *Théories environnementales*

- Théorie de l'erreur catastrophe
- Théorie généralisée de l'erreur catastrophe

## **3. La thermodynamique pour expliquer le vieillissement**

3.1. La cellule comme système thermodynamique ouvert loin de l'équilibre

3.2. Effet des perturbations et des stress sur la stabilité cellulaire

## **4. L'étude du vieillissement cellulaire *in vitro***

4.1. Bref historique

4.2. La sénescence répllicative



4.3. Les morphotypes

4.4. L'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence

4.5. Le raccourcissement des télomères

4.6. Modulation de l'expression génique au cours du temps

*4.6.a. Variations dans l'expression des gènes impliqués dans le vieillissement cellulaire*

*4.6.b. Méthode Variations de gènes impliqués dans des fonctions spécifiques*

*4.6.c. Causes de ces variations*

4.7. Relations entre stress et vieillissement *in vitro*

## **5. Le Differential Display**

5.1. Les techniques « classiques » d'étude de l'expression génique

5.2. Le differential display

5.3. L'analyse différentielle représentative (RDA)

5.4. La technique SAGE

5.5. Les micro-damiers à ADN

## **II. MATERIELS ET METHODES**

### **1. Culture cellulaire**

1.a. Matériel

1.b. Méthode

*1.b.1. Repiquage des cellules*

*1.b.2. Congélation des cellules*

*1.b.3. Décongélation des cellules*

## **2. Etude de l'effet des stress sur la cytotoxicité et le biomarqueur du vieillissement SA $\beta$ -gal**

### 2.1. Stress successifs

#### *2.1.a. Matériel*

#### *2.1.b. Description des stress*

#### *2.1.c. Méthode*

### 2.2. Mesure de la cytotoxicité par le dosage des protéines au Folin

#### *2.2.a. Matériel*

#### *2.2.b. Méthode*

### 2.3. Etude du biomarqueur du vieillissement SA $\beta$ -gal

#### *2.3.a. Matériel*

#### *2.3.b. Méthode*

## **3. Differential Display**

### 3.1. Stress successifs

#### *3.1.a. Matériel*

#### *3.1.b. Méthode*

### 3.2. Extraction d'ARN total de culture cellulaire

#### *3.2.a. Matériel*

#### *3.2.b. Méthode*

### 3.3. Traitement des échantillons à la DNase I RNase-free

#### *3.3.a. Matériel*

#### *3.3.b. Méthode*

### 3.4. Transcription inverse

#### *3.4.a. Matériel*

#### *3.4.b. Méthode*

### 3.5. Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

#### *3.5.a. Matériel*

#### *3.5.b. Méthode*

### 3.6. Gel de Polyacrylamide 6 %

#### **3.6.1. Préparation du gel**

3.6.1.a. *Matériel*

3.6.1.b. *Méthode*

**3.6.2. Chargement du gel et migration des échantillons**

3.6.2.a. *Matériel*

3.6.2.b. *Méthode*

**3.6.3. Démoulage du gel**

3.6.3.a. *Matériel*

3.6.3.b. *Méthode*

**3.6.4. Développement du film**

3.6.4.a. *Matériel*

3.6.4.b. *Méthode*

3.7. Récupération des bandes d'intérêt

**3.7.1. Excision des bandes et récupération de la matrice**

**3.7.2. Amplification de l'ADN récupéré des bandes d'intérêt**

3.7.2.a. *Matériel*

3.7.2.b. *Méthode*

3.8. Visualisation sur gel d'agarose des bandes récupérées

3.8.a. *Matériel*

3.8.b. *Méthode*

3.9. Purification de l'ADN amplifié

**3.9.1. Purification directe des produits PCR**

3.9.1.a. *Matériel*

3.9.1.b. *Principe*

3.9.1.c. *Méthode*

**3.9.2. Purification à partir du gel d'agarose**

3.9.2.a. *Matériel*

3.9.2.b. *Principe*

3.9.2.c. *Méthode*

3.10. Clonage

**3.10.1. Ligation des inserts dans le vecteur pGEM-T easy**

**3.10.2. Préparation des bactéries CaCl<sub>2</sub> compétentes**

3.10.2.a. *Matériel*



3.10.2.b. *Méthode*

**3.10.3. Transformation des bactéries par la méthode du choc thermique**

3.11. Miniprep

3.11.a. *Matériel*

3.11.b. *Méthode*

3.12. Vérification de la construction

**3.12.1. Restriction par Eco RI**

3.12.1.a. *Matériel*

3.12.1.b. *Méthode*

**3.12.2. PCR d'amplification du site de clonage du plasmide**

3.12.2.a. *Matériel*

3.12.2.b. *Méthode*

**3.12.3. Migration du produit de restriction sur gel d'agarose**

3.12.2.a. *Matériel*

3.12.2.b. *Méthode*

3.13. PCR en vue du séquençage

3.13.a. *Matériel*

3.13.b. *Méthode*

3.14. Purification des produits PCR

3.14.a. *Matériel*

3.14.b. *Méthode*

3.15. Séquençage

### III. RESULTATS ET DISCUSSION

#### **1. Mise au point des conditions de stress**

1.1. Estimation de la mortalité cellulaire par le dosage de protéines

1.1.a. *Résultats*

*1.1.b. Discussion*

1.2. Cellules positives pour l'activité SA  $\beta$ -gal

*1.2.a. Résultats*

*1.2.b. Discussion*

## **1. Differential display**

2.1. Résultats

*2.1.a. Stress successifs et extraction d'ARN*

*2.1.b. Transcription inverse et PCR*

*2.1.c. Gels de polyacrylamide et isolation des bandes d'intérêt*

*2.1.d. Purification des produits PCR après récupération des*

*bandes*

*2.1.e. Clonage et séquençage des bandes d'intérêt*

*2.1.f. Description des gènes correspondants aux fragments d'ADN*

*identifiés lors du séquençage*

2.2. Discussion

## **IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES**



## Liste des abréviations

A	adénine
A x	absorbance à x nm
AND	acide désoxyribonucléique
ADN-c	acide désoxyribonucléique complémentaire
APS	persulfate d'ammonium
ARN	acide ribonucléique
ARN-m	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
$\beta$ -gal	$\beta$ -galactosidase
BME	milieu basal de Eagle (basal medium eagle)
C	cytosine
Cdk	kinase dépendante de cycline
Cm <sup>2</sup>	centimètre carré
CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone
DMF	N,N'-diméthyl formamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DNAse	désoxyribonucléase
dNTP	déoxynucléotide triphosphate
D.O.	densité optique
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	éthylène diamine tétraacétate
FBS	foetal bovine serum
g	gramme
G	guanine
kb	kilo paire de bases
l	litre
LB	Luria Bertani
$\mu$	micro
m	milli
M	molaire
MF	morphotype mitotique

min	minute
M.W.	étalon de poids moléculaire (weight marker)
n	nano
N	nucléotide
pb	paire de bases
PBS	tampon phosphate salin (phosphate buffer saline)
PCR	réaction de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction)
PIPES	Acide 1,4-pipérazinediéthanesulfonique
PMF	morphotype post-mitotique
pRb	protéine de rétinoblastome
RNAse	ribonucléase
rpm	rotation par minute
RT	rétro-transcription
<i>S. Pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces Pombe</i>
SDS	dodécylsulfate de sodium
Sec	seconde
T	thymine
T25 / T75	boîtes de culture de 25/75 cm <sup>2</sup>
TBE	tampon trisborate-EDTA
t-BHP	<i>tert</i> -butylhydroperoxyde
TEMED	N,N,N',N',-tetra-méthyl-éthylènediamine
Tm	température de melting
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
u	unité enzymatique
V	base dégénérée (= A, C ou G)
V	Volt
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside
°C	degré Celsius
n x	dilution n fois
<sup>33</sup> P	radioisotope 33 du phosphore
<sup>32</sup> P	radioisotope 32 du phosphore
<sup>35</sup> S	radioisotope 35 du soufre

# *Introduction*



## **1. Le vieillissement : approche générale**

De tout temps, le vieillissement a été source d'interrogations. Les premières études gérontologiques plus poussées ont vu le jour dans les années '50. Elles s'intéressaient pour la plupart à l'évolution des fonctions physiologiques au cours du temps. A ce titre, nous pouvons citer ce qui constitue sans doute l'une des plus grandes études approfondies sur ce sujet, la Baltimore Study of Ageing (BLSA). Mise sur pied par le gérontologue Nathan Shock, elle est l'étude la plus complète réalisée à ce jour sur l'évolution de l'ensemble de l'organisme humain lors du vieillissement. Les conclusions générales qui s'en dégagent peuvent être résumées en ceci : le vieillissement s'associe d'une perte inévitable et progressive des différentes fonctions physiologiques et d'une vulnérabilité croissante aux stress de toutes natures, aux maladies, aux blessures et aux accidents (Hayflick, L., 1996).

L'étape suivante des recherches entreprises eut pour but de comprendre les causes plus profondes de ces détériorations progressives. Sur ce point, les avis divergèrent et la gérontologie fut scindée en 2 groupes, l'école du vieillissement cellulaire où celui-ci est représenté comme une conséquence des modifications intrinsèques de la cellule, et l'école du vieillissement dit "intégratif" pour lesquels le vieillissement est la conséquence de la modification des organes et plus particulièrement des mécanismes dits "intégratifs" au cours du temps, à savoir le cerveau, les glandes endocrines et les tissus immuns, soit le système neuro-endocrino-immun (Hayflick, L., 1985).

On comprend intuitivement qu'il existe des liens entre ces 2 écoles. En effet, les systèmes intégratifs sont également constitués de cellules qui subissent tous les effets du temps qui passe suivant selon leur expression génique, leur état de différenciation, leur position, leur degré de fonction...

D'où l'intérêt de l'étude des mécanismes du vieillissement cellulaire.

Théories génétiques		Théories environnementales
Théories déterministes	Théories stochastiques	Théories stochastiques
	altérations du génome en particulier	altérations des constituants cellulaires en général
Exemples de théories	Exemples de théories	Exemples de théories
<p><u>- Activation d'un programme</u></p> <p>Effets directs d'hormones ou de facteurs neuronaux sur l'activation du programme</p> <p><u>- Gènes spécifiques de vieillissement</u></p> <p>Expression différentielle de gènes chez les cellules jeunes ou vieilles</p>	<p><u>- Régulation génique</u></p> <p>Niveau = d'expression des gènes de réparation et de défense</p> <p><u>- Différenciation terminale</u></p> <p><u>- Instabilité du génome</u></p>	<p><u>- Théorie généralisée de l'erreur catastrophique</u></p> <p>- Radicaux libres</p> <p>- Accumulation de déchets métaboliques (ex : lipofuchine)</p> <p>- Augmentation du niveau des modifications dues aux diverses perturbations (T°, pH, force osmotique, hypoxie, molécules toxiques) encourues pendant la vie cellulaire</p>

**Fig. I-1** : Tableau récapitulatif des différentes théories du vieillissement cellulaire.



## 2. Les théories du vieillissement cellulaire (fig I-1)

### 2.1. Modes de classement des théories du vieillissement cellulaire.

Au niveau cellulaire, de nombreuses théories ont vu le jour au cours de ces 30 dernières années. On estime que le nombre de théories dépasse 300 (Medvedev, Z.A., 1990).

Un mode de classement est donc nécessaire et il en existe 5 principaux : suivant un ordre historique, évolutionniste, hiérarchique selon le niveau d'organisation biologique, suivant le type cellulaire étudié et ses capacités prolifératives et enfin suivant la nature et l'origine des mécanismes menant au vieillissement.

C'est principalement sur ce dernier mode de classement que nous allons nous attarder.

On peut y distinguer 2 grandes classes de théories : les **théories génétiques** faisant intervenir l'expression ou la structure du génome et les **théories environnementales**, soulignant l'importance de l'environnement cellulaire. De nouveau, un autre classement possible de ces théories peut être réalisé selon qu'elles sont régies par des lois déterministes ou stochastiques.

### 2.2. Théories générales et environnementales du vieillissement cellulaire

#### 2.2.a. Notions préliminaires

Nous allons tout d'abord définir les notions "stochastique" et "déterministe".

Un phénomène sera considéré comme régi par des lois déterministes si un nombre limité de variables connues permettent de le décrire et

évoluent exactement de la même manière à chaque reproduction du phénomène considéré, sans faire appel à aucun calcul probabiliste.

Par contre, nous dirons qu'un phénomène est régi par des lois stochastiques s'il comporte des variables aléatoires qui font que ce phénomène est en partie le fruit du hasard et doit être étudié en faisant appel à des calculs de type probabiliste.

On comprend dès lors que les théories génétiques pourront être soit déterministes, soit stochastiques, alors que les théories environnementales seront toutes stochastiques.

### **2.2.b. Théories génétiques et déterministes**

La machinerie génétique constitue bien sûr une cible privilégiée pour les théories déterministes puisqu'elle détient toute l'information nécessaire à la stabilité et à l'existence du système cellulaire.

On postule ici l'existence d'un nombre restreint de gènes régissant le vieillissement et présents tout au long de la vie cellulaire. Ces gènes pourraient, par exemple, être capables soit de provoquer des cascades d'expression/répression de gènes s'enchaînant depuis la création de l'œuf jusqu'à la mort de l'organisme, soit de déterminer un moment à partir duquel d'autres gènes seraient allumés ou éteints, entraînant ainsi le vieillissement de la cellule.

On peut citer parmi ces théories celle de l'activation d'un programme après la période de reproduction ou après une modification environnementale et faisant intervenir des hormones ou des facteurs neuronaux (Kirkwood, T.B.L. et Cremer, T., 1982).

### **2.2.c. Théories génétiques et stochastiques**

#### **\* Théorie de la régulation génique (Kanungo, M.S., 1980)**

Le principe de cette théorie est que chaque espèce détient un ensemble unique de gènes responsables du développement et de la



reproduction. Ces gènes subissent des cascades d'activation/répression dès la fertilisation de l'œuf, et ceci déterminera la durée du développement et l'apparition de la période de reproduction. La durée de cette dernière dépendrait ensuite de la capacité de l'individu à se défendre envers les conséquences de dérégulations, telle que l'augmentation de la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène.

\* Théorie de la différenciation terminale et de l'association des gènes au vieillissement (Cutler, R.G., 1991)

Pour Cutler, les facteurs néfastes responsables de ce qu'il nomme la "dérégulation" (*dysregulation*) génique ne proviennent pas d'une modification du métabolisme général mais plutôt des effets pervers du métabolisme, et notamment du métabolisme de l'oxygène, source de radicaux libres.

Cette thèse est appuyée par des arguments expérimentaux qui montrent que le taux métabolique spécifique (en kcal/g tissu/jour) est inversement proportionnel à la longévité des espèces de mammifères. Il existerait donc, d'après Cutler, une relation directe entre ce taux métabolique spécifique et la production de radicaux libres.

N'oublions pas que, dans cette théorie, il faut aussi tenir compte des moyens de défense que possède l'organisme contre ces radicaux libres.

\* Théorie de l'instabilité du génome (Strehler, B.L., 1986)

Ici, c'est l'instabilité du génome qui est proposée comme cause du vieillissement. Des modifications de l'ADN peuvent se produire telles que des changements dans l'organisation des gènes, des mutations, des réarrangements, etc.

Suite à tout cela, l'expression des gènes en ARN-m et en protéines pourrait en être affectée .

On peut citer comme exemple le cas des télomères, ces répétitions de bases dans les parties terminales des chromosomes qui voient leur longueur diminuer au fil des passages en culture pour les cellules somatiques, alors que leur longueur reste constante chez les cellules germinales ou tumorales.

\* Théorie du soma disponible ("disposable soma")

Pour la théorie du soma disponible, la longévité demande des investissements nécessaires à l'entretien du corps, ce qui réduit les ressources disponibles pour la reproduction. Des études ont ainsi été réalisées chez l'homme afin de mettre en évidence des relations entre la longévité et la fertilité (Westendorp, R. *et al*, 1998). Se basant sur des données généalogiques de l'aristocratie britannique, leurs recherches mirent par exemple en évidence que pour les femmes étant décédées après l'âge de ménopause, la longévité était négativement corrélée avec le nombre d'enfants et positivement corrélée avec l'âge avancé lors de la première grossesse. Ces résultats viennent donc appuyer cette théorie, en montrant qu'il existe des connections entre la longévité et la reproduction.

**2.2.d. Théories environnementales et stochastiques**

\* Théorie de l'erreur catastrophe (Orgel, L.E., 1963)

Dans cette théorie, on postule l'existence d'erreurs s'infiltrant au hasard et responsables de la détérioration progressive de la machinerie de synthèse protéique, toute synthèse de nouvelle protéine pouvant dès lors en être affectée. La théorie prévoit que si ces erreurs ne sont pas corrigées rapidement par la cellule, elles s'amplifient et finissent par être incontrôlables, ce qui provoque une véritable catastrophe au niveau du fonctionnement cellulaire.



Des travaux montrent que la fidélité de la traduction diminue au cours du temps (Luce, M.C. et Bunn, C.L., 1989). On peut donc les utiliser comme argument en faveur de cette théorie, toutefois, il ne faut pas oublier les autres mécanismes d'altération des protéines qui peuvent également être impliquées comme l'altération post-traductionnelle des enzymes ou l'affaiblissement des systèmes chargés de leur élimination.

\* Théorie généralisée de l'erreur catastrophe (Orgel, L.E., 1973)

En 1973, Orgel revoit sa théorie en élargissant les mécanismes capables de déclencher la dégradation cellulaire. Outre les infidélités de synthèse protéique, il y ajoute les altérations de l'ADN nucléaire ou mitochondrial, du métabolisme énergétique, ainsi que par la peroxydation lipidique des membranes, etc.

Cette théorie devient tellement générale qu'elle finit par regrouper à elle-seule l'ensemble des théories stochastiques, qu'elles soient environnementales ou non.

Parmi ces théories, la plus étudiée est sans doute celle des radicaux libres (Harman, D., 1956 et 1998, et Poot, M., 1991).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques dont au moins un atome contient un électron non apparié sur sa dernière orbitale. Cette particularité rend ces molécules très réactionnelles. Elles peuvent ainsi réagir avec toutes les autres molécules qui se trouvent dans leur environnement proche, les protéines, les lipides ou l'ADN par exemple.

Beaucoup de radicaux libres sont produits dans la cellule, et surtout via le métabolisme de l'oxygène. Cette découverte surprenante que la molécule d'oxygène, indispensable à la vie, soit aussi la source de radicaux libres extrêmement destructeurs est connue sous le nom de paradoxe de l'oxygène.

De plus, des études ont également montré qu'il existait au sein de la cellule des enzymes anti-oxydantes en concentration et activité élevées. Ces différentes découvertes ainsi que le fait que cette théorie a permis le développement de nombreux modèles expérimentaux selon la cible de ces



radicaux libres, ont sans doute contribué à l'engouement que cette théorie connaît.

Il est clair qu' aucune des théories qui viennent d'être présentées ne peut, à elle-seule, expliquer le mécanisme du vieillissement. En effet, on sait que celui-ci est un phénomène très complexe, dépendant d'une série de variables. Il serait donc improbable qu'il puisse être expliqué par une théorie qui ne soit pas multifactorielle.

Revenons un instant sur cette théorie généralisée de l'erreur catastrophe et abordons-la selon un raisonnement inverse. En effet, il pourrait être intéressant de se demander quels sont les mécanismes que possède la cellule afin de contrer ces erreurs qui semblent inévitables. Le concept de seuil critique d'accumulation d'erreurs présente la cellule vivante en équilibre entre les altérations de toutes natures, inévitables, et les moyens de défense cellulaires, comme par exemple les enzymes anti-oxydantes. Lorsque ces moyens sont suffisants, ils permettent de maintenir la structure et la fonction cellulaire, mais il arrive un moment où ils deviennent débordés, saturés, et à cet instant, un déséquilibre apparaît en faveur des altérations. Dès lors, un état irréversible semble atteint, c'est précisément le seuil critique d'accumulation d'erreurs, rejoignant dans sa phase finale la théorie généralisée de l'erreur catastrophe (Remacle, J. *et al*, 1990 ; Toussaint, O. *et al*, 1994a).

Une fois ces concepts acceptés, il reste à rechercher un modèle permettant de comprendre comment ces erreurs peuvent s'accumuler au cours du temps et finalement atteindre ce seuil de non-retour.

La théorie de la thermodynamique des systèmes ouverts permet de répondre, au moins en partie à cette question.

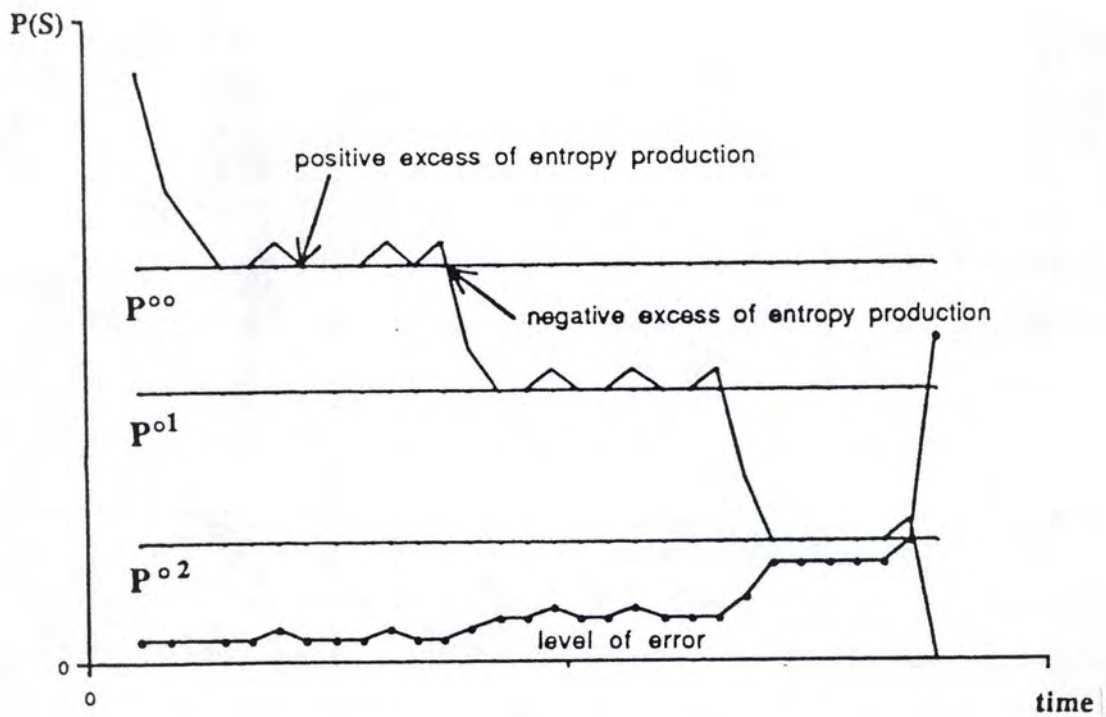


Fig. I-2 : Evolution de la production d'entropie et du niveau d'erreurs en fonction du temps lors du vieillissement cellulaire suivant les lois de la thermodynamique des systèmes ouverts loin de l'équilibre.  
(Toussaint, O. *et al*, 1991)

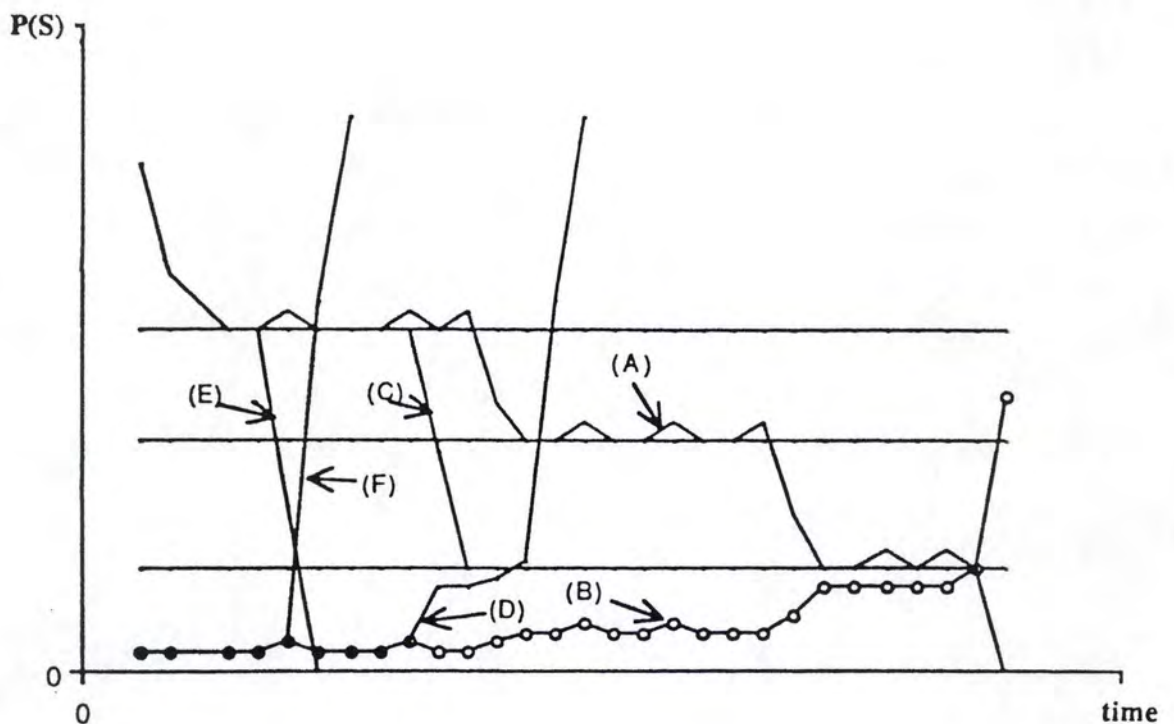


Fig. I-3 : Evolution de la production d'entropie (A, C et E) et du niveau d'erreurs (B, D et F) suite à des stress d'intensités respectivement faible, intermédiaire et élevé.  
(Toussaint, O. *et al*, 1991)



### 3. La Thermodynamique pour expliquer le vieillissement

#### 3.1. La cellule comme système thermodynamique ouvert loin de l'équilibre

Une nouvelle approche permettant d'expliquer le vieillissement cellulaire utilise la théorie des systèmes irréversibles loin de l'équilibre (Toussaint, O. *et al*, 1991).

Dans ce modèle, la cellule est considérée comme un système ouvert loin de l'équilibre, c'est-à-dire un système auto-organisé qui répond à des critères de stabilité particuliers. Un tel système se maintient grâce aux transformations biochimiques et physico-chimiques qui s'y produisent, générant ainsi une certaine production d'entropie dont le niveau reflète l'intensité de ces transformations et donc le niveau du métabolisme. Etant donné que toute cette production d'entropie est exportée à l'extérieur de la cellule sous forme de produits, de déchets, d'échange ionique ou de chaleur, le système se trouve ainsi toujours dans un état stationnaire.

C'est ici que la thermodynamique nous apprend qu'un tel système, s'il est régi par des lois physico-chimiques linéaires, peut fonctionner à un état stationnaire produisant un minimum d'entropie. Par contre, dans les systèmes régis par des lois physico-chimiques non linéaires, ce qui est le cas des cellules vivantes, il peut exister différents minima de production d'entropie, donc différents niveaux stationnaires, pour un même système suivant des paramètres internes et externes au système (fig. I-2).

Cette théorie basée sur la thermodynamique des systèmes ouverts nous permet de comprendre ce qui arrive au système cellulaire lorsqu'il est soumis à des variations des paramètres de son environnement, tels que des stress (fig. I-3) ou une stimulation, ou à des variations internes, comme l'accumulation de modifications irréversibles telles que des mutations ou des délétions de l'ADN, regroupées dans ce modèle sous le terme général d'erreurs.

### 3.2. Effet des perturbations et des stress sur la stabilité cellulaire

Ainsi, si des modifications de l'environnement surviennent, la cellule va s'en trouver immédiatement perturbée et les principales voies métaboliques vont s'en voir altérées, perdant ainsi leur caractère optimisé, donnant lieu par exemple à une perte d'activité par unité de substrat et de temps, et donc à une baisse générale du niveau de production d'entropie.

Face à ces perturbations, la cellule peut réagir de différentes façons : tout d'abord via l'activation de mécanismes " senseurs " de stress tels que certains facteurs de transcription dont l'expression augmente ou qui sont activés lors de stress oxydatifs, ensuite par l'induction de mécanismes de défense envers ces perturbations, de même que des mécanismes de réparation et d'élimination des dommages, enfin, en permettant la néosynthèse de constituants endommagés.

Deux cas de figure sont envisageables, soit la cellule est capable de réagir et induit les différents mécanismes que nous venons d'énumérer brièvement, soit elle en est incapable, et dès lors, elle peut soit mourir, soit se retrouver à un niveau de production d'entropie inférieur où elle réoptimalise ses fonctions en tenant compte du nombre plus élevé d'erreurs.

Ainsi, ce modèle permet de comprendre que lors du vieillissement, de même que lors de stress, le système cellulaire peut passer d'un niveau minimal de production d'entropie à un autre jusqu'à la mort cellulaire.

On peut classer les stress dans 3 catégories principales suivant le type de réponse cellulaire qu'ils engendreront .

Ainsi, le premier type de stress consiste en des **stress de faible intensité et omniprésents**. Ces stress regroupent par exemple les fluctuations de pH , de température, de la composition ionique mais aussi la présence de radicaux libres en faible quantité. Les dégâts occasionnés par ces stress sont sans cesse réparés. La cellule augmente ainsi légèrement les activités métaboliques liées à un ou des systèmes de



défense afin de se protéger et on assiste dès lors à une augmentation temporaire du niveau de production d'entropie puis à un retour au niveau de départ.

Les **stress d'intensité intermédiaire**, qui peuvent être répétés, résultent de situations tout à fait anormales, pouvant refléter certaines conditions pathologiques : inflammation d'un tissu, présence de molécules toxiques, exposition répétée aux U.V. ou à la radioactivité, excès de la production de radicaux libres, etc. Dans ce cas de figure, les systèmes de défense et de réparation se retrouvent momentanément débordés et dès lors, on assiste à une accumulation irréversible du niveau d'erreurs et à une diminution du niveau de production d'entropie, autrement dit un abaissement irréversible de l'activité métabolique globale de la cellule, due à ces erreurs. Le système cellulaire doit alors réoptimaliser ses fonctions afin de se restabiliser à ce niveau métabolique inférieur.

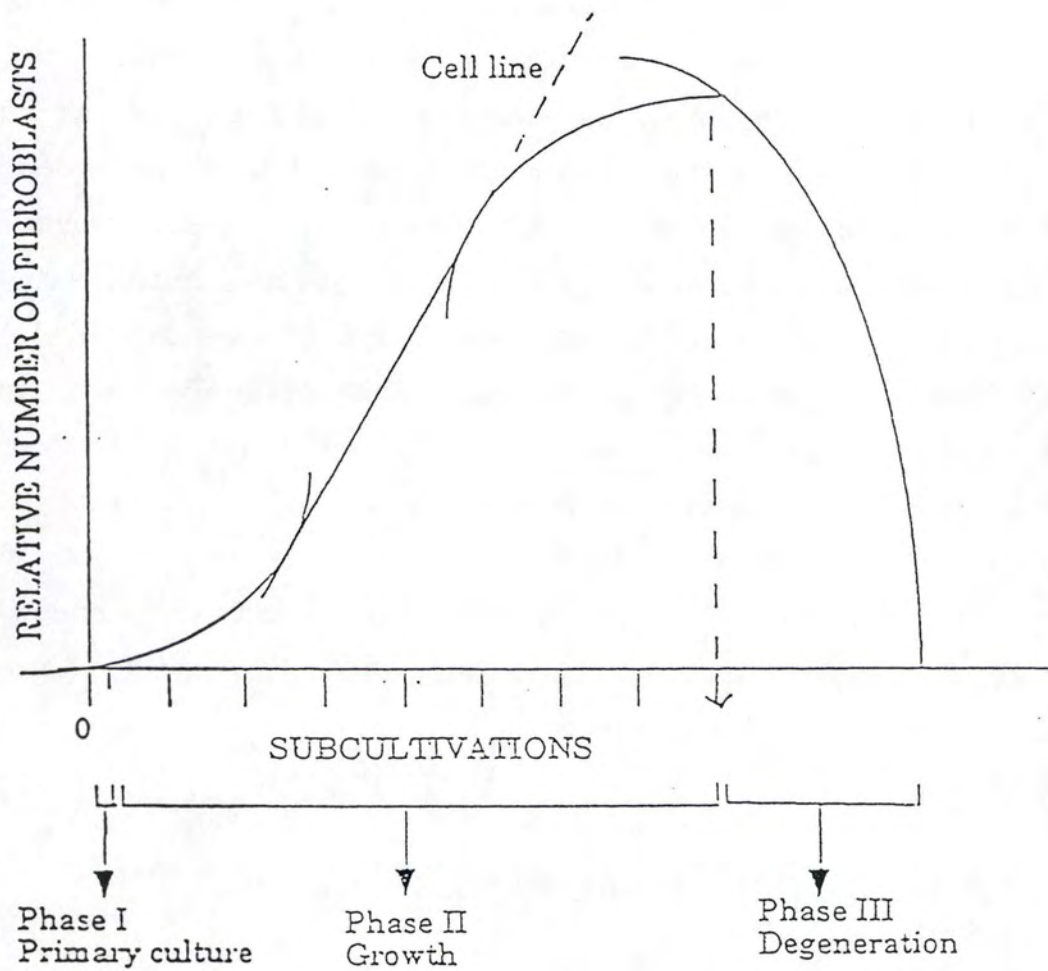
Enfin, lors des **stress de forte intensité**, les perturbations sont tellement importantes que la cellule n'est plus capable de retrouver un état d'équilibre dynamique et son niveau d'erreurs internes augmentant de façon continue, devient alors incontrôlable. La cellule n'est plus capable d'assurer son métabolisme de base et meurt.

## **4. L'étude du vieillissement cellulaire *in vitro***

### **4.1. Bref historique**

Historiquement, les problèmes rencontrés par les études du vieillissement *in vitro* se confondent avec ceux rencontrés en culture cellulaire.

Rappelons ainsi qu'au début des cultures cellulaires, en 1912, Alexis Carrel, mit en culture des cellules de muscles cardiaques de poulet qui proliférèrent pendant plus de 30 ans. Ainsi naquit le mythe de l'immortalisation des cellules mises en culture. Ce mythe s'est maintenu



**Fig. I-4 :** 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).



jusqu'aux années '50 et différents travaux ont montré par la suite qu'il s'agissait en fait d'un artefact expérimental.

En 1916, Peyton Rous introduisit la culture en monocouche de cellules ainsi que l'utilisation de la trypsine pour détacher les cellules.

Grâce aux différentes évolutions techniques telles que la mise au point de milieux de culture artificiels par des personnes portant un nom devenu maintenant commun dans les laboratoires de biologie cellulaire (Dulbecco, Eagle, etc.), de même qu'un contrôle plus ou moins strict du sérum y étant ajouté ainsi que l'amélioration des conditions de stérilité, les cultures cellulaires firent d'énormes progrès, suivies par l'étude du vieillissement *in vitro*.

#### 4.2. La sénescence réplivative

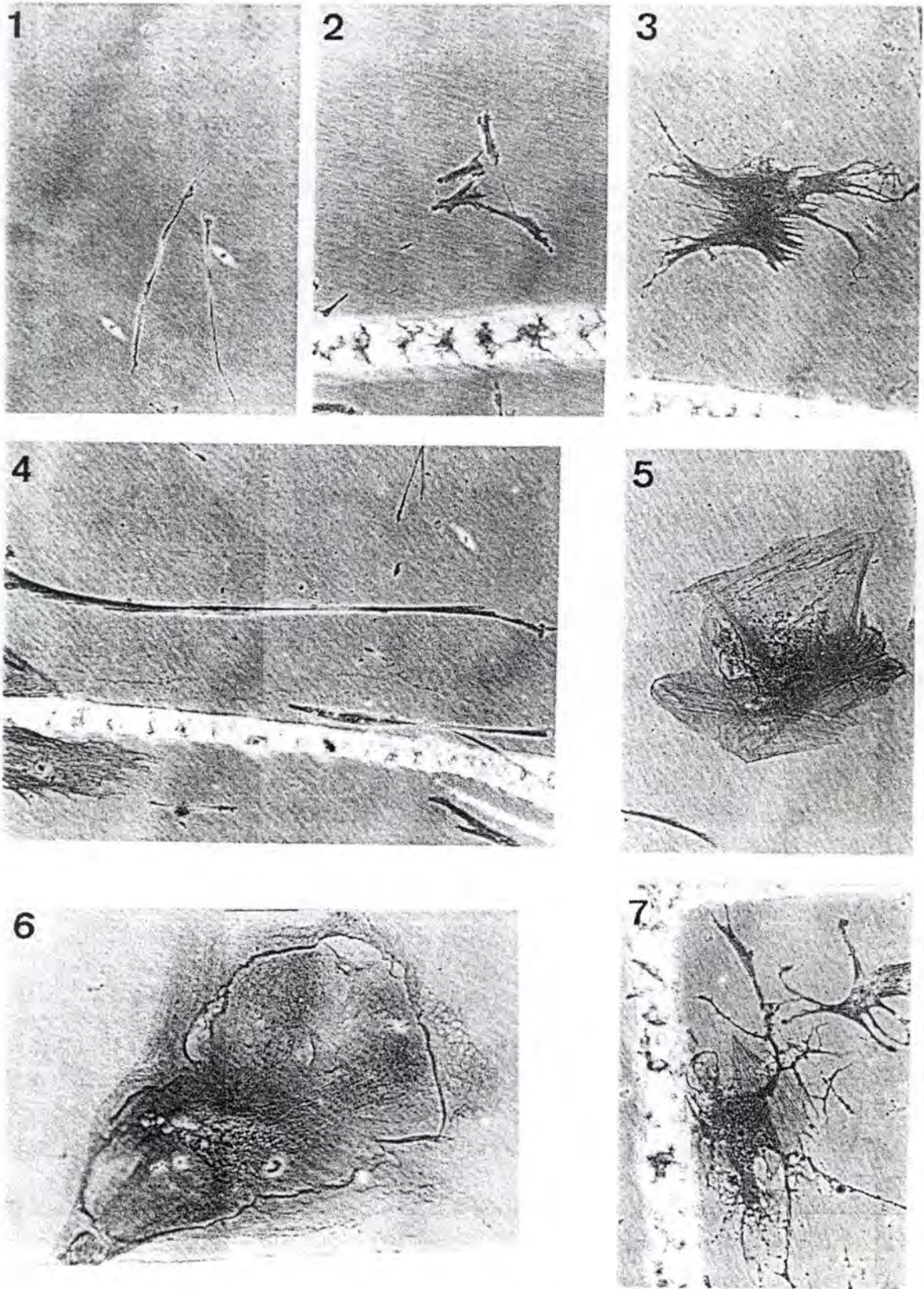
C'est en 1961 que L. Hayflick et P. Moorhead (Hayflick, L. et Moorhead, P., 1961) réussirent à montrer l'évolution des capacités prolifératives des cellules au cours du temps.

Ensemble, ils mirent au point les différentes étapes de mises en culture et de repiquage de cellules.

Ils montrèrent également que des fibroblastes de poumon d'embryon humain mis en culture, se divisaient un nombre limité de fois, soit environ 50 passages en culture. Ils établirent que l'évolution des cultures pouvait se diviser en 3 phases : la phase I correspond à la mise en culture des cellules à partir du tissu d'origine, la phase II correspond à une croissance rapide et exponentielle des cellules, la phase III quant à elle, se caractérise par un ralentissement marqué des divisions cellulaires menant ensuite à un arrêt irréversible des mitoses (fig. I-4).

Ce modèle, connu sous le nom de sénescence réplivative a ensuite été élargi à d'autres types cellulaires prolifératifs et à d'autres espèces animales, de telle sorte qu'il est actuellement accepté comme un modèle général du vieillissement *in vitro* des cellules à potentiel prolifératif limité. Ce modèle a servi de bases à plusieurs travaux et ceux-ci ont entre autres montré que cette évolution des cellules au cours des passages en culture





**Fig. I-5 :** 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 PMFVII  
(Toussaint, O. *et al*, 1992)



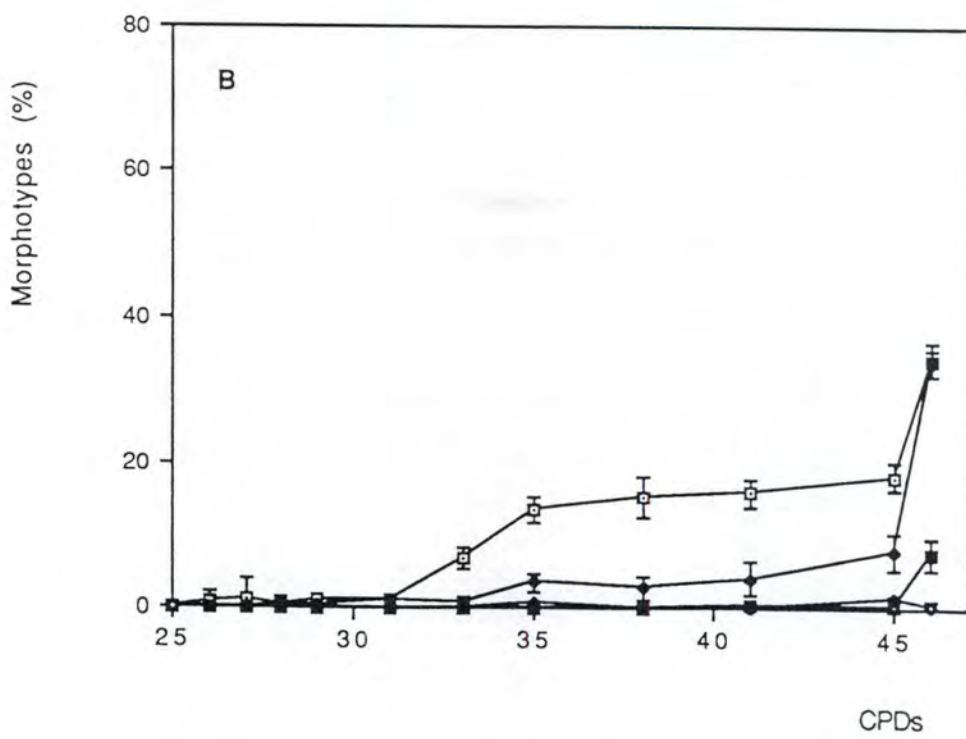
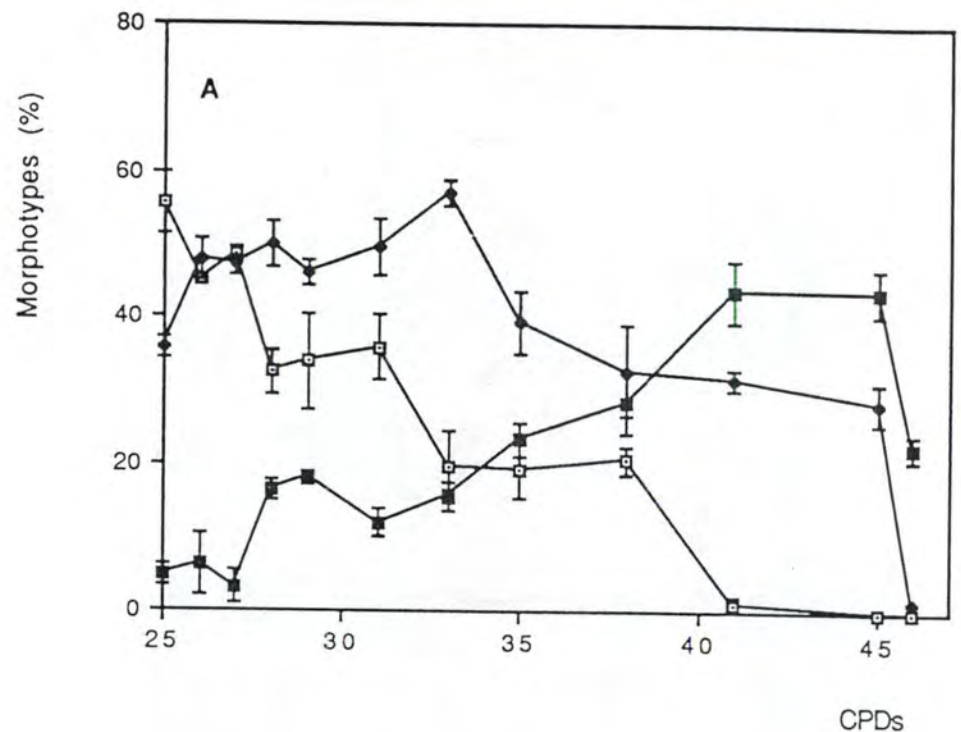
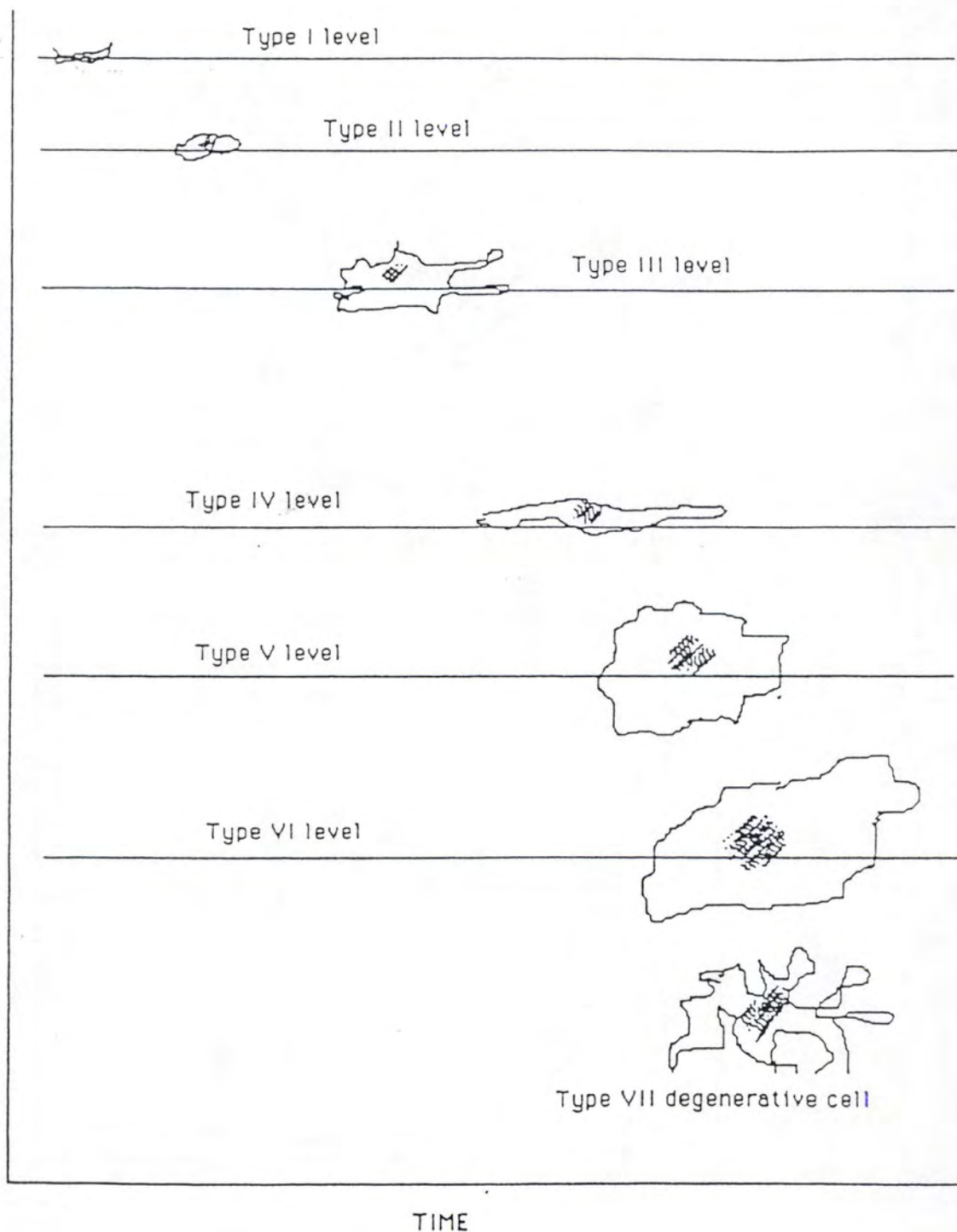


Fig. I-6 : (A) Proportions des fibroblastes mitotiques WI-38 en fonction du nombre de passage en culture, MFI (□), MF II (◆) et MF III (■). (B) Proportions des fibroblastes post-mitotiques WI-38 en fonction du nombre de passage en culture, PMFIV (□), PMF V (◆) et PMF VI (■). (Toussaint, O. *et al*, 1992)

LEVEL OF ENTROPY PRODUCTION



**Fig. I-7 :** Représentation schématique de la relation entre le niveau de production d'entropie et la succession des 7 morphotypes. Le niveau métabolique diminue du morphotype I au morphotype VII. (Toussaint, O. *et al*, 1996)

s'accompagnait de modifications morphologiques et biochimiques apparaissant progressivement.

### 4.3. Les morphotypes

Parmi ces études, nous pouvons citer les études de l'équipe de K. Bayreuther (Bayreuther, K. *et al*, 1988), - qui, notons-le au passage, a travaillé avec Dulbecco pour la mise au point de milieux de culture - qui ont montré qu'il était possible de classer les fibroblastes humains en 7 classes morphologiquement bien distinctes au cours de leurs différents passages en culture. Bayreuther avait émis l'hypothèse que ces différents "morphotypes" correspondaient à des états distincts de différenciation. Actuellement, aucune étude n'a encore pu argumenter de façon décisive cette hypothèse. Quoiqu'il en soit, ces morphotypes constituent un excellent outil pour étudier la sénescence cellulaire *in vitro* et ce concept a, par exemple, été utilisé pour étudier un effet accélérateur du vieillissement lors de stress sublétaux au *tert*-butylhydroperoxyde (t-BHP) et à l'éthanol (Toussaint, O. *et al*, 1992b).

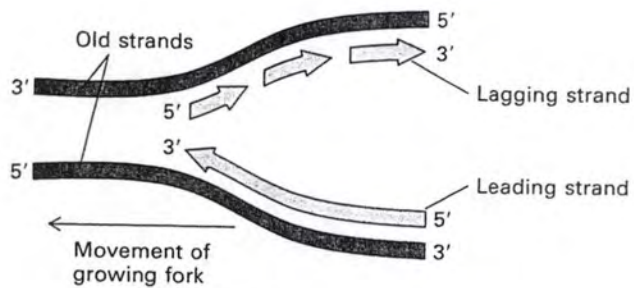
On peut classer ces morphotypes en 3 stades : les morphotypes mitotiques (MF I, II et III) présents en quantité abondante dans les cultures jeunes, les morphotypes post-mitotiques (PMF IV, V et VI) apparaissant progressivement au fil des passages en culture et enfin le morphotype VII correspondant aux cellules nécrotiques (fig. I-5).

Chacun de ces stades est caractérisé par des critères morphologiques et biochimiques précis.

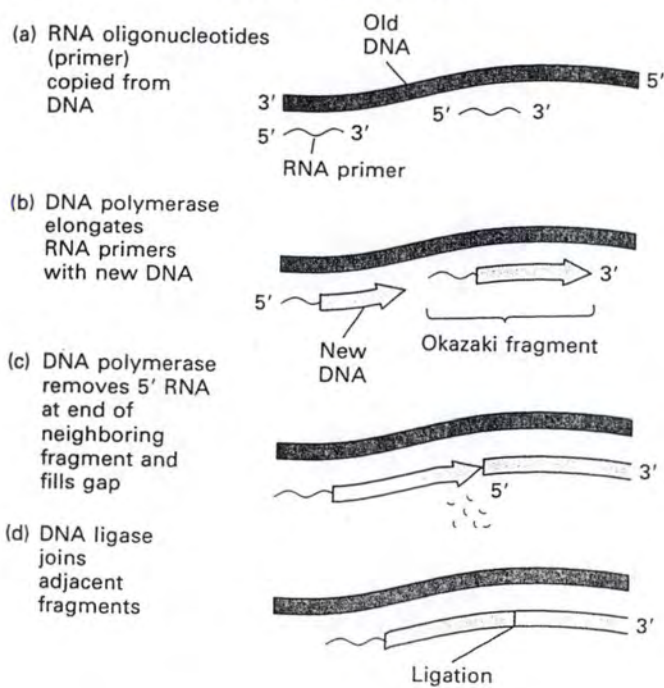
Les proportions des différents morphotypes varient en fonction du nombre de doublements de population atteint par les cellules en culture (Toussaint, O. *et al*, 1992b) (fig. I-6).

Notons qu'il existe un lien théorique entre ces morphotypes et la thermodynamique des systèmes ouverts. En effet, cette théorie peut poser que chacun des stades représente un état stationnaire de production d'entropie et possède un niveau de métabolisme caractéristique (fig. I-7).





**Lagging-strand synthesis**



**Fig. I-8 :** Schéma de la réplication de l'ADN par l'ADN polymérase. (Lodish, H. *et al*, 1997)



#### 4.4. L'activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence

L'équipe de J. Campisi (Dimri, G.P. *et al*, 1995) a mis en évidence chez les cellules sénescents, c'est-à-dire n'étant plus capables de se diviser, une activité enzymatique  $\beta$ -galactosidase qui leur est propre et pour cette raison nommée " Senescence-Associated  $\beta$ -galactosidase Activity " (SA  $\beta$ -gal). En effet, celle-ci semble différer de l'activité lysosomiale de cette enzyme active chez les cellules jeunes à un pH optimal de 4 puisque son optimum d'activité se situe à pH 6.

L'origine de cette activité est toujours inconnue, plusieurs hypothèses sont proposées :

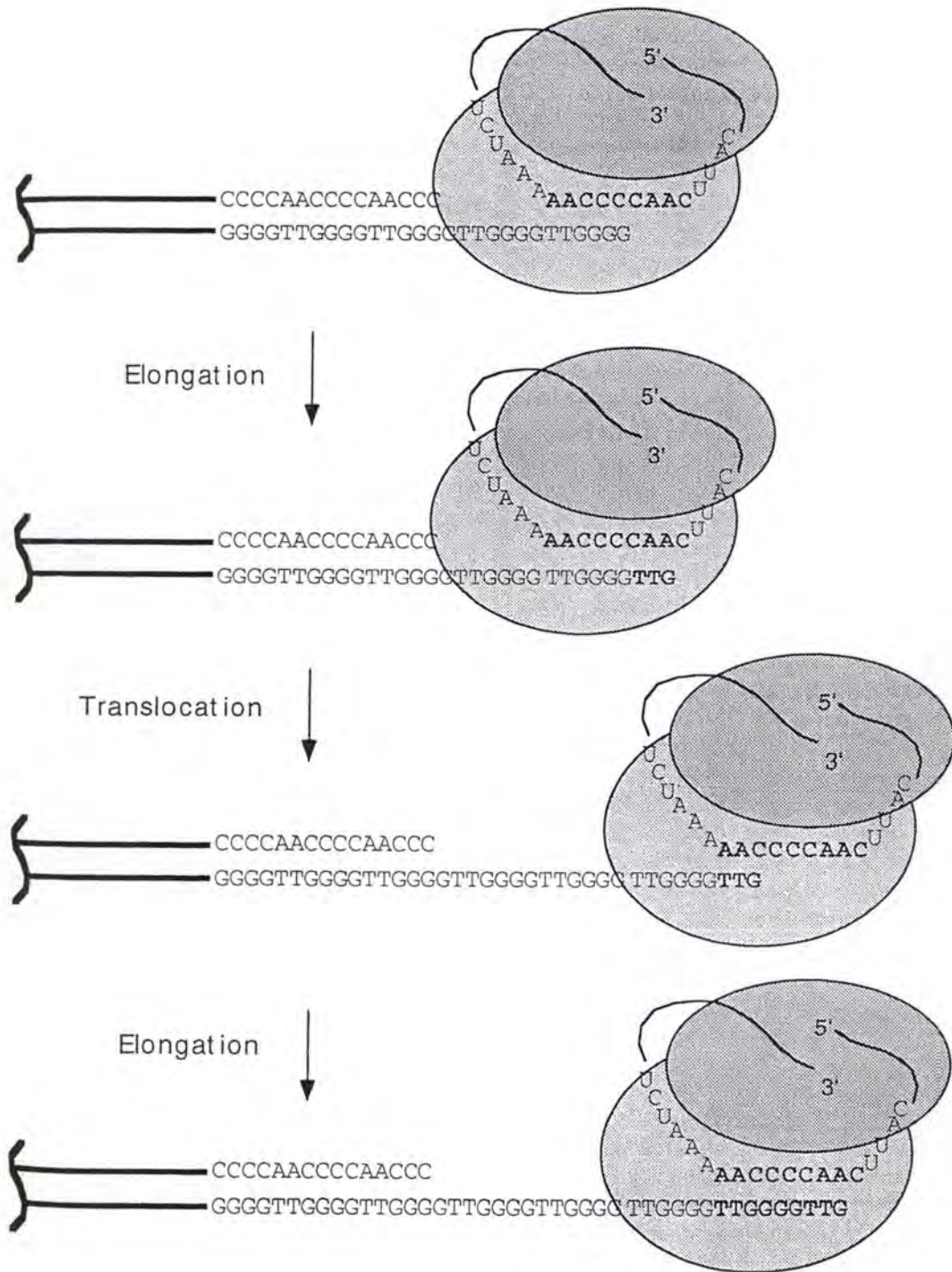
- il pourrait s'agir d'une augmentation de l'activité  $\beta$ -gal "classique", dont le pic de pH optimal s'élargirait et qui deviendrait dès lors détectable à pH 6. Un argument intéressant en faveur de cette hypothèse est qu'on a observé l'augmentation de la taille des lysosomes chez les cellules sénescents (Remacle, J. *et al*, 1980).

- soit il s'agit de l'expression d'une forme de l'enzyme épissée de façon différente ou soumise à une protéolyse post-traductionnelle, et qui aurait dès lors une activité optimale à pH 6 suite à des modifications tridimensionnelles du site actif.

Quoiqu'il en soit, il s'agit d'un excellent biomarqueur des cellules sénescents *in vitro*.

#### 4.5. Le raccourcissement des télomères

Les télomères sont des parties non codantes du génome situées aux extrémités des chromosomes et constituées de la répétition d'une courte séquence consensus (TTAGGG chez l'homme). A la naissance, ils ont une longueur d'environ 10 à 15 kb, qui diminue au cours des divisions cellulaires chez les cellules somatiques humaines (Harley, C. *et al*, 1990).



**Fig. I-9 :** Schéma du mode d'action de la télomérase. La télomérase (représentée ici par 2 ronds gris) reconnaît le télomère et les dernières bases TTGGGG répétées s'apparient avec la région CAACCCCAA de son composant en ARN. Via des translocations, de l'ARN est copié à la fin de la région télomérique et peut ensuite servir de base à la synthèse d'ADN.  
(Greider, C. et Harley, C., 1996)



Cette perte se chiffre aux environs de 50 à 150 pb par passage en culture *in vitro* et 15 à 50 pb par an *in vivo*.

La raison de ce raccourcissement trouve son origine dans le mode d'action de l'ADN-polymérase lors de la réplication (fig. I-8). En effet, l'ADN polymérase ne peut qu'avancer dans le sens 5'-3', donnant lieu ainsi à la synthèse d'un brin continu et à la synthèse d'un brin discontinu, formé de fragments d' Okazaki reliés ensuite entre eux par une ligase. C'est au niveau de ce brin que se trouve l'explication. En effet, l'ADN-polymérase a toujours besoin d'une amorce d'ARN pour lui permettre de synthétiser le brin complémentaire, cette amorce est ensuite excisée grâce à l'activité 5'-3' exonucléase de l'ADN-polymérase lorsqu'elle arrive au début du fragment précédent.. Or, avec ce système, on perd toujours la dernière amorce d'ARN qui ne pourra être remplacée par de l'ADN et qui finira par être dégradée, menant ainsi à un raccourcissement des télomères.

Ceci n'est plus vrai chez les cellules germinales et les cellules immortelles, comme les cellules cancéreuses (Greider, C. et Harley, C., 1996). Chez ces cellules, la longueur des télomères reste constante au fil des divisions cellulaires. Ceci est dû à l'activité d'une télomère synthase (la télomérase) qui est constituée d'un site catalytique capable de polymériser des désoxyribonucléotides sur une matrice d'ARN et la molécule d'ARN elle-même qui constitue cette matrice (fig. I-9).

Ces observations ont donné lieu à l'élaboration d'une nouvelle théorie du vieillissement dans laquelle on émet l'hypothèse que le raccourcissement des télomères devient tellement important à partir d'un moment qu'il va entraîner l'arrêt du cycle cellulaire. Deux propositions sont avancées afin d'expliquer cet arrêt : tout d'abord, la possibilité que ce raccourcissement finisse par affecter des gènes qui précéderaient ces télomères, ces quels gènes pourraient eux-mêmes jouer un rôle dans le cycle cellulaire qui serait donc affecté, ou bien la possibilité que la cellule perçoive ces raccourcissements comme des dommages via l'activation par exemple de p53 qui pourrait lui-même activer p21, ce qui mènerait à l'arrêt du cycle. Quelle que soit l'explication avancée, les télomères sont donc schématiquement représentés comme notre horloge interne calculant le



Gene/protein	Description/function	Expression	References
cdk2	Cyclin-dependent protein kinase-2	G1	Afshari <i>et al.</i> (1993)
cycA	Cyclin A, activator of cdk kinase	Late G1	Stein <i>et al.</i> (1991); Afshari <i>et al.</i> (1993)
cycB, cdc2	Active cdc2 kinase components	G2/M	Stein <i>et al.</i> (1991)
DHFR	Dihydrofolate reductase	Late G1/S	Pang and Chen (1993, 1994)
E2F1	Component of E2F transcription factor	Mid-late G1	Dimri <i>et al.</i> (1994)
EPC1	Serine protease inhibitor	G0	Pignolo <i>et al.</i> (1993)
c-fos	Component of AP-1 transcription factor	Early G0/G1	Seshadri and Campisi (1990)
gas1, gas6	Growth arrest-specific genes	G0	Cowled <i>et al.</i> (1994)
his2a,2b,3,4	Replication-dependent histones	Late G1/S	Zambetti <i>et al.</i> (1987); Seshadri and Campisi (1990)
hsp70, 90	Heat shock proteins 70 and 90	Stress-inducible late G1/S	Liu <i>et al.</i> (1989); Choi <i>et al.</i> (1990); Luce and Cristofalo (1992)
Id1, Id2	Inhibitors of bHLH transcription factors	Early and mid-G1	Hara <i>et al.</i> (1994)
IGF1	Insulin-like growth factor-1	G1	Ferber <i>et al.</i> (1993)
IL-6	Interleukin-6 multifunctional cytokine	G1	Goodman and Stein (1994)
L7	Large ribosomal subunit protein	Constitutive	Seshadri <i>et al.</i> (1993)
mig-5	Tissue inhibitor of metalloproteinase	G0/G1	Wick <i>et al.</i> (1994)
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen/ DNA polymerase $\delta$ function	Late G1/S	Chang <i>et al.</i> (1991)
pola	DNA polymerase $\alpha$	Late G1/S	Pendergrass <i>et al.</i> (1991)
RNR	Ribonucleotide reductase	Late G1/S	Pang and Chen (1993, 1994)
TIIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteinase	G0	West <i>et al.</i> (1989); Millis <i>et al.</i> (1992)
TK	Thymidine kinase	Late G1/S	Pang and Chen (1993, 1994)
TS	Thymidylate synthetase	Late G1/S	Pang and Chen (1993, 1994)

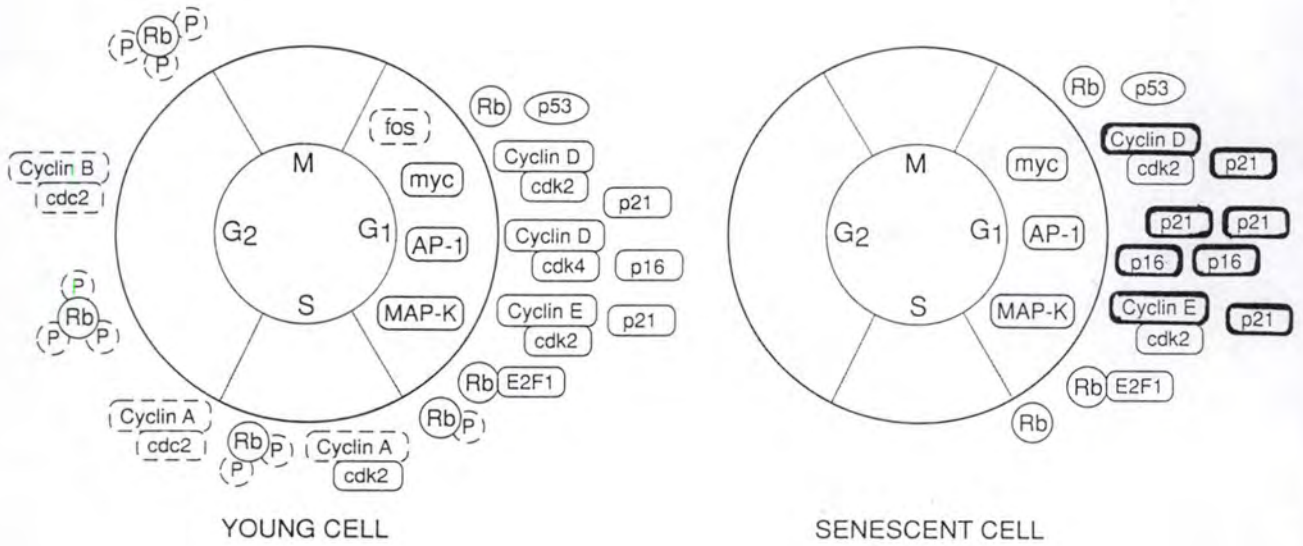
**Tableau I-1 :** Gènes réprimés ou sous-exprimés chez les fibroblastes humains sénescents (Campisi, J. *et al.*, 1996)

Gene/protein	Description/function	References
Cathepsin B	Protease	DiPaolo <i>et al.</i> (1992)
Collagen, $\alpha 1, 2$ (I)	Extracellular matrix component	Murano <i>et al.</i> (1991)
Collagenase	Protease; extracellular matrix remodeling	West <i>et al.</i> (1989); Millis <i>et al.</i> (1992)
Cyclins E and D	Regulatory components of cdks	Dulic <i>et al.</i> (1993)
EF1 $\alpha$	Protein synthesis elongation factor	Giordano <i>et al.</i> (1989)
Fibronectin	Extracellular matrix component	Porter <i>et al.</i> (1990); Murano <i>et al.</i> (1991)
IGFBP-3	Insulin-like growth factor binding protein	Murano <i>et al.</i> (1991)
IL-1	Interleukin-1 $\alpha$ and -1 $\beta$ cytokines	Kumar <i>et al.</i> (1992)
p21 (sdi1)	Cyclin-dependent kinase inhibitor	Noda <i>et al.</i> (1994)
SAG	Senescence-associated gene, function unknown	Wistrom and Villeponteau (1992)
Statin	Nuclear protein, associates with pRb	Wang (1985)
Stromelysin	Protease; extracellular matrix remodeling	Millis <i>et al.</i> (1992)
WS3-10	Calcium binding protein	Liu <i>et al.</i> (1994a )

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

Gene/protein	Description/function	Modification	References
cdk	Cyclin-dependent protein kinase; G1 progression	Inhibition of activity; p21 association	Dulic <i>et al.</i> (1993)
Fibronectin	Extracellular matrix component	Novel antigenic determinant	Porter <i>et al.</i> (1990)
Mortalin	hsp70-related	Intracellular localization	Wadhwa <i>et al.</i> (1993)
pRb	Tumor suppressor, growth inhibitor	Lack of phosphorylation	Stein <i>et al.</i> (1990)
Prohibitin	Growth inhibitor	Loss of low-MW form; phosphorylation?	Liu <i>et al.</i> (1994 b)   <sup>4</sup>
Terminin	Lysosomal?/unknown	Proteolysis to smaller peptide	Wang and Tomaszewski (1991)

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



**Fig. I-10 :** Régulation du cycle cellulaire chez les fibroblastes jeunes et sénescents.

Les composants entourés de gras sont ceux qui sont sur-exprimés lors de la sénescence, ceux entourés d'une ligne discontinue voient quant à eux leur expression diminuer au cours du vieillissement.

(Afshari, C. *et al*, 1996)



nombre de divisions réalisées et enclenchant la sénescence à partir d'un certain nombre de divisions.

Notons enfin que de récentes recherches (Bodnar, A. *et al*, 1998) ont montré que des fibroblastes pouvaient voir leur capacité proliférative augmentée d'au moins 20 passages en culture lorsqu'ils étaient transfectés par des vecteurs contenant la télomérase, ce qui argumente favorablement l'hypothèse d'un lien entre le raccourcissement des télomères et la sénescence cellulaire *in vitro*.

#### 4.6. Modulation de l'expression génique au cours du temps

(pour une revue, voir Campisi, J. *et al*, 1996)

Plusieurs gènes voient leur expression varier au cours du temps. On peut les classer en 2 catégories : les gènes intervenant dans le cycle cellulaire et les gènes liés à des fonctions spécifiques assurées par le type cellulaire étudié. Nous allons nous attacher ici plus particulièrement aux gènes dont l'expression varie chez les fibroblastes humains (tableaux I, II et III).

##### 4.6.a. Variations dans l'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire

(fig.I-10)

Une des caractéristiques majeures de la cellule sénescence est qu'elle est incapable de se diviser. C'est au niveau de la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire qu'un blocage apparaît, rendant impossible aux cellules la transition en phase S. On peut classer les gènes impliqués dans le cycle cellulaire et qui voient leur expression varier en 4 catégories :

- **Gènes de réponse précoce**

Les gènes de réponse précoce sont des gènes qui sont induits dans les minutes qui suivent une stimulation par des facteurs de croissance. La plupart de ces gènes sont plus ou moins bien exprimés lors de la sénescence, toutefois, 2 gènes, le proto-oncogène *c-fos* et les

gènes *Id-1* et *Id-2* voient leur expression inhibée. Puisque ces gènes sont nécessaires au passage en phase S, ceci nous donne déjà une première explication de l'arrêt des capacités prolifératives chez les cellules sénescents.

- **Gènes impliqués dans la transition G1/S**

Plusieurs gènes nécessaires à la transition entre les phases G1 et S ne sont plus exprimés dans les cellules sénescents. Citons par exemple les gènes de réplication histones-dépendants qui ne sont plus exprimés, ou encore le facteur de transcription E2F, nécessaire à la transcription de gènes impliqués en G1/S. En fait, E2F contrôle l'expression de certains gènes dont les protéines sont responsables de la réplication du matériel génétique comme par exemple la thymidine kinase, la thymidilate synthétase et la dihydrofolate réductase.

- **Cyclines et kinases dépendantes de cyclines**

Plusieurs cyclines et kinases dépendantes de cyclines (cdk) responsables de la régulation des phases G1 et G2 voient leur expression diminuer au cours du temps.

Ainsi, on assiste par exemple chez les fibroblastes humains à une sous-expression de cdk2, des cyclines A et B ainsi que des cdk dépendantes des cyclines E et D. Une diminution de la quantité de cycline D peut être responsable d'une diminution d'activité des complexes cdk4/cycline D1 et cdk6/cycline D1, diminuant ainsi le niveau de phosphorylation de la protéine de rétinoblastome, pRb.

- **Inhibiteurs de croissance**

Enfin, on remarque également une sur-expression d'inhibiteurs de croissance tels que p53 et p21. Une hyperphosphorylation de pRb est également présente chez les cellules sénescents, qui forme alors un complexe avec E2F, rendant ce dernier incapable d'initier la transcription de gènes cités ci-dessus.



En résumé, les causes immédiates permettant d'expliquer l'arrêt des capacités prolifératives chez les cellules sénescentes sont d'une part la sous-expression ou l'inactivation d'effecteurs positifs et d'autre part une sur-expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire.

#### 4.6.b. Variation de l'expression de gènes impliqués dans des fonctions spécifiques

Divers gènes responsables de fonctions spécifiques du type cellulaire étudié voient leur expression altérée au cours du vieillissement. On peut citer par exemple une augmentation de la transcription des gènes *IL-1 $\alpha$*  et *I-CAM* chez les cellules endothéliales.

#### 4.6.c. Causes de ces variations

Face à ces modifications dans l'expression des gènes, plusieurs hypothèses sont émises :

- Tout d'abord, il pourrait s'agir d'une dérégulation de l'expression des facteurs de transcription impliqués dans l'activation de ces gènes.

Comme exemple, nous pouvons citer le gène *c-fos* dont la transcription diminue au cours du temps. Dès lors, sa protéine sera exprimée en plus faible quantité, ce qui aura pour conséquence directe une diminution de la formation du facteur de transcription AP-1, formé des protéines *c-fos* et *c-jun*. De ce fait, les gènes normalement activés par AP-1 ne seront plus transcrits.

- Ensuite, sachant que la disponibilité en énergie libre diminue au cours du temps, on comprend intuitivement que cette baisse d'énergie puisse avoir un impact sur l'expression de certains gènes normalement fortement transcrits. En effet, les étapes de transcription et de traduction demandent de l'énergie, or, si la disponibilité en énergie diminue, les gènes ne seront plus, ou en tous cas moins, exprimés.



- L'efficacité des systèmes de défense diminue aussi au cours du vieillissement, ce qui peut avoir un effet sur l'expression de certains gènes. Ainsi, par exemple, les systèmes antioxydants deviennent de moins en moins aptes à pouvoir protéger les cellules envers les effets néfastes des radicaux libres dérivés de l'oxygène et les systèmes de réparation de l'ADN voient leur activité diminuer. Ceux-ci peuvent donc agir indirectement sur le bon déroulement de l'expression des gènes, ou sur une modification du potentiel rédox intracellulaire, déterminant l'activation ou l'inactivation de certains facteurs de transcription.

- Enfin, le génome présente des altérations dans les cellules âgées, ce qui peut avoir un effet néfaste sur l'expression de gènes. Ainsi, l'ADN mitochondrial peut subir plusieurs délétions différentes au cours du temps. Dès lors, on peut supposer que les délétions de l'ADN mitochondrial sont responsables de modifications dans l'expression de certains gènes codés par le génome mitochondrial. Ainsi, dans certains types cellulaires métaboliquement très actifs, ces délétions peuvent causer un manque d'ATP dans les cellules âgées, citons par exemple les myocytes squelettiques où l'on note une perte significative d'activité de la cytochrome oxydase, dont certaines sous-unités sont codées par l'ADN mitochondrial.

#### 4.7. Relations entre stress et vieillissement *in vitro*

Lorsque des cellules jeunes sont soumises à une série de stress sublétaux répétés suivant le modèle élaboré au laboratoire, il a été montré que les cellules semblaient subir un vieillissement accéléré.

En effet, plusieurs biomarqueurs du vieillissement ont été testés sur des cellules contrôle et des cellules stressées et on observe que ces dernières semblent vieillir plus vite que les autres.

Ainsi, au niveau des morphotypes, des expériences de stress unique au t-BHP ont montré un effet d'accélération du vieillissement, illustré par la diminution de la proportion de morphotypes dits jeunes (I et II) au profit d'une augmentation des morphotypes dits âgés (de III à VI) dans la

population de départ. Le morphotype VII n'est, quant à lui, généralement pas observé car il s'agit d'un morphotype dégénératif et donc disparaissant rapidement (Toussaint, O. *et al*, 1992b).

On a également démontré, au moyen d'un stress par jour pendant 1 à 5 jours, que la progression de la population vers les morphotypes âgés dépend directement du nombre de stress effectués.

En ce qui concerne l'activité  $\beta$ -gal associée au vieillissement, une augmentation de la proportion de cellules présentant cette activité a été observée, après des stress successifs au t-BHP. La tendance est donc également confirmée pour ce biomarqueur.

Au niveau du raccourcissement des télomères, il a été montré que lors de stress sous une atmosphère contenant 40% d'oxygène, ce raccourcissement était bien accéléré lors des stress menant jusqu'à des pertes de 500 pb par doublement de population (Von Zglinicki, T. *et al*, 1995).

Enfin, en ce qui concerne l'expression génique, plusieurs gènes, dont l'expression varie chez les cellules sénescents et qui ont été découverts par E. Gonos et son équipe (Gonos, E. *et al*, 1998), à savoir une sur-expression chez les fibroblastes humains des gènes fibronectine,  $\alpha$ 1-procollagène, ostéonectine, ApoJ, GTP- $\alpha$ , cytochrome c oxydase et SM22 voient leur expression varier de façon similaire chez des cellules soumises à des stress sublétaux répétés.

Tous ces résultats semblent indiquer que les conditions de stress sublétaux agissent comme des agents accélérateurs du vieillissement *in vitro*

(Toussaint, O. *et al*, 1998).

Puisque ceci avait été démontré, nous avons décidé d'analyser de plus près les modifications de l'expression génique au cours de ces stress et du vieillissement cellulaire *in vitro* via la technique du differential display qui permet de comparer plusieurs populations à la fois, et ainsi de rechercher les gènes dont l'expression varie lors de ces stress et qui sont communs avec les cellules sénescents.



## 5. Le Differential Display

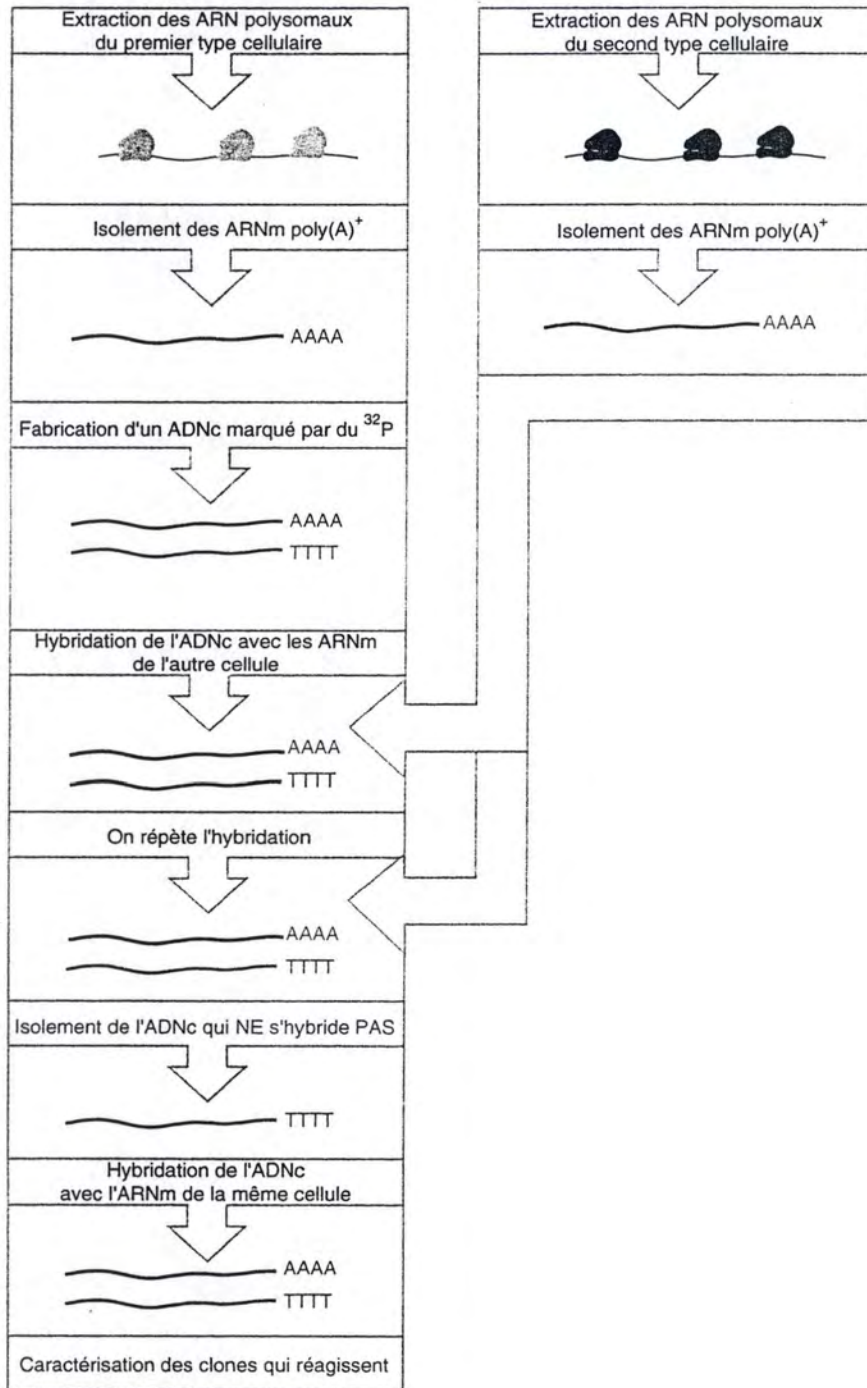
Le differential display, technique que nous avons utilisée lors de ce travail, est une technique permettant de comparer l'expression génique à partir des ARN-m de différentes populations cellulaires préalablement choisies. Il s'agit d'un outil très intéressant car, si le génome des organismes supérieurs compte aux environs de 100.000 gènes, seule une fraction de ceux-ci, généralement estimée à 15%, est transcrite et exprimée dans une cellule d'un type donné. Ces gènes contrôleront toutes les fonctions cellulaires, telles que le développement et la différenciation, de même que l'homéostasie, la régulation du cycle cellulaire, la réponse des cellules aux attaques extérieures etc. L'expression de ces gènes peut elle-même varier au cours de la durée de vie cellulaire, lors du développement par exemple, mais elle peut également être altérée sous différentes conditions comme les états pathologiques tels que le cancer.

Plusieurs techniques ont été mises au point afin d'étudier cette expression génique. Après avoir présenté les techniques plus anciennes, considérées comme les techniques "classiques" d'étude de l'expression génique, nous présenterons la technique du differential display ainsi que d'autres techniques récemment proposées.

### 5.1. Les techniques "classiques" d'étude de l'expression génique

La technique qui a sans doute le plus révolutionné l'étude de l'expression génique est sans nul doute la technique du **Northern Blot**. Dans celle-ci, une sonde marquée d'ARN ou d'ADN-complémentaire (ADN-c) du transcrit recherché est mise en contact avec l'ensemble des ARN-m extraits de la cellule et s'hybride avec sa séquence complémentaire. Présentée en 1977, elle reste toujours une technique de référence.





**Fig. I-11 : L'hybridation soustractive.**  
(Lewin, 1998)

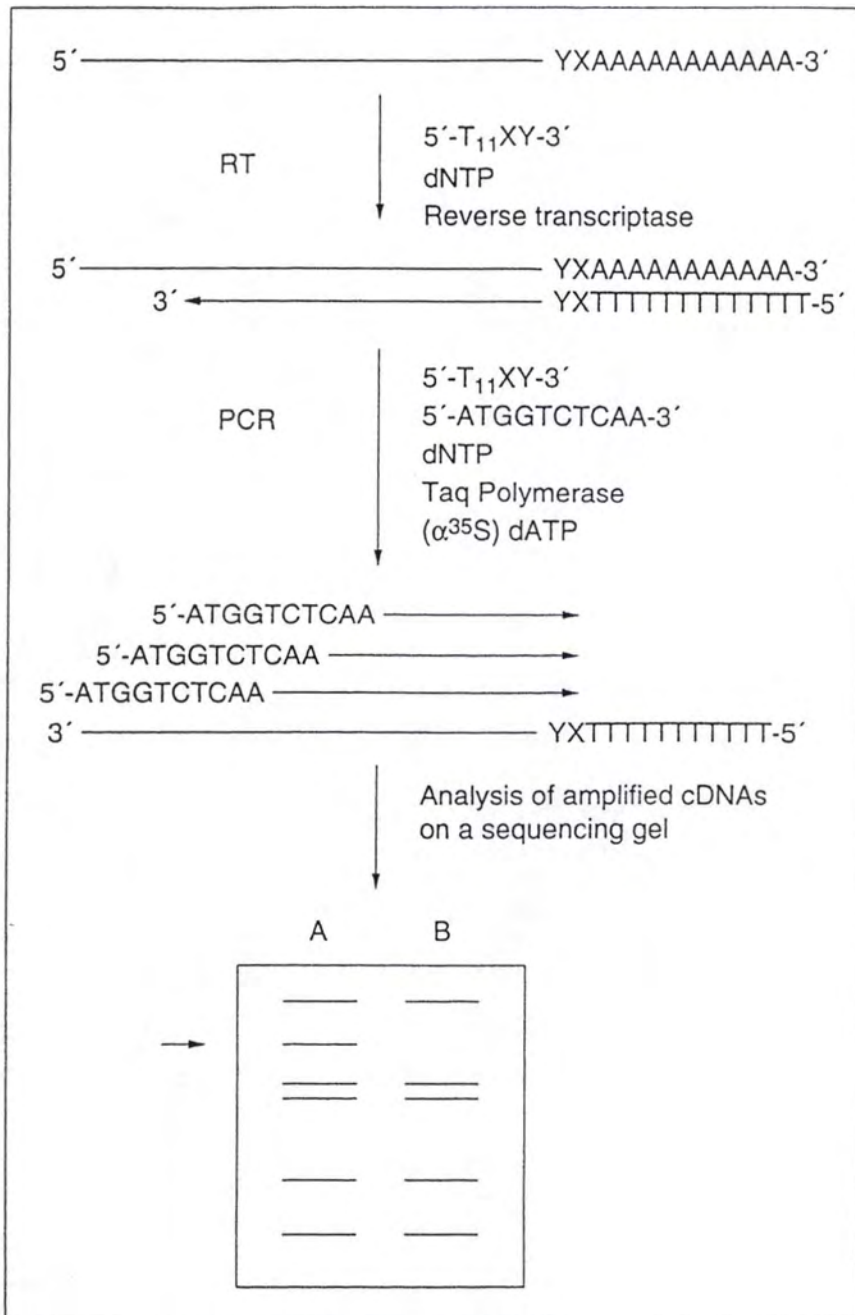
Une autre technique, **la RNase protection assay**, permet elle aussi de quantifier l'expression d'un ARN-m étudié. Ici, l'ADN complémentaire de l'ARN-m recherché est ajouté à l'ensemble des ARN-m extraits et va s'hybrider avec l'ARN-m dont il est complémentaire. Cet hybride double-brin est ensuite ainsi protégé de l'action d'une nucléase coupant les simples brins qui va exciser tous les autres ARN-m. L'hybride peut ensuite être visualisé sur un gel d'électrophorèse.

Bien que ces techniques soient d'excellents outils pour étudier des différences d'expression de gènes, leur principal désavantage est qu'elles ne permettent d'étudier qu'un faible nombre de gènes à la fois et que ces gènes doivent être de séquence connue, ce qui ne permet pas d'étudier les variations d'expression de gènes encore inconnus, ni de découvrir de nouveaux gènes.

Suite à ces considérations, une nouvelle technique fut mise au point, **l'Hybridation soustractive** (fig. I-11). Le principe en est le suivant, on extrait tout d'abord les ARN-m d'une population prise comme référence, on en réalise ensuite de l'ADN-c marqué qu'on va ensuite hybrider avec les ARN-m d'une autre population étudiée. On récupère ensuite les ARN-m qui ne se sont pas hybridés, c'est-à-dire les ARN-m qui n'étaient pas exprimés dans la première population, puis, via la construction de banques d'ADN-c, on recherche les gènes auxquels ils correspondent.

Cette technique a été utilisée avec succès dans différentes études et plusieurs améliorations ont été proposées afin d'augmenter son efficacité (Diatchenko, L *et al*, 1996).

Toutefois, elle a 2 désavantages majeurs : tout d'abord, elle ne permet pas la comparaison de plus de 2 populations et ensuite, elle nécessite une grande quantité d'ARN de départ, ce qui n'est pas toujours évident à obtenir à partir de systèmes *in vitro* délicats.



**Fig. I-12 :** Le differential display.  
(Kozian, D. *et al*, 1999)



Plusieurs techniques ont depuis été plus récemment mises au point, afin de permettre une analyse plus complète, plus rapide et nécessitant moins d'ARN.

## 5.2. Le differential display (fig. I-12)

Cette technique, mise au point en 1992 par P. Liang et A. Pardee (Liang, P. et Pardee, A., 1992) fut tout d'abord présentée comme une technique sûre et rapide de comparaison de l'expression génique dans deux ou plusieurs populations. Toutefois, des améliorations durent y être apportées par la suite afin de diminuer le nombre élevé de faux-positifs générés par cette technique (Liang, P. et Pardee, A., 1995). Les différentes étapes de cette technique seront expliquées en détails dans la partie Matériels et Méthodes de ce travail, en voici néanmoins le principe général.

On extrait tout d'abord l'ARN total des cellules qu'on rétro-transcrit dans un premier temps à l'aide de 4 amorces poly-T TVA, TVT, TVC et TVG (correspondant à la formule  $T_{16}VN$ , où  $V = A, C$  ou  $G$  et  $N = A, C, G$  ou  $T$ ). Ces amorces poly-T vont s'hybrider à la queue poly-A des ARN-m et permettre leur sélection à partir de l'ARN total. De plus, elles vont nous permettre de diviser la population totale d'ARN-m en 4 sous-populations (suivant la base représentée en N). Ensuite, on amplifie par polymérisation en chaîne (PCR) l'ADN-c néo-synthétisé en utilisant 2 amorces, les amorces poly-T ayant servi à la rétro-transcription et une série d'amorces "aléatoires" arbitrairement choisies. Cette PCR est réalisée avec des oligonucléotides marqués radioactivement. On génère ainsi une série d'amplicons qu'on sépare sur gel de polyacrylamide. On récupère ensuite les bandes d'intérêt à partir de ces gels, c'est-à-dire les bandes absentes ou présentes uniquement dans une des populations, ou celles dont l'intensité varie dans ces populations. Puis on en extrait l'ADN-c qu'on peut alors réamplifier, cloner et séquencer.

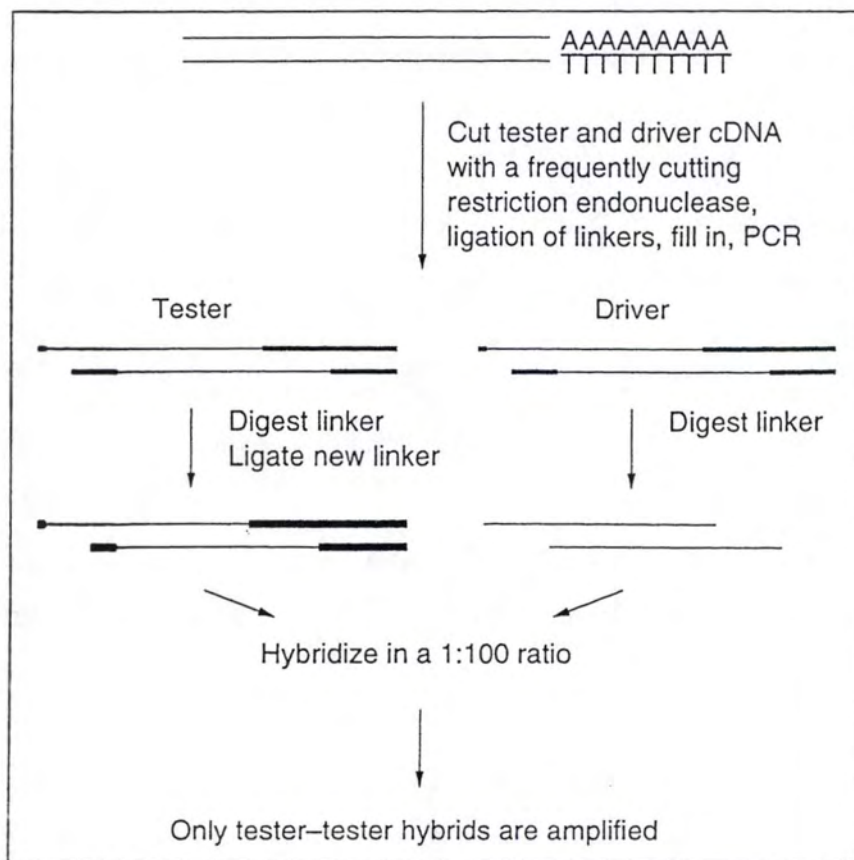
Les principaux avantages de cette technique par rapport aux techniques plus classiques et principalement par rapport à l'hybridation soustractive sont, d'une part, la possibilité de comparer plus de 2 populations cellulaires à la fois, et, d'autre part, la possibilité de visualiser une variation de l'expression de l'ordre de 10 à 15 fois, précédemment indétectable par l'hybridation soustractive. De plus, elle permet d'avoir une appréciation rapide de la quantité de transcrits différentiellement exprimés. Enfin, critère non négligeable, elle ne nécessite que peu d'ARN total de départ, de l'ordre du  $\mu\text{g}$ , voir du  $\text{ng}$ , au lieu des centaines de  $\text{ng}$  nécessaires à l'hybridation soustractive.

Toutefois, le principal inconvénient de cette technique reste toujours la présence de faux-positifs. Ainsi, malgré les différentes améliorations qui lui ont été apportées afin de diminuer leur nombre (traitement préalable de l'ARN à la DNase, augmentation de la taille des amorces, augmentation de la température d'hybridation lors de la PCR...), ceux-ci restent tout de même un inconvénient dont il faut tenir compte dans cette technique, bien qu'ils soient, notons-le, également présent dans l'hybridation soustractive.

Enfin plusieurs autres améliorations ont été apportées. Citons ainsi des recherches qui ont été effectuées afin de limiter les recoupements possibles lors de l'utilisation des amorces "aléatoires" arbitrairement choisies, ce qui entraîne qu'un même ARN-m peut être amplifié par différents couples d'amorces, et donc plusieurs fois présent sur des gels différents. Dès lors, une nouvelle approche, appelée "l'échantillonnage systématique" en opposition à "l'échantillonnage aléatoire" précédemment expliqué, a été présentée (Matz, M. et Lukyanov, S., 1998). Cette technique permet de choisir les amorces de telles sortes qu'un même ARN-m ne puisse être amplifié plus d'une seule fois, et de ce fait, plus aucun recouvrement n'est possible.

Malgré ceci, le differential display est toujours représenté comme la méthode la plus fiable pour comparer l'expression génique de plusieurs populations cellulaires, de même que pour rechercher l'expression de nouveaux gènes et de nombreuses études ont été réalisées avec succès en





**Fig. I-13 :** L'analyse différentielle représentative (RDA).  
(Kozian, D. *et al*, 1999)

utilisant cette technique. Citons comme exemple les travaux de M. Linskens et son équipe qui nous intéressent tout particulièrement puisqu'ils ont utilisé cette technique afin de rechercher des différences d'expression entre des cellules jeunes et des cellules âgées (Linskens, M. *et al*, 1995).

Outre le differential display, d'autres techniques plus récentes ont aussi été proposées pour l'analyse différentielle des gènes dont l'analyse différentielle représentative (RDA), l'analyse en série de l'expression des gènes (SAGE) ainsi que les microchips à ADN. Nous allons maintenant en expliquer leur principe général ainsi que leurs avantages respectifs.

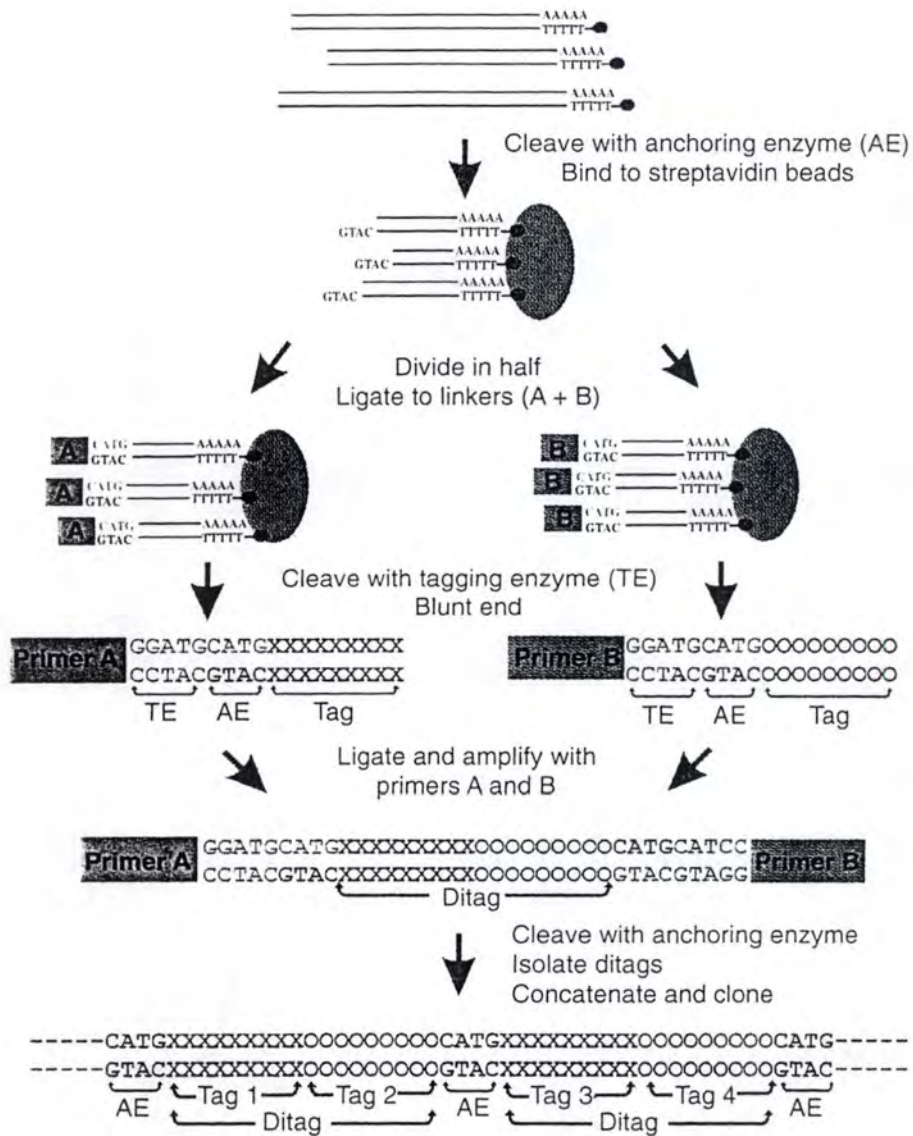
### 5.3. L'analyse différentielle représentative (RDA) (fig. I-13)

Dans cette méthode, 2 populations sont comparées, une population prise comme référence et une population-test (Lisitsyn, N. *et al*, 1993). Après avoir extrait l'ARN, on en réalise une restriction à l'aide d'une endonucléase coupant fréquemment. On ajoute ensuite des ligands aux bouts excisés puis, on remplit les vides avec une polymérase afin d'avoir une population double-brin. On amplifie ensuite le tout, puis on enlève les ligands qu'on remplace par d'autres uniquement dans la population-test. Ensuite, on met les 2 populations en contact l'une de l'autre dans un rapport de 1:100 afin que tous les transcrits de la population-test identiques à ceux de la population de référence s'hybrident bien avec leurs homologues de l'autre population, puis on réamplifie uniquement les homoduplexes de la population-test en utilisant comme amorces les séquences des ligands.

Le principal avantage de cette technique est qu'elle permet l'amplification de transcrits rarement exprimés et donc la détection de ceux-ci.

Tout comme le differential display, la RDA a été utilisée avec succès dans plusieurs études et a par exemple permis de mettre en évidence des





gènes exprimés de façon différentielle lors du développement, de pathologies et de stimulations aux facteurs de croissance.

#### 5.4. La technique SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) (fig.I-14)

Cette technique, assez complexe dans sa mise en œuvre, permet de mettre en évidence les gènes exprimés dans une cellule, dans une condition donnée et ce, de manière aussi bien quantitative que qualitative (Velculescu, V. *et al*, 1995). De plus, elle permet de comparer l'expression de gènes sous différentes conditions données. Le principe de base de cette technique se fonde sur le présupposé suivant : une séquence nucléotidique d'environ 9 pb (*sequence tag*), située à un endroit précis dans la séquence du transcrit est assez spécifique que pour différencier entre eux  $4^9$ , soit 262 144 transcrits différents, ce qui semble bien au-delà de la limite du nombre de gènes exprimés dans une cellule à un moment donné. Le principe de l'isolement de ce *sequence tag* spécifique donc de chaque gène est le suivant :

- tout d'abord la population d'ARN-m extraits de la population cellulaire à étudier est rétro-transcrite en ADN-c double-brin à l'aide d'amorces poly-T biotinylées. Ces ADN-c sont ensuite mis en présence d'une enzyme de restriction (*anchoring enzyme*), choisie pour sa capacité à couper relativement fréquemment l'ADN (ceci afin de s'assurer que chaque transcrit soit au moins clivé une fois), et sont ainsi clivés.

- ensuite, on isole les ADN-c via leur extrémité 3' en les mettant en présence de billes de streptavidine. Ainsi, on récupère tous les transcrits qui ont été clivés au site le plus proche de leur extrémité 3'. Ces ADN-c sont ensuite séparés en 2 populations en fonction desquelles on leur lie (côté 5') un type spécifique de ligand (A ou B). Ces ligands ont la caractéristique de contenir eux-mêmes un site de restriction pour une enzyme de type IIS ( *tagged enzyme*), ce type



d'enzyme ayant la particularité de couper à bouts francs un nombre de bases fixes après avoir reconnu leur site de restriction.

- on met en présence les ADN-c couplés à leur ligand et les enzymes de type IIS et on obtient ainsi de l'ADN composé d'un ligand, de 2 sites de restriction (un pour la *tagged enzyme*, puis un autre pour l'*anchoring enzyme*) et d'une suite de plus ou moins 10 pb spécifique du transcrit.

- après cette étape, ces ADN-c sont liés deux à deux formant ainsi des dimères appelés *ditag* par combinaison aléatoire. Ces *ditag* peuvent ensuite être de nouveau clivés par l'*anchoring enzyme* et associés par dizaines puis cloner dans des vecteurs qui serviront au séquençage. Ensuite, une recherche dans les banques de données peut commencer et permettre de trouver les gènes correspondants.

## 5.5. Les micro-damiers à ADN (DNA microarray)

Ici, les micro-damiers à ADN sont réalisés en utilisant comme trappeurs des produits de PCR, de l'ADN-c ou encore de l'ADN cloné qu'on va ensuite lier à un support solide comme des filtres de nylon, des supports en verre ou en silicone (Schena, M. *et al*, 1995). Ensuite, on extrait l'ARN d'une population donnée qu'on met en contact avec le micro-damier. Si les séquences sont complémentaires, il y a hybridation, puis, il peut y avoir révélation suivant différentes techniques comme l'utilisation de sondes fluorescentes, etc.

Ainsi, certaines firmes commercialisent des micro-damiers portant des oligonucléotides de séquence homologue à celle de par exemple 10.000 gènes, tous ces gènes peuvent donc être testés en une seule expérience. Le grand avantage de cette technique est qu'elle permet une analyse directe et rapide des résultats. Beaucoup d'études sont encore réalisées afin d'améliorer la sensibilité de la révélation ainsi que l'adhésion des trappeurs au support.

En conclusion, on peut ainsi voir qu'il existe une série de méthodes permettant d'analyser les différences d'expression des gènes. Chaque technique ayant ses propres avantages et inconvénients. C'est donc à l'utilisateur d'effectuer un choix en fonction de ses besoins et des caractéristiques de son expérience.



*But du travail*

Comme nous venons de le présenter, les stress répétés sublétaux induisent à long terme un phénotype proche du vieillissement cellulaire *in vitro*, nous en avons pour preuve la présence de biomarqueurs du vieillissement chez les cellules soumises à ces stress.

Dès lors, on est en mesure de se demander quels sont les mécanismes moléculaires impliqués dans ce vieillissement accéléré *in vitro*.

Une première façon d'y arriver consiste à rechercher des gènes dont l'expression varie lors de stress répétés au t-BHP ou à l'éthanol et lors de la sénescence. Et c'est dans le cadre de cette recherche de gènes communs à ces 2 conditions que s'inscrit notre travail.

Le but de ce travail étant de retrouver des gènes dont l'expression varie de pair chez les cellules stressées et les cellules sénescents, d'en identifier la fonction et de rechercher un lien entre leur variation d'expression chez ces 2 types de cellules. Ce qui nous permettrait ainsi de trouver des gènes communs au vieillissement cellulaire accéléré *in vitro* et au vieillissement cellulaire normal.

Pour cela, nous avons choisi d'utiliser la technique du differential display qui permet de comparer l'expression génique entre plusieurs populations cellulaires et qui nous semblait la plus appropriée dans le cadre de ce travail.



*Matériels*  
*et*  
*Méthodes*

# 1. Culture cellulaire

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé des fibroblastes de la souche WI-38, à savoir des fibroblastes pulmonaires foetaux d'origine humaine. Ces cellules proviennent de l'American Type Culture Collection, U.S.A. Elles ont été initialement mises en culture par Hayflick. (Hayflick L., 1961)

## 1.a. Matériel

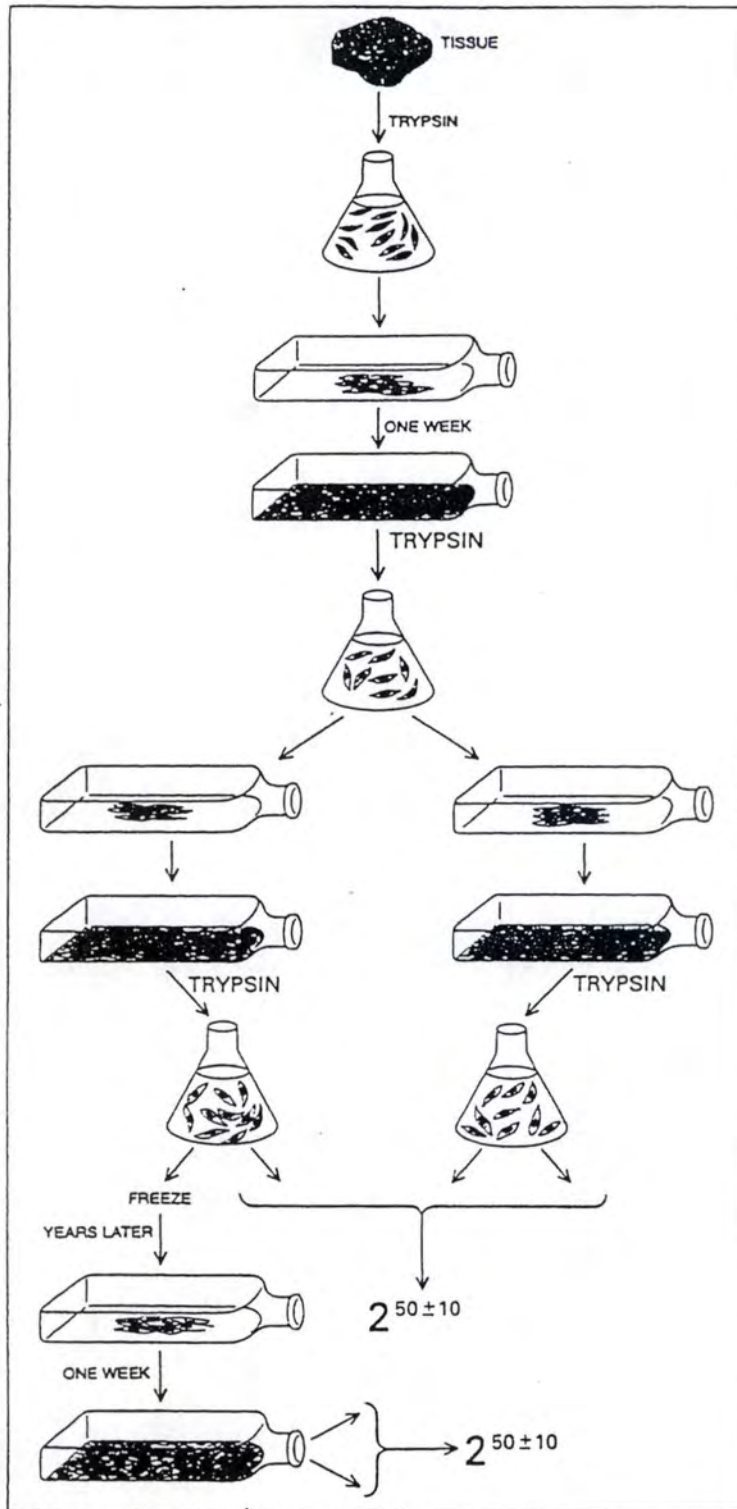
- BME : Milieu Basal de Eagle  
(Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- BME + 10 % FBS : Milieu BME additionné de 10 % de sérum de veau foetal (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- BME + DMSO 10 % : Milieu BME additionné de 10 % de Diméthylsulfoxyde. Le DMSO est un agent cryoprotecteur utilisé lors de la congélation des cellules (Acros Chimica, Geel, Belgique)
- Milieu de rinçage : Milieu BME seul
- Trypsine : Trypsine à 0,25 % dans un tampon Tris (0,4 g/l KCl; 2,2 g/l NaHCO<sub>3</sub>; 6,8 g/l NaCl; 1,0 g/l glucose; 0,5 mg/l rouge de phénol)  
(Gibco BRL, Paisley, Grande -Bretagne)
- Boîtes de culture stériles de 25 cm<sup>2</sup> (T25) ou 75 cm<sup>2</sup> (T75)  
(Corning, Cambridge, U.S.A.)

## 1.b. Méthode

### 1.b.1. Repiquage des cellules (fig. II-1)

Les cellules sont maintenues en culture selon la méthode classique décrite par Hayflick. (Hayflick L., 1965)





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

Elles sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> (T75). Quand elles sont à confluence, soit quand elles ont atteint la densité moyenne de 40.000 cellules par cm<sup>2</sup>, elles sont repiquées dans des conditions stériles.

La première étape de ce repiquage consiste à rincer les cellules à l'aide de milieu de rinçage pour retirer le sérum, contenant des protéases, qui inhibe l'action de la trypsine.

Ensuite, 2 ml de trypsine sont versés par T75. Lorsque l'arrondissement des cellules commence à être visible au microscope à contraste de phase, ce qui correspond à un temps d'action d'environ 1 minute, l'excédent de trypsine est décanté et les cellules sont incubées à 37 °C, la température optimale d'action de la trypsine, durant une dizaine de minutes. En fin d'incubation, le détachement des cellules est contrôlé au microscope et 10 ml de milieu BME + 10 % FBS sont ajoutés par T75.

A ce stade, les agrégats cellulaires sont rompus à l'aide d'une pipette Pasteur. Ainsi homogénéisé, le milieu contenant les cellules détachées est réparti en 2 ou 4 nouvelles T75 auxquelles du milieu BME + 10 % FBS sera ajouté pour arriver à un volume total de 15 ml par T75.

Enfin, les boîtes de culture sont entrouvertes et placées dans une étuve diffusant de l'air chargé de 5 % de CO<sub>2</sub>, afin d'ajuster le pH du milieu de culture.

### 1.b.2. Congélation des cellules

Afin de conserver des cellules à un stade donné de leur développement, elles sont congelées dans de l'azote liquide.

Pour cela, les cellules sont rincées et trypsinisées comme cela vient d'être décrit pour le repiquage. Ensuite, une centrifugation est réalisée à 1000 rpm durant 10 min (centrifugeuse Hettich Universal, Tuttlingen, Allemagne).

Les cellules sont resuspendues dans 0,8 ml de BME + 20 % FBS + 5 % DMSO et transférées dans un cryotube (Nunc, Roskilde, Danemark).

La congélation se déroule en 2 étapes :

. La température est d'abord descendue progressivement à -70 °C. Pour ce faire, le cryotube est placé dans 2 tubes (10 ml (Becton Dickinson, Cowley, Grande-Bretagne) et 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne)) fermés hermétiquement, qui sont plongés dans une bouteille d'éthanol absolu à température ambiante. La bouteille est alors placée dans un congélateur à -70 °C.

. Après minimum 12 heures, le cryotube est plongé dans de l'azote liquide à -196 °C.

### 1.b.3. Décongélation des cellules

Pour décongeler des cellules conservées dans l'azote liquide, le cryotube est immédiatement plongé dans un bain à 37 °C, ceci afin de décongeler les cellules le plus vite possible.

Ensuite les cellules sont centrifugées à 1000 rpm pendant 10 min. Le culot de cellules ainsi obtenu est resuspendu dans du BME + 10 % FBS avant d'être transféré dans une nouvelle boîte de culture.

Le lendemain, le milieu de culture des cellules est renouvelé afin d'éliminer toute trace de DMSO, toxique pour les cellules.

## **2. Etude de l'effet des stress sur la cytotoxicité et le biomarqueur du vieillissement SA $\beta$ -gal**

### **2.1. Stress successifs**

#### 2.1.a. Matériel

- BME      Milieu Basal de Eagle (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)

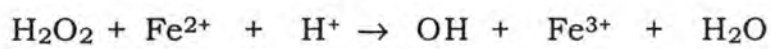
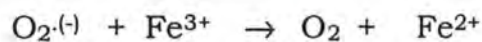


- BME + 10 % FBS                      Milieu BME additionné de 10 % de sérum de veau foetal.  
(Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- *Tert*-butylhydroperoxyde              (Merck, Darmstad, Allemagne)
- Ethanol absolu                          (Merck, Darmstad, Allemagne)
- Boîtes de culture stériles de 25 cm<sup>2</sup> (T25) (Corning, Cambridge, U.S.A.)

### 2.1.b. Description des stress

#### - modèle de stress oxydatif au *tert*-butylhydroperoxyde

Le *tert*-butylhydroperoxyde est un hydroperoxyde organique amphiphile qui pénètre facilement à travers les membranes biologiques. Dans le cytoplasme, il génère des radicaux hydroxyles par interaction avec des métaux de transition, classiquement le fer, dans une réaction similaire à celle de Fenton :



Les radicaux hydroxyles sont capables d'initier la peroxydation lipidique. Il s'ensuit une augmentation de la perméabilité membranaire, mais également du taux de calcium dans divers compartiments cellulaires, certaines altérations chromosomiques, ainsi qu'une inhibition de la synthèse de l'ADN et de la mitose.

#### - modèle de stress à l'éthanol

L'éthanol est un alcool à courte chaîne carbonée, ce qui lui permet de pénétrer dans la double couche lipidique des membranes cellulaires, ce qui augmente leur fluidité. De plus, l'éthanol étant un solvant organique, entraîne une déstabilisation des membranes biologiques. L'éthanol induit des variations de la structure et l'organisation des phospholipides et de leurs acides gras et donc de la membrane plasmique. Notons que chez les hépatocytes, qui, à la différence des fibroblastes possède le cytochrome p450, l'éthanol engendre lors de sa dégradation des radicaux libres.

### 2.1.c. Méthode

Les cellules sont repiquées dans des boîtes de culture de 25 cm<sup>2</sup> en présence de BME + 10 % FBS. Lorsqu'elles arrivent à confluence (40.000 cellules par cm<sup>2</sup>), elles sont soumises à une série de 5 stress successifs à raison d'un stress par jour au t-BHP (stress oxydatif) ou à l'éthanol (stress osmotique).

Pour cela, le milieu de culture des cellules est remplacé par 5 ml de milieu BME + 10 % FBS additionné de la molécule stressante à la concentration de 20,25 ou 30 µM pour le t-BHP et de 4 % ou 5 % pour l'éthanol, et ce pendant 1 heure pour le t-BHP et 2 heures pour l'éthanol.

Un contrôle est également réalisé. Dans celui-ci, le milieu des cellules est remplacé quotidiennement durant 1 heure par du milieu BME + 10 % FBS sans molécule stressante.

Après le stress, les cellules sont rincées deux fois avec 5 ml de BME seul, puis replacées dans 5 ml de milieu BME + 10 % FBS. Après la série des 5 stress successifs, nous laissons « récupérer » les cellules durant 3 jours dans du milieu BME + 10 % FBS afin de discriminer les réponses à court et à long terme aux stress.

## **2.2. Mesure de la cytotoxicité par dosage des protéines**

### 2.2.a. Matériel

- Tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) : constitué d'un tampon phosphate 10 mM à pH 7.4 contenant 0,9 % de NaCl
- Hydroxyde de sodium 0,5 N (Merck, Darmstad, Allemagne)
- *Mixture alcaline* :
  - 2 % carbonate de sodium (Merck, Darmstad, Allemagne)
  - 0,01 % sulfate de cuivre (Merck, Darmstad, Allemagne)
  - 0,02 % tartrate de sodium/potassium (Merck, Darmstad, Allemagne)
- Réactif phénol de Folin-Ciocalteu (Sigma, St-Louis, U.S.A.)



### 2.2.b. Méthode

Trois jours après le dernier stress, les protéines cellulaires sont dosées par la méthode de Lowry (Lowry, O.H. *et al*, 1951). Cette méthode se base sur le principe qu'une fois dénaturées au NaOH, les protéines exposent leurs groupements aux réactifs. Les ions cuivriques de la solution alcaline utilisée pour le dosage forment un complexe bleu avec les liaisons peptidiques, tandis que le complexe phosphomolybdique-phosphotungstique du réactif de Folin est réduit par les résidus tyrosine et tryptophane des protéines. L'intensité de la coloration bleue est lue à 660 nm au spectrophotomètre (Uvikon 940, Kontron, Eching, Allemagne) et est proportionnelle à la quantité de protéines présente.

Les cellules sont tout d'abord rincées 2 fois au PBS, puis les protéines sont dénaturées en ajoutant 5 ml de NaOH 0,5 N par boîte de culture pendant 30 min.

Les protéines cellulaires sont homogénéisées puis aliquotées en 3 fractions de 400 µl/boîte de culture. Un blanc (NaOH 0,5N) ainsi qu'un étalon constitué d'albumine de sérum bovin (Bio-Rad, Munich, Allemagne) diluée à 100 µg/ml dans du NaOH 0,5N sont également préparés.

A chaque fraction, 2 ml de mixture alcaline sont ajoutés, puis incubés 15 min. Ensuite, 200 µl de réactif de Folin dilué 2 x sont ajoutés aux tubes qui sont immédiatement agités.

La densité optique (D.O.) peut ensuite être lue au spectrophotomètre à 660 nm après 30 min de réaction.

## **2.3. Etude du biomarqueur du vieillissement $\beta$ -galactosidase**

### 2.3.a. Matériel

- Tampon PBS : constitué d'un tampon phosphate 10 mM à pH 7.4 contenant 0,9 % de NaCl



- *Solution de fixation:*

- Formaldéhyde 2 % (Belgolabo, Overijse, Belgique)
- Glutaraldéhyde 0,2 % (Fluka, Buchs, Suisse)

- *Solution de coloration:*

- Tampon acide citrique/hydrogénophosphate de sodium 40 mM, pH 6,0  
(Merck, Darmstad, Allemagne)
- Ferrocyanure de potassium 5 mM (Merck, Darmstad, Allemagne)
- Ferricyanure de potassium 5 mM (Merck, Darmstad, Allemagne)
- Chlorure de sodium 150 mM (Merck, Darmstad, Allemagne)
- Chlorure de magnésium 2 mM (Merck, Darmstad, Allemagne)
- 1 mg par ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside (x-gal)  
(Sigma, St-Louis, U.S.A.). Solution stock à 20 mg/ml dilué dans du  
N,N'-diméthylformamide (Sigma, St-Louis, U.S.A.) conservée à -20 °C.
- Méthanol (Acros organics, Geel, Belgium)
- Boîtes de Pétri stériles de 6 cm de diamètre  
(Becton Dickinson, Cowley, Grande-Bretagne)

### 2.3.b. Méthode

Le lendemain du dernier stress (et le jour du premier stress pour les cellules non stressées (jo)), les cellules sont repiquées à faible densité (700 cellules/cm<sup>2</sup>). Le milieu de culture est retiré et les cellules sont rincées 2 fois au PBS et fixées pendant 5 minutes dans une solution de formaldéhyde 2 % et de glutaraldéhyde 0,2 % dilué dans du PBS. Une fois de plus, les cellules sont rincées 2 fois au PBS, puis la solution de coloration est ajoutée pour la détection de l'activité SA  $\beta$ -gal. L'incubation se déroule à 37 °C en l'absence de CO<sub>2</sub> durant 12 à 16 heures pour une coloration optimale. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois au PBS, puis 2 fois au méthanol et enfin séchées à température ambiante. On peut dès lors déterminer la proportion de cellules colorées par rapport aux cellules non colorées au microscope optique. La coloration se concentre dans la région périnucléaire et est plus ou moins diffuse dans le cytosol.

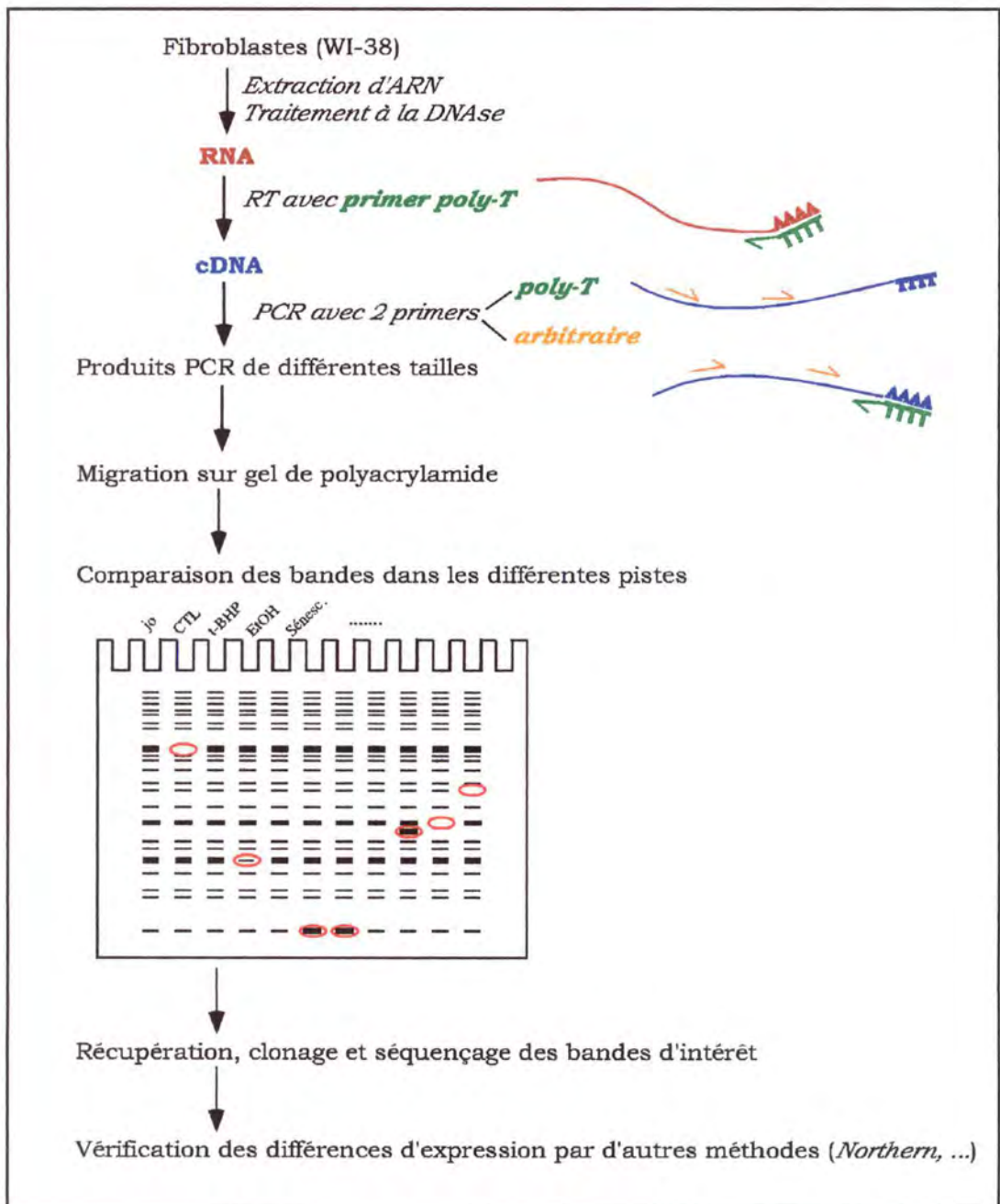


Fig. II-2 : Représentation schématique des différentes étapes du differential display.







**Fig. II-3** : Représentation schématique d'une série de 5 stress répétés au t-BHP ou à l'éthanol reprenant les jours de stress, de récupération et d'extraction.

terme de celle à long terme. Le milieu de culture est changé lors du 2<sup>ème</sup> jour de récupération, soit la veille de l'extraction de l'ARN.

### **3.2. Extraction d'ARN total de cultures cellulaires**

Cette étape constitue l'étape la plus importante mais aussi la plus délicate de tout le protocole. En effet, il est d'une importance cruciale pour la suite des étapes d'obtenir de l'ARN de très bonne qualité. Or, ceci est rendu particulièrement difficile de part 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 de latex.

#### **3.2.a. Matériel**

- Kit RNAgents® Total RNA Isolation System (Promega, Madison, USA)  
comprenant :- Solution de dénaturation (Thiocyanate de guanidine et tampon citrate/sarcosine/ $\beta$ -mercaptoéthanol)
  - Acétate de sodium 2M, pH 4,0
  - Phenol : chloroforme : alcool isoamylique en proportions 125 : 24 : 1, tamponné avec 42 mM de citrate de sodium, pH 4,3-4,7
  - Isopropanol
  - Eau sans nuclease
- Ethanol absolu (Merck, Darmstad, Allemagne)
- Centrifugeuse utilisée pour les microtubes (Biofuge Sartorius, Heraeus Instruments, Denver, USA)



### 3.2.b. Méthode

Le milieu de culture des cellules est entièrement décanté. La lyse des cellules se réalise avec 400 µl de tampon de lyse par boîte de culture (T75). Le volume obtenu est mesuré et réparti dans 2 microtubes. Chaque microtube est additionné de 1/10<sup>ème</sup> du volume d'acétate de Na 2M à pH 4.0, puis légèrement agité. Un volume de phenol : chloroforme : alcool isoamylique est ensuite ajouté, et le tout est mélangé vigoureusement avant d'être incubé 15 min sur glace. Une centrifugation est ensuite réalisée à 13.000 rpm pendant 20 min à 4 °C. La phase aqueuse est alors récupérée délicatement et transférée dans un nouveau microtube. Un volume d'isopropanol y est alors 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 13.000 rpm pendant 10 min à 4 °C. Le culot obtenu est ensuite lavé avec 1 ml d'éthanol 75 % refroidi à 4 °C, il s'en suit une nouvelle centrifugation de 10 min à 13.000 rpm à 4 °C. Après séchage, le culot d'ARN est resuspendu dans 20 µl d'eau distillée RNase free. Une fraction de 1 µl est prélevée, avant congélation à -70 °C, pour le dosage de l'ARN au spectrophotomètre. La concentration d'ARN est déterminée par mesure de la densité optique à 260 nm (1 D.O. équivaut à 40 µg/ml d'ARN). L'absorbance est également mesurée à 230 et 280 nm. Le rapport  $A_{260}/A_{280}$  donne une indication de la pureté de l'ARN, selon le matériel de départ et la procédure suivie, il se situe entre 1,7 et 2,0. Le rapport  $A_{260}/A_{230}$  doit lui se situer entre 1,5 et 2,0. S'il est faible, c'est le signe d'une contamination au thiocyanate de guanidine.

### **3.3. Traitement des échantillons avec la DNase I RNase-free**

Cette étape a été ajoutée lors des améliorations apportées au protocole initial de differential display afin de limiter au maximum la présence de faux-positifs (Liang et Pardee, 1995). Un traitement

supplémentaire à la DNase est réalisé afin d'éliminer toute trace d'ADN génomique qui est la cause la plus importante de faux-positifs.

### 3.3.a. Matériel

- Tampon 10 x pour DNase I (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- DNase I amplification grade (1 u/ $\mu$ l)  
(Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- EDTA 25 mM (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- RNAsine (40 u/ $\mu$ l) (Promega, Madison, U.S.A.)
- Phenol : chloroforme : alcool isoamylique (125:24:1), tamponné avec 42 mM de citrate de sodium, pH 4,3-4,7  
(Promega, Madison, U.S.A.)
- Acétate de sodium 2M, pH 4,0 (Promega, Madison, U.S.A.)
- Ethanol absolu (Merck, Darmstad, Allemagne)

### 3.3.b. Méthode

Chaque échantillon est composé de : - 10  $\mu$ g d'ARN total  
- 20 u de RNAsine  
- 5 u de DNase I

- Tampon pour DNase I : - 20 mM Tris-HCl, pH 8,4  
- 2 mM MgCl<sub>2</sub>  
- 50 mM KCl

- eau distillée sans nucléase

Les échantillons sont incubés 15 min à température ambiante.

250  $\mu$ M d'EDTA y sont alors ajoutés, puis ils sont incubés 10 min à 65 °C pour arrêter la réaction enzymatique.

L'ARN est ensuite récupéré par extraction au phénol : chloroforme : alcool isoamylique suivie d'une précipitation à l'éthanol comme cela a été décrit au point 3.2.b consacré à l'extraction de l'ARN à partir de cultures cellulaires.

N°	Nom	Séquence	Nbre bp	Tm (°C)*
<i>Primers poly-T</i>				
1	<b>TVA</b>	CGGCTGCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTVA	27	68
2	<b>TVT</b>	CGGCTGCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTVT	27	68
3	<b>TVC</b>	CGGCTGCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTVC	27	70
4	<b>TVG</b>	CGGCTGCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTVG	27	70

Fig II-4: Amorces poly-T utilisées lors de la RT et de la PCR.



### **3.4. Transcription inverse (RT)**

Cette étape va nous permettre de synthétiser de l'ADN complémentaire (ADN-c) à partir de l'ARN extrait. Pour cela, nous allons utiliser des amorces poly-T (fig. II-4) qui vont s'hybrider à la queue poly-A des ARN-m. Afin de réaliser une première subdivision des ARN-m, nous allons utiliser 4 amorces : dT<sub>16</sub>VA, dT<sub>16</sub>VT, dT<sub>16</sub>VC et dT<sub>16</sub>VG où V correspond à une base dégénérée (A, C ou G). C'est au niveau de la dernière base que se fera la répartition des ADN-c en 4 sous-populations.

#### **3.4.a. Matériel**

- Superscript™ RNase H Reverse Transcriptase (200 u/μl)  
(Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- Tampon 5x pour Superscript™ RNase H Reverse Transcriptase:  
(Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- Dithiothréitol (DTT) 0,1M (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- dNTP 250 μM (Eurogentec, Liège, Belgique)
- Amorce poly-T 10 μM (Eurogentec, Liège, Belgique)
- ARN total traité à la DNase

#### **3.4.b. Méthode**

Chaque échantillon est composé de :

- 0,4 μg d' ARN total traité à la DNase
- Tampon pour Reverse Transcriptase: - 25 mM tris-HCl, pH 8,3
  - 37,5 mM KCl
  - 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
  
- DTT 10 mM
- dNTP 20 μM
- Amorce poly-T 1 μM
- eau distillée sans nucléase

N°	Nom	Séquence	Nbre bp	Tm (°C)*	% GC
<i>Primers arbitrairement choisis</i>					
1	<b>DDF 1</b>	CGACAATGCTGGACTGACACACG	23	72	57
2	<b>DDF 2</b>	ATTGAGACTGAGGTGAACATTAGC	24	68	42
3	<b>DDF 3</b>	GAGATAGACACATAGATACGAGC	23	66	43
4	<b>DDF 10</b>	CTCACTACGGCTCGCTACTCG	21	68	62
5	<b>DDF 11</b>	GCTGTGCGAAGTGACCATCCTCC	23	74	61
6	<b>DDF 12</b>	GTAGTCTAAGCGTTGGAGTTCA	22	64	45
7	<b>DDF 13</b>	CTACCTTTGCCGAGCCAGTTA	21	64	52
8	<b>DDF 14</b>	CTTCGGTTGTTACGGATGC	19	58	53
9	<b>DDF 15</b>	GGGGCTAATCTGCTTCGGT	19	60	58
10	<b>DDF 16</b>	ATCTGAGGTACTGTCCGC	18	56	56
11	<b>DDF 17</b>	GCCTCATCCTGTAGACTAGCTG	22	68	55
12	<b>DDF 18</b>	CTGCTAGATGGATGTGTACG	20	60	50
13	<b>DDF 19</b>	GCATGGCGGCTCCTGGACTA	20	66	65
14	<b>DDF 20</b>	AAGTCAGGGTCTATCAAGCG	20	60	50
15	<b>DDF 21</b>	TGATGCTACTGTAACCTGATGCG	23	68	48

Fig II-5: Liste des amorces aléatoires utilisées .

Les échantillons sont tout d'abord incubés 5 min à 65 °C pour dénaturer l'ARN, puis placés dans un bain à 37 °C. Après 10 min, ils sont supplémentés de 400 u de Reverse Transcriptase. La transcription inverse proprement dite se déroule durant 50 min à 37 °C. En fin d'incubation, les échantillons sont placés 5 min à 95 °C pour désactiver l'enzyme, puis mis directement sur glace et congelés à -20 °C.

### **3.5. Réaction de Polymérisation en chaîne (PCR)**

Lors de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), nous allons amplifier les ADN-c néo-synthétisés.

#### - choix des amorces

Nous allons utiliser 2 types d'amorces. Tout d'abord l'amorce poly-T ayant servi à la transcription inverse, ensuite une amorce arbitraire (fig. II-5) aléatoirement choisie qui doit toutefois répondre à une série de critères :

- sa séquence doit avoir été choisie "au hasard" afin de disposer d'une série d'amorces bien différentes permettant d'amplifier un maximum d'ADN-c.

- sa séquence doit être composée de 50 à 70 % de bases G-C.

- il ne doit pas exister de possibilité d'hybridation au sein d'une même séquence d'amorce (pas de formation de "hairpin").

- la température de melting des amorces arbitrairement choisies doit être proche de celle des amorces poly-T.

#### - choix de la polymérase

Nous avons choisi l'AmpliTaq Gold Polymerase (Perkin Elmer, Foster City, U.S.A.) qui a été décrite comme l'enzyme convenant avec le plus de succès pour le differential display (Liang, P. et Pardee, A., 1995).



### - choix de l'isotope

Notre choix s'est porté sur l'isotope  $^{33}\text{P}$  étant donné qu'il est reconnu pour allier la sensibilité du  $^{32}\text{P}$  et la résolution du  $^{35}\text{S}$  tout en ayant des avantages pratiques puisque sa manipulation ne requière pas d'écrans de protection comme c'est le cas pour le  $^{32}\text{P}$ .

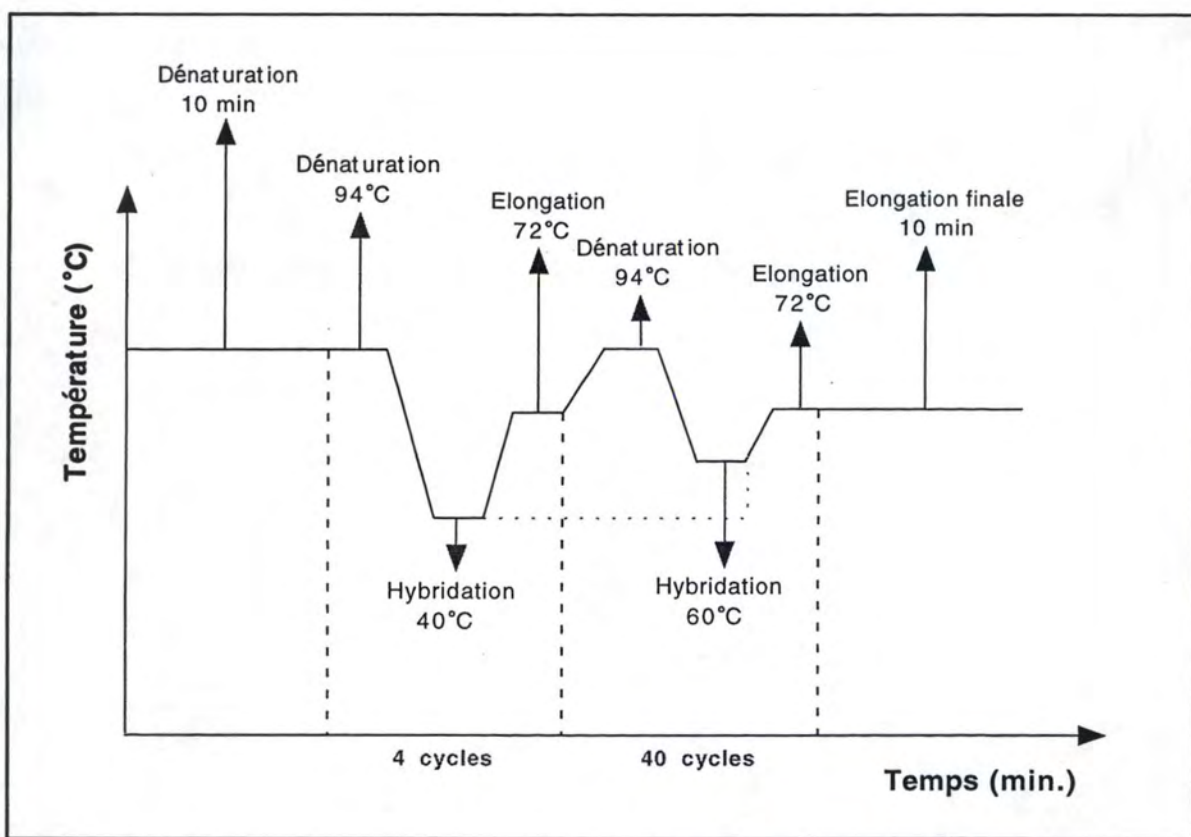
### 3.5.a. Matériel

- AmpliTaq Gold Polymerase (5 u/ $\mu\text{l}$ ) (Perkin Elmer, Foster City, U.S.A.)
- Tampon pour l'AmpliTaq Gold Polymerase 10x  
(Perkin Elmer, Foster City, U.S.A.)
- Chlorure de magnésium 25mM (Perkin Elmer, Foster City, U.S.A.)
- dNTP 250  $\mu\text{M}$  (Eurogentec, Liège, Belgique)
- dATP [ $\alpha$ - $^{33}\text{P}$ ] (Nen, Boston, U.S.A.)
- Amorce arbitraire 10  $\mu\text{M}$  (Eurogentec, Liège, Belgique)
- Amorce poly-T 10  $\mu\text{M}$  (Eurogentec, Liège, Belgique)

### 3.5.b. Méthode

Chaque échantillon est composé de :

- 2  $\mu\text{l}$  ADN-c
- 1 u Taq Polymérase
- Tampon pour la Taq polymérase : - 15 mM Tris-HCl, pH 8,0  
- 50 mM KCl
- 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$
- 20  $\mu\text{M}$  dNTP
- 250 nM amorce arbitraire
- 1  $\mu\text{M}$  amorce poly-T
- 1  $\mu\text{Ci}$  dATP [ $\alpha$ - $^{33}\text{P}$ ]
- eau distillée



**Fig II-6:** Représentation des cycles de température utilisés lors de la PCR

Les conditions de PCR sont les suivantes (fig. II-6) :

- . 10 min à 94 °C pour activer l'AmpliTa<sub>q</sub> Gold Polymerase
- . 4 cycles avec une faible (40 °C) température d'hybridation pour permettre à l'amorce arbitraire de s'hybrider à l'ADN-c de manière peu spécifique. C'est au cours de cette étape que des fragments d'ADN-c de tailles différentes vont être générés.
- . 40 cycles "classiques" pour amplifier les fragments générés au cours des 4 cycles précédants
- . 72 °C pendant 10 min pour que la polymérase termine l'élongation des fragments amplifiés.

### **3.6. Gel de Polyacrylamide 6 %**

#### **3.6.1. Préparation du gel**

##### 3.6.1.a. Matériel

- Acrylamide (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- N-N'-méthylènebisacrylamide (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- TBE 10x (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- Ammonium persulfate (APS) (Boehringer, Mannheim, Allemagne)
- N,N,N',N'-tetra-méthyl-éthylènediamine (TEMED)  
(Biorad, Munich, Allemagne)
- Diméthylchlorosilane (Fluka, Buchs, Suisse)

##### 3.6.1.b. Méthode

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 après la migration.

La composition du gel de polyacrylamide est la suivante :

- 6 % d'acrylamide : N-N'-méthylènebisacrylamide (38:2)



- Tampon TBE :
  - 0,1 M Tris-HCl, pH 8,4
  - 0,9 M Acide borique
  - 0,01 M EDTA
- Eau distillée
- 480  $\mu$ l d'ammonium persulfate (100 mg/ml) pour 100 ml de gel
- 50  $\mu$ l de TEMED pour 100 ml de gel

La polymérisation du gel s'effectue à l'horizontale et dure au moins une heure

### **3.6.2. Chargement du gel et migration des échantillons**

#### **3.6.2.a. Matériel**

- Tampon d'échantillons pour ADN:
  - Bleu de bromophénol 0,42 % (Merck, Darmstad, Allemagne)
  - Xylène cyanole 0,42 % (Sigma, St-Louis, U.S.A.)
  - Glycérol 50 % (Merck, Darmstad, Allemagne)
  - Eau distillée 49 %
- TBE 10x (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- ADN-c amplifié par PCR
- Cuves d'électrophorèse pour gels de séquençage (modèle S2)  
Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)

#### **3.6.2.b. Méthode**

Le tampon utilisé lors de l'électrophorèse est du TBE 1x (0,1 M Tris-HCl, pH 8,4 ; 0,9 M Acide borique ; 0,01 M EDTA). Un pré-run de 30 min à 1100 volts est réalisé avant chargement des échantillons sur le gel. Ceux-ci sont supplémentés par 10 % de tampon d'échantillons pour ADN. 4  $\mu$ l d'échantillon sont chargés par puits du gel. La migration s'effectue à 1100 V, et dure 2 heures.

### **3.6.3. Démoulage du gel**

#### 3.6.3.a. Matériel

- Papier Whatman (Whatman, Kent, Grande-Bretagne)
- Film Biomax MR (Kodak, New Haven, U.S.A.)
- Cassettes pour autoradiographie (RPN 1645)  
(Amersham, Crewe, Royaume-Uni)

#### 3.6.3.b. Méthode

Une fois la migration réalisée, il faut démouler le gel. Cette étape est très délicate étant donné que l'épaisseur du gel est seulement de 0,4 mm. Le gel est adsorbé sur une feuille de papier Whatman avant d'être séché 1 heure à 80 °C. Une fois le séchage terminé, le gel est mis en contact avec un film Biomax. L'autoradiographie se déroule 2 jours à température ambiante.

### **3.6.4. Développement du film**

#### 3.6.4.a. Matériel

- Solution de révélation (Ilford, Mobberley, Grande-Bretagne)
- Solution de fixation (Ilford, Mobberley, Grande-Bretagne)

#### 3.6.4.b. Méthode

En chambre noire, le film est développé par passage, successivement, 30 sec dans la solution de révélation (diluée 5x), quelques minutes dans l'eau de ville afin de le rincer puis, 3 min dans la solution de fixation (diluée 5x).

Le film est ensuite rincé à l'eau et séché complètement à température ambiante.

### **3.7. Récupération des bandes d'intérêt**

#### **3.7.1. Excision des bandes et récupération de l'ADN**

L'analyse du film permet de repérer les bandes intéressantes dans le cadre de notre travail. C'est-à-dire les bandes dont l'intensité diffère dans au moins une situation par rapport aux autres. L'intensité de la bande étant proportionnelle à la quantité de transcrit présent dans les cellules au moment de l'extraction de l'ARN.

Les bandes d'intérêt sont découpées du gel au moyen d'une lame propre, renouvelée pour chaque bande. Cette opération est réalisée par juxtaposition du film d'autoradiographie sur le gel sec. L'ADN est élué par immersion de la bande dans 30  $\mu$ l d'eau distillée. L'éluion se déroule durant minimum 30 min à température ambiante, avec agitation.

#### **3.7.2. Amplification de l'ADN récupéré des bandes d'intérêt**

Une fois l'ADN remis en suspension dans l'eau, on peut l'amplifier par PCR en réutilisant les mêmes amorces que celles qui nous ont permis de mettre cette bande en évidence.

##### **3.7.2.a. Matériel.**

- AmpliTaq Gold Polymerase (5 u/ $\mu$ l) (Perkin Elmer, Foster City, U.S.A.)
- Tampon pour la Taq Polymérase 10x (Perkin Elmer, Foster City, U.S.A.)
- Chlorure de magnésium 25mM (Perkin Elmer, Foster City, U.S.A.)
- dNTP 250  $\mu$ M (Eurogentec, Liège, Belgique)
- Amorces arbitraires 10  $\mu$ M (Eurogentec, Liège, Belgique)
- Amorces poly-T 10  $\mu$ M (Eurogentec, Liège, Belgique)



### 3.7.2.b. Méthode

La mixture réactionnelle contient:

- 5 u AmpliTaq Gold Polymerase
- Tampon pour la Taq Polymerase
- 1,5  $\mu\text{M}$   $\text{Mg Cl}_2$
- 20  $\mu\text{M}$  dNTP
- 10  $\mu\text{l}$  d'ADN matrice
- 250 nM amorce arbitraire
- 1  $\mu\text{M}$  amorce poly-T
- eau distillée

Les conditions de PCR sont les suivantes :

- 94 °C pendant 10 min
- 35 cycles :
  - 94 °C pendant 30 sec
  - 60 °C pendant 1 min
  - 72 °C pendant 90 sec
- 72 °C pendant 5 min

## **3.8. Visualisation sur gel d' agarose des bandes récupérées**

Cette étape va nous permettre de vérifier la pureté de nos produits PCR et d'estimer la taille des bandes d'intérêt.

### 3.8.a. Matériel

- TBE 1x (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- Agarose (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- Bromure d'éthidium (500  $\mu\text{g/ml}$ ) (Sigma, St-Louis, U.S.A.)
- Tampon d'échantillon pour ADN
- Marker IV (Eurogentec, Liège, Belgique)

### 3.8.b. Méthode

Afin d'obtenir une séparation optimale des fragments de petite taille, un gel concentré en 2 % d'agarose est réalisé. L'agarose est dissous par chauffage dans du tampon TBE 1x. 20 µl de bromure d'éthidium sont ajoutés par 100 ml de gel. Les échantillons sont additionnés de 40 % de tampon d'échantillon pour ADN avant d'être déposés sur gel. L'étalon de poids moléculaire (marker IV) permet une estimation de la taille des produits PCR. La migration s'effectue dans du tampon TBE 1x pendant 1h30 à 55 V.

Grâce au bromure d'éthidium, qui s'intercale entre les brins d'ADN, les produits PCR peuvent être visualisés à la lumière ultraviolette (302 nm).

### **3.9. Purification de l'ADN amplifié.**

La purification de nos échantillons réamplifiés par PCR est une étape importante dans notre travail puisqu'il est nécessaire d'avoir des échantillons d'ADN purs pour l'étape de clonage qui suit. Pour cela, nous allons procéder de 2 manières. Tout d'abord, pour les échantillons qui n'ont montré qu'une seule bande sur gel d'agarose, nous allons directement purifier le produit PCR au moyen du kit High Pure PCR Product Purification (Boehringer). Les échantillons pour lesquels des bandes parasites sont visibles sur gel d'agarose sont purifiés en excisant la bande d'intérêt du gel, puis en la purifiant au moyen du kit QIAEX II (Qiagen).

### **3.9.1. Purification directe des produits PCR**

#### **3.9.1.a. Matériel**

- Kit High Pure PCR Product Purification contenant :
    - colonnes de purification en fibre de verre
    - tampon de liaison : - Tris-HCl 10 mM, pH 6,6
      - Thiocyanate de guanidine 3M
      - Ethanol 5 %
    - tampon de lavage : - Tris-HCl 10 mM, pH 7,5
      - NaCl 20 mM
      - Ethanol 80 %
- (Boehringer, Mannheim, Allemagne)

#### **3.9.1.b. Principe**

En présence d'une concentration élevée en sels, la silice a une forte affinité pour l'ADN. Dans ces conditions, l'ADN va donc être adsorbé sur les fibres de verre de la colonne de purification alors que les impuretés seront éluées par simple lavage. L'ADN purifié pourra dès lors être élué de la colonne de purification au moyen d'eau distillée.

#### **3.9.1.c. Méthode**

500 µl de tampon de liaison sont ajoutés aux 90 µl d'échantillon PCR et vortexés.

Ensuite, ce mélange est passé à travers une colonne de purification par centrifugation à 13.000 rpm durant 1 min.

La colonne est alors rincée avec 500 µl de tampon de lavage et centrifugée à 13.000 rpm durant 1 min.

Cette étape est répétée avec 200 µl de tampon de lavage.



L'ADN est ensuite récupéré avec 100 µl d'eau distillée, par centrifugation de la colonne à 13.000 rpm pendant 1 min. L'éluat, qui contient l'ADN purifié est récupéré.

### **3.9.2. Purification à partir du gel d'agarose**

#### 3.9.2.a. Matériel

- Kit d'extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose QIAEX II  
(Qiagen, Hilden, Allemagne)

#### 3.9.2.b. Principe

Ce kit se base sur l'affinité qu'a l'ADN, en présence d'une forte concentration de sels, pour des billes de silicone.

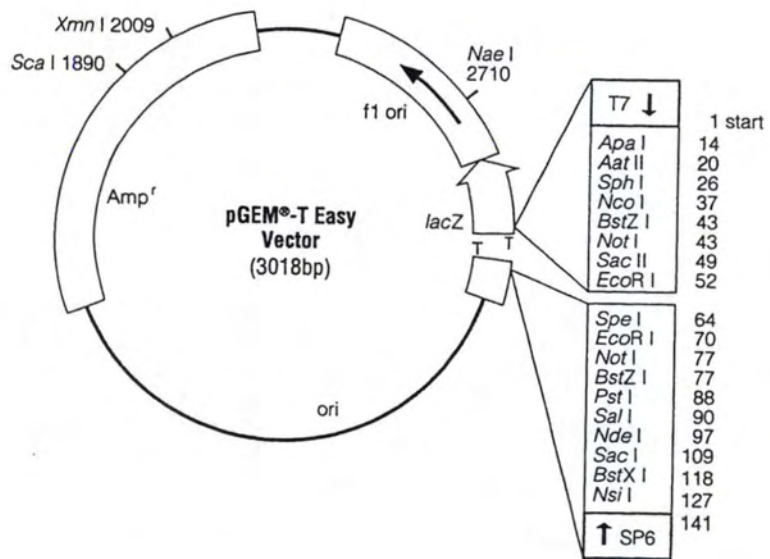
Après dissolution de l'agarose, et en présence d'un tampon riche en sels, l'ADN va s'adsorber sur les billes Qiaex II. Un simple lavage permet donc d'éliminer les impuretés. L'ADN pourra dès lors être élué des billes avec de l'eau distillée.

#### 3.9.2.c. Méthode

La bande d'ADN est excisée du gel d'agarose à l'aide d'une lame propre, et placée dans un microtube. 3 volumes de tampon QX1, puis 30 µl de QIAEX II y sont ajoutés, le tout est incubé 10 min à 50 °C en étant vortexé toutes les 2 min. Le but de cette opération est de solubiliser l'agarose et d'adsorber l'ADN sur les billes (QIAEX II).

Une centrifugation est ensuite réalisée à 13.000 rpm durant 1 min. Le culot est ensuite resuspendu dans 500 µl de tampon QX1, puis centrifugé à 13.000 rpm durant 1 min.

Le culot est alors resuspendu dans 500 µl de tampon PE, et à nouveau centrifugé 1 min à 13.000 rpm.



**Fig II-7:** Carte génétique circulaire du vecteur pGEM-T Easy

Le culot est ensuite séché durant 30 min à température ambiante, puis resuspendu dans 20 µl d'eau distillée. Cette étape sert à éluer l'ADN. Une dernière centrifugation à 13.000 rpm durant 1 min est réalisée. Le surnageant, qui contient maintenant l'ADN purifié, est alors récupéré.

### **3.10. Clonage**

Nous allons utiliser le plasmide pGEM<sup>®</sup>-T easy afin de cloner nos inserts. Ce vecteur possède 2 thymidines libres aux extrémités 3'. Cette caractéristique lui vient de sa linéarisation par l'endonucléase Eco RV. Ces thymidines en 3' augmentent fortement l'efficacité de la ligation dans le plasmide en empêchant la recircularisation du vecteur sur lui-même. Les produits PCR amplifiés par la Taq Polymérase, qui a la propriété de leur ajouter une adénine aux extrémités 5', vont ainsi venir se lier au plasmide. Le vecteur pGEM<sup>®</sup>-T easy possède un gène de résistance à l'ampicilline, une origine de répllication procaryote et un site multiple de clonage inséré dans l'élément Lac Z. Ceci est particulièrement intéressant car il permet une sélection dite blanc-bleu entre les bactéries possédant le plasmide portant l'insert et celles dont le plasmide n'a pas incorporé d'insert.

#### **3.10.1. Ligation des inserts dans pGEM<sup>®</sup>-T easy (fig. II-7)**

Le mélange réactionnel est composé de :

- 50 ng du vecteur pGEM<sup>®</sup>-T easy (Promega, Madison, U.S.A.)
- 15 u d'ADN ligase T4 (Promega, Madison, U.S.A.)
- Tampon de l'ADN ligase T4 :
  - 30 mM Tris-HCl, pH 7,8
  - 10 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 10 mM DTT
  - 1 mM ATP(Promega, Madison, U.S.A.)
- 3 µl d'ADN purifié (cf. point 3.9.)



Ce mélange réactionnel est réalisé sur glace et incubé une nuit à 4 °C.

### **3.10.2. Préparation de bactéries CaCl<sub>2</sub> compétentes**

#### **3.10.2.a. Matériel**

- Colonie de *E. Coli Sure* (Stratagene, La Jolla, U.S.A.)
- LB Broth (Difco, Detroit, U.S.A.)
- Agar (Difco, Detroit, U.S.A.)
- Tétracycline (50µg/ml) (Sigma, St-Louis, U.S.A.)
- *Solution de CaCl<sub>2</sub>* :
  - 10 mM PIPES, pH 7,0 (Sigma, St-Louis, U.S.A.)
  - 60 mM CaCl<sub>2</sub> (Merck, Darmstad, Allemagne)
  - 15 % glycérol (Merck, Darmstad, Allemagne)

#### **3.10.2.b. Méthode**

##### **. préparation du milieu Luria Bertani (LB)**

- Le milieu LB est composé de :
- Hydrolysate de caséine (peptone) 1 %
  - NaCl 0,5 %
  - Extraits de levure 0,5 %

Il est préparé à partir d'eau distillée additionnée de 2 % de milieu LB Broth en poudre. Il doit être autoclavé à une température de 125 °C durant 30 min.

Le milieu LB solide est de même composition que le milieu liquide mais il est additionné de 2 % d'agar avant la stérilisation à l'autoclave. Il est coulé dans des boîtes de Petri stériles lorsque la température est descendue à 55 °C. Lorsque le milieu est solidifié, les boîtes sont séchées en conditions stériles.

Si un additif (antibiotique, IPTG, x-gal) doit être ajouté au milieu LB, cela se fait également lorsque la température est descendue à 55 °C.

### . préparation des bactéries compétentes

Une préculture est tout d'abord réalisée par inoculation d'une colonie d'*E. Coli Sure* dans 50 ml de milieu LB additionné de tétracycline. Celle-ci se développe durant une nuit à 37 °C sous agitation modérée.

Le lendemain, 2 ml de préculture sont inoculés dans 250 ml de LB avec tétracycline. Cette culture se développe à 37 °C sous agitation modérée jusqu'à ce que sa densité optique à 590 nm atteigne 0,7-0,8 (phase de croissance exponentielle).

A ce moment, 2 fois 100 ml de cette culture sont prélevés dans 2 cylindres stériles, puis incubés sur glace pendant 10 min.

Il s'en suit une centrifugation de 7 min à 3000 rpm (Beckman J-21 B, rotor JA-14), à 4 °C.

Les culots sont alors resuspendus dans 20 ml d'une solution de CaCl<sub>2</sub> stérile froide (4 °C), puis centrifugés 5 min à 2500 rpm à 4 °C. Le culot est resuspendu dans 20 ml d'une solution de CaCl<sub>2</sub> froide, le tout est incubé 30 min sur glace.

Il s'en suit une centrifugation de 5 min à 2500 rpm à 4 °C. Le culot est alors resuspendu dans 4 ml de solution de CaCl<sub>2</sub> froide avant d'être aliquoté par 100 µl. Les fractions ainsi obtenues peuvent être conservées à -70 °C ou utilisées directement pour une transformation.

### **3.10.3. Transformation des bactéries par la méthode du choc thermique.**

Un aliquot de 100 µl de bactéries CaCl<sub>2</sub> compétentes est dégelé sur glace, puis additionné de 10 à 100 ng d'ADN exogène (mélange de ligation).

Il s'en suit une incubation de 10 min sur glace, puis un passage de 2 min dans un bain à 42 °C (choc thermique).

500 µl de milieu LB sont alors ajoutés à la suspension bactérienne qui est ensuite incubée 30 min à 37 °C avant d'être étalée sur boîtes de Petri contenant milieu LB solide supplémenté de IPTG 40 µg/ml (Promega,



Madison, U.S.A.) ; x-gal 80 µg/ml (Promega, Madison, U.S.A.) ; Ampicilline (Sigma, St-Louis, U.S.A.). Ces boîtes sont incubées une nuit à 37 °C.

### **3.11. Mini-préparation d'ADN plasmidique**

#### **3.11.a. Matériel**

- |                           |                               |
|---------------------------|-------------------------------|
| - LB Broth                | (Difco, Detroit, U.S.A.)      |
| - Ampicilline (100 µg/ml) | (Sigma, St-Louis, U.S.A.)     |
| - Kit miniprep de Qiagen  | (Qiagen, Hilden, Allemagne)   |
| - Isopropanol             | (Sigma, St-Louis, U.S.A.)     |
| - Ethanol                 | (Merck, Darmstadt, Allemagne) |

#### **3.11.b. Méthode**

Lorsque les colonies sont visibles sur boîte de Petri, c'est-à-dire le lendemain, les blanches sont piquées et servent à inoculer 2,5 ml de milieu LB additionné d'ampicilline (100 µg/ml). Il s'en suit une incubation d'une nuit à 37 °C sous agitation modérée.

Le lendemain, 1 ml de culture est prélevé dans un microtube, et centrifugé 5 min à 15.000 rpm.

Le milieu de culture est éliminé et le culot resuspendu dans 300 µl de tampon P1 (composé de RNase A 100 µg/ml, de Tris-HCl 50 mM et de EDTA 10 mM). 300 µl de tampon P2 y sont ajoutés (composé de NaOH 200 mM et de SDS 1 %), le tout est incubé pendant 5 min à température ambiante.

300 µl de tampon P3 sont alors ajoutés (composé d'acétate de potassium 3,0 M, pH 5,5) et le mélange est incubé 10 min sur glace.

Il s'en suit une centrifugation de 15 min à 15.000 rpm à 4 °C au terme de laquelle le surnageant est récupéré.

Après en avoir estimé le volume, 0,8 volume d'éthanol y sont ajoutés afin de précipiter l'ADN.



L'ADN est culotté par centrifugation 15 min à 15.000 rpm à 4 °C, puis lavé avec 300 µl d'éthanol 70 %.

Il est ensuite centrifugé 15 min à 15.000 rpm à 4 °C.

L'éthanol est éliminé et le culot séché à température ambiante avant d'être resuspendu dans 20 µl d'eau distillée.

## **3.12. Vérification de la construction**

### **3.12.1. Restriction par Eco RI**

#### **3.12.1.a. . Matériel**

- Enzyme de restriction Eco RI (Promega, Madison, U.S.A.)
- Tampon de restriction H (Promega, Madison, U.S.A.)
- Marker IV (Eurogentec, Liège, Belgique)

#### **3.12.1.b. Méthode**

Préparer le mélange de restriction à température ambiante :

- 4 µl ADN plasmidique (cf point 3.11.)
- Tampon de restriction H :
  - Tris-HCl 90 mM, pH 7,5
  - MgCl<sub>2</sub> 10 mM
  - NaCl 50 mM
- 10 u enzyme de restriction Eco RI
- Eau distillée

La restriction est réalisée pendant 1 heure à 37 °C.

Le produit de restriction est ensuite déposé sur un gel d'agarose 2 % (voir point 3.8. pour la méthode suivie).

### **3.12.2. PCR d'amplification du site de clonage du plasmide**

Cette étape permet également de vérifier la présence d'un insert dans un plasmide. De plus, le produit de cette PCR sera utilisé pour le séquençage de l'insert. En effet, le séquençage d'un morceau d'ADN linéaire est généralement plus aisé que celui d'un plasmide circulaire entier.

#### **3.12.2.a. Matériel**

- ADN plasmidique (cf point 3.11.)
- AmpliTaq Gold Polymerase (5 u/ $\mu$ l) (Perkin Elmer, Foster City, U.S.A.)
- Tampon pour la Taq Polymérase 10x (Perkin Elmer, Foster City, U.S.A.)
- Chlorure de magnésium 25mM (Perkin Elmer, Foster City, U.S.A.)
- dNTP 250  $\mu$ M (Eurogentec, Liège, Belgique)
- Amorces M13 sens (Eurogentec, Liège, Belgique)
- Amorces M13 anti-sens (Eurogentec, Liège, Belgique)

#### **3.12.2.b. Méthode**

Chaque échantillon est composé de :

- 2  $\mu$ l d'ADN plasmidique (cf point 3.11.)
- 1 u Taq Polymérase
- Tampon pour la Taq polymérase : - 15 mM Tris-HCl, pH 8,0  
- 50 mM KCl
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 12,5  $\mu$ M dNTP
- 250 nM amorces arbitraires
- 64 nM amorces M13 sens
- 64 nM amorces M13 anti-sens
- eau distillée

Les conditions de PCR sont les suivantes :

- 94 °C pendant 10 min
- 35 cycles : - 94 °C pendant 30 sec
  - 50 °C pendant 15 sec
  - 72 °C pendant 4 min
- 72 °C pendant 10 min

### **3.13. PCR en vue du séquençage**

#### 3.13.a. Matériel

- Matrice (cfr point 3.12.1 ou 3.12.2)
- Amorces M13 (sens ou anti-sens)
- Ready Reaction Mix (Perkin Elmer, Foster City, U.S.A.)

#### 3.13.b. Méthode

Le mélange réactionnel est composé de :

- 0.5 µl de matrice
- 0.5 µl d'amorce M13 (sens ou anti-sens)
- 5 µl d'eau distillée
- 4 µl de Ready Reaction Mix contenant la polymérase, les dNTPs, les dNTPs terminateurs fluorescents et le tampon PCR.

Les conditions PCR sont les suivantes :

- 96 °C pendant 5 min
- 25 cycles : - 96 °C pendant 30 sec
  - 50 °C pendant 15 sec
  - 60 °C pendant 4 min



### **3.14. Purification des produits PCR**

Avant de séquencer les échantillons, il est nécessaire de les purifier.

#### **3.14.a. Matériel**

- Ethanol absolu (Merck, Darmstad, Allemagne)

#### **3.14.b. Méthode**

40  $\mu$ l d'éthanol 80 % sont ajoutés aux 10  $\mu$ l de produit PCR. Le tout est agité et incubé, dans l'obscurité, durant 15 min à température ambiante.

Les échantillons sont alors centrifugés 20 min à 15.000 rpm à 4 °C.

Le culot d'ADN est resuspendu dans 25  $\mu$ l d'éthanol 70 %, puis centrifugé 10 min à 15.000 rpm à 4 °C.

Le surnageant est éliminé et le culot est séché 15 min au Speed-Vac (Heto-Holten, Allerød, Danemark).

### **3.15. 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, Foster City, U.S.A.).

Une PCR est réalisée sur le fragment à séquencer en présence d'une seule amorce (sens ou anti-sens) permettant l'amplification d'un seul brin.

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 est ensuite déposée sur gel de polyacrylamide 4 %. La migration s'effectue suivant la taille des fragments.

Le profil de migration obtenu est lu par un laser qui excite les marqueurs fluorescents. Ceux-ci émettent alors un signal sous une longueur d'onde qui leur est propre. La succession des émissions donne ainsi la séquence.

La séquence sens s'obtiendra en présence de l'amorce anti-sens et inversement.

Une fois la séquence obtenue, son identité est vérifiée dans une banque de donnée disponible grâce au programme informatique BLAST à l'adresse internet suivante :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast?Jform=0>

*Résultats*  
*et*  
*discussion*



Lors de ce travail, nous avons voulu entreprendre la comparaison de l'expression génique de cellules soumises à des stress non létaux répétés sous éthanol ou sous tert-butylhydroperoxyde (t-BHP), de cellules non stressées et de cellules sénescents. Pour cela, nous avons utilisé la technique du differential display qui permet de comparer simultanément l'expression génique de plusieurs populations cellulaires. Nous allons maintenant décrire les résultats obtenus au cours des différentes étapes jusqu'à l'identification de gènes candidats potentiellement exprimés de manière différentielle dans une de ces populations de cellules.

### **1. Mise au point des conditions de stress**

La première phase de ce travail a consisté en la mise au point des conditions de stress. En effet, nous devons évaluer les concentrations optimales en t-BHP et en éthanol pour lesquelles on peut mettre en évidence un vieillissement accéléré sans causer de mortalité cellulaire suite à l'application d'un stress par jour durant 5 jours consécutifs.

Pour cela, nous avons utilisé deux tests. Tout d'abord un test de cytotoxicité qui consiste au dosage de la concentration en protéines par la méthode du Folin. Des études précédemment réalisées au laboratoire ont montré que la quantité de protéines dans une culture de fibroblastes WI-38 est le reflet fidèle du nombre de cellules présentes dans la culture. Les résultats obtenus par ce test ont été comparé à ceux obtenus par des méthodes différentes telles que la méthode au MTT, la méthode à l'hexosaminidase et le comptage de cellules. Toutes ces méthodes ont donné des pourcentages similaires pour des concentrations données en t-BHP ou en éthanol par rapport aux cellules témoin non stressées. On a donc conservé le dosage de protéines en raison de sa facilité et de sa rapidité de mise en œuvre. Notons que l'induction de la synthèse protéique ne peut, à elle-seule, modifier la valeur obtenue par un dosage global par la méthode du Folin (Toussaint, O. *et al* , 1994b). Ensuite, nous

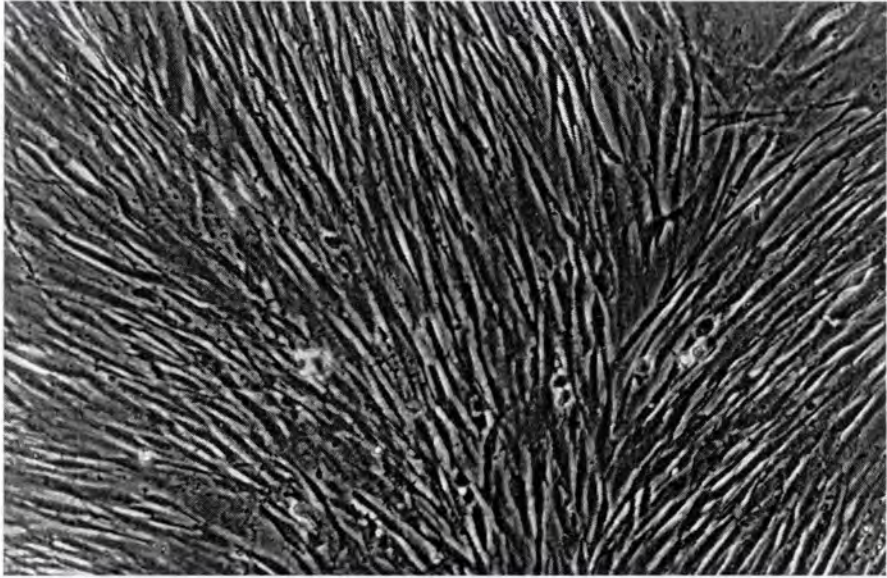
avons utilisé le test de l'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence cellulaire (SA  $\beta$ -gal) qui se base sur l'apparition d'une activité enzymatique  $\beta$ -galactosidase détectable chez les cellules sénescents à pH 6,0 (Dimri, G. *et al*, 1995). Dès lors, ce test nous permet de déterminer la proportion de cellules sénescents en présence de substrat x-gal, dont le produit enzymatique donne aux cellules positives une couleur bleue, facilement détectable au microscope optique.

Nous avons réalisé une série de 5 stress successifs sur des fibroblastes humains WI-38 jeunes à raison d'un stress d'une heure par jour pour les cellules stressées au t-BHP et de deux heures par jour pour les cellules stressées à l'éthanol. Ces cellules se trouvaient à environ 60% de leur durée de vie proliférative et n'étaient pas encore tout à fait confluentes lors du premier stress. En ce qui concerne le stress au t-BHP, nous avons utilisé les concentrations de 20, 25 et 30  $\mu$ M diluées dans du milieu de culture BME + 10% FBS. Pour le stress à l'éthanol, nous avons testé les concentrations de 4% et 5% également diluées dans du milieu de culture BME + 10%FBS.

Deux contrôles sont réalisés. D'une part des cellules jeunes n'ayant subi aucun stress (que nous nommons par la suite "jour 0"). D'autre part, nous utilisons des cellules ayant subi les mêmes conditions que les cellules stressées mais sans addition de molécule stressante (ce sont les cellules "contrôle"). Avant de doser les protéines cellulaires et de réaliser le test SA  $\beta$ -gal, nous donnons 2 jours de récupération aux cellules. Ainsi, nous sommes dans les mêmes conditions de stress que celles mises au point au laboratoire et entraînant l'apparition des biomarqueurs du vieillissement que nous avons décrits dans l'introduction de ce travail.



A



B

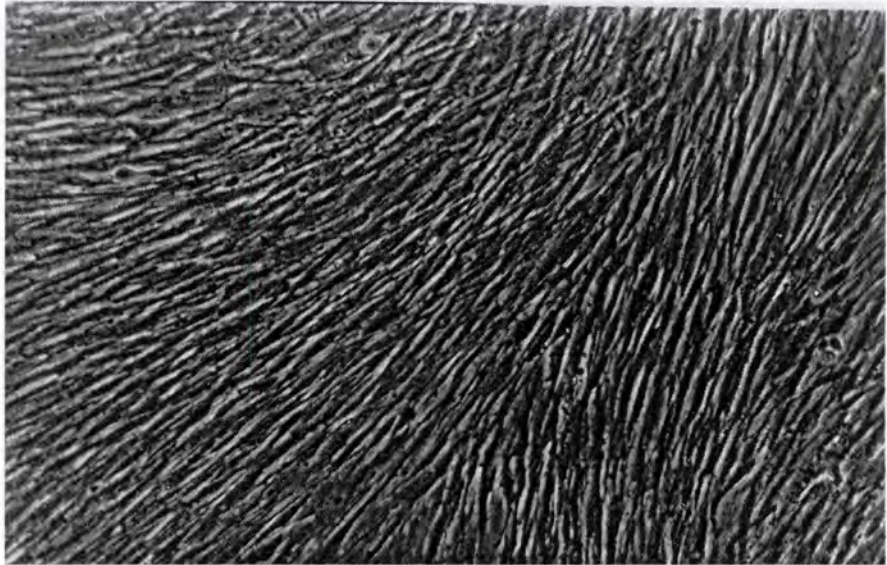
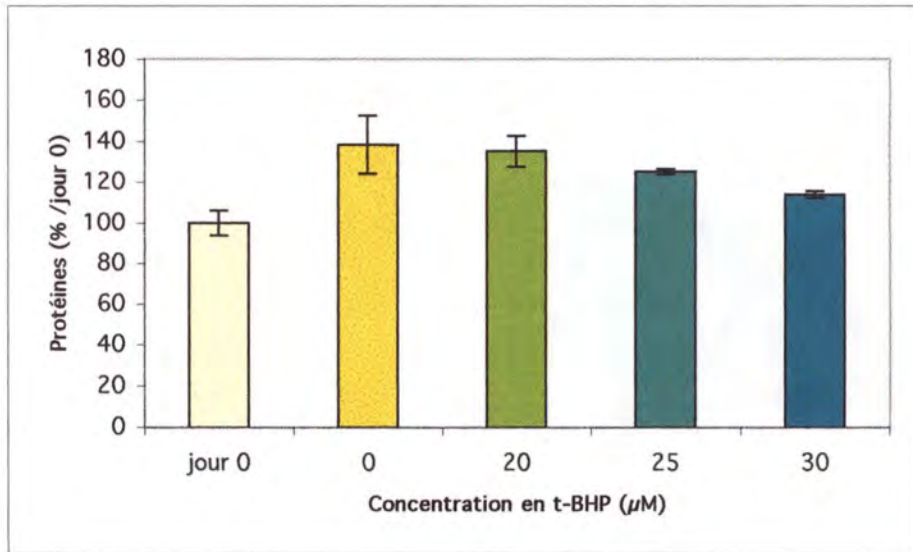


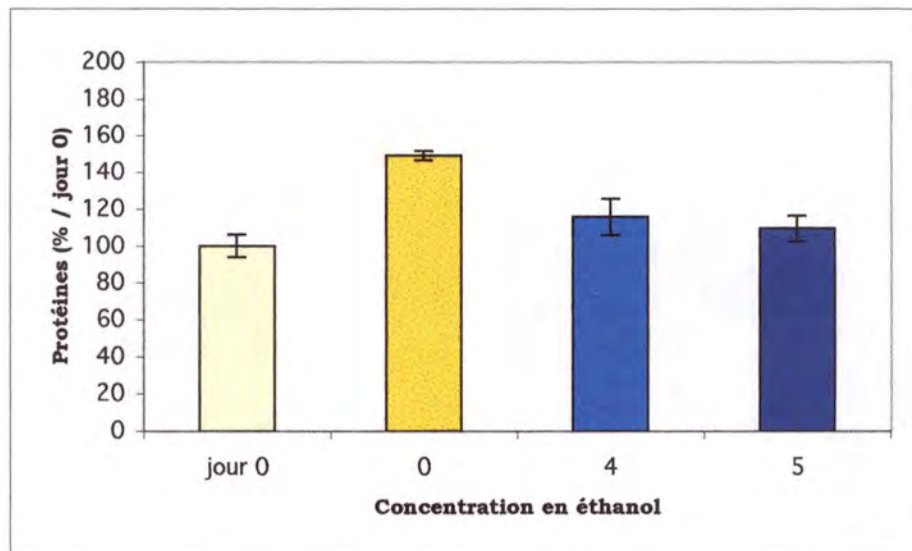
Fig. III-3 : A : Cellules contrôles avant le 1<sup>er</sup> stress

B : Cellules contrôles après le 5<sup>ème</sup> stress





**Fig. III-1 :** Courbe de mortalité cellulaire sous des concentrations croissantes en t-BHP après 5 stress successifs à raison d'un stress par jour. Les résultats sont exprimés en pourcentage de protéines par rapport à la quantité de protéines présentes au jour 0.



**Fig III-2 :** Courbe de mortalité cellulaire sous des concentrations croissantes en éthanol après 5 stress successifs à raison d'un stress par jour. Les résultats sont exprimés en pourcentage de protéines par rapport à la quantité de protéines présentes au jour 0.

## 1.1. Estimation de la mortalité cellulaire par le dosage des protéines.

### 1.1.a. Résultats

On observe une augmentation de la quantité de protéines cellulaires d'environ 40% pour les cellules "contrôle". Pour les cellules stressées 5 fois sous respectivement 20, 25 et 30  $\mu\text{M}$  t-BHP, on observe une augmentation de 35, 25 et 15% de la quantité de protéines cellulaires. La quantité de protéines obtenue après 5 stress de 30  $\mu\text{M}$  en t-BHP n'est pas significativement différente de celle obtenue au jour 0 (100% +/- 6,2 , 114% +/- 1,6).

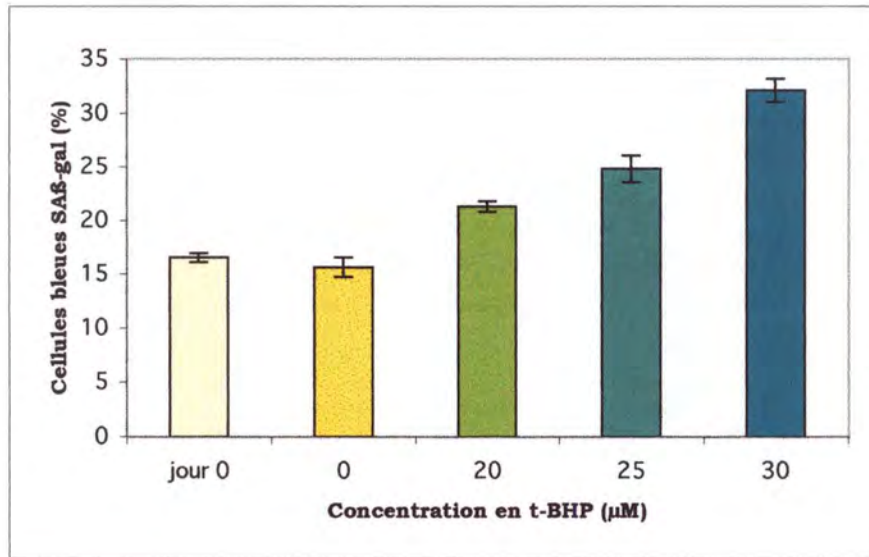
De même, on observe chez les cellules stressées durant 5 jours consécutifs à l'éthanol, une augmentation de la quantité de protéines cellulaires de l'ordre de 50% pour les cellules "contrôle" et de 15 et 10% pour les concentrations de 4% et de 5% (fig. III-2). De plus, la quantité de protéines cellulaires après 5 stress sous éthanol 5% est proche de celle des cellules "jour 0" (100% +/- 6,2 , 110% +/- 7,1).

### 1.1.b. Discussion

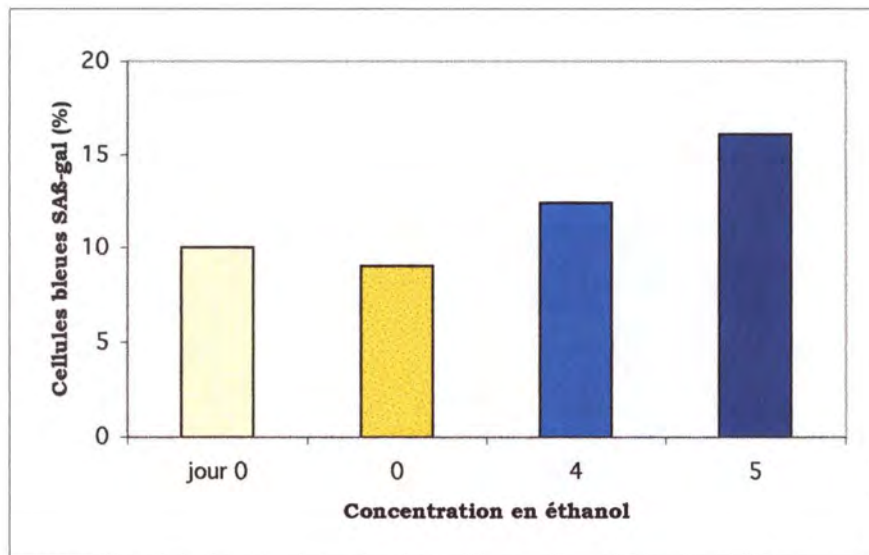
L'augmentation de la concentration en protéines chez les cellules "contrôle" par rapport aux cellules "jour 0" peut être expliquée par le fait que ces cellules ont pu continuer à se diviser jusqu'à atteindre un stade de confluence, d'ailleurs visible au microscope à contraste de phase (fig. III-3).

On remarque également que dès qu'une culture de fibroblastes WI-38 est mise en contact avec une molécule stressante, sa croissance est limitée. Et cette croissance est d'autant plus faible que la concentration en molécule stressante utilisée est élevée.

Ces résultats confirment des résultats précédemment obtenus au laboratoire où l'on montre que le potentiel prolifératif cellulaire est d'autant plus fortement et longuement diminué que le stress a été intense, que ce soit après un ou plusieurs stress (Toussaint, O., thèse).



**Fig. III-4 :** Pourcentage de cellules présentant l'activité SA b-gal sous des concentrations croissantes en t-BHP après 5 stress successifs à raison d'un stress par jour.



**Fig. III-5 :** Pourcentage de cellules présentant l'activité SA b-gal sous des concentrations croissantes en éthanol après 5 stress successifs à raison d'un stress par jour.



Ainsi, le seuil de mortalité cellulaire après un seul stress au t-BHP d'une heure réalisé dans nos conditions est de 1mM en t-BHP, soit plus de 33 fois supérieure à la concentration de 30  $\mu$ M utilisée ici (Dumont, P. *et al*, soumis pour publication). Des travaux précédents ont montré que la mortalité cellulaire apparaissait respectivement à des concentrations de 1000, 500, 100, 75 et 40  $\mu$ M en t-BHP après 1, 2, 3, 4 et 5 stress. Ces travaux ont aussi montré que l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN est fortement abaissée, au moins pendant 168 h, après le dernier stress sous t-BHP 30  $\mu$ M, atteignant des valeurs aussi faibles que celles obtenues pour des cellules sénescents qui ont un potentiel prolifératif quasi nul.

Afin d'examiner si ces concentrations pouvaient accélérer le processus de vieillissement *in vitro*, nous avons réalisé le test de la SA  $\beta$ -gal aux mêmes concentrations.

## 1.2. Cellules positives pour l'activité SA $\beta$ -gal

### 1.2.a. Résultats

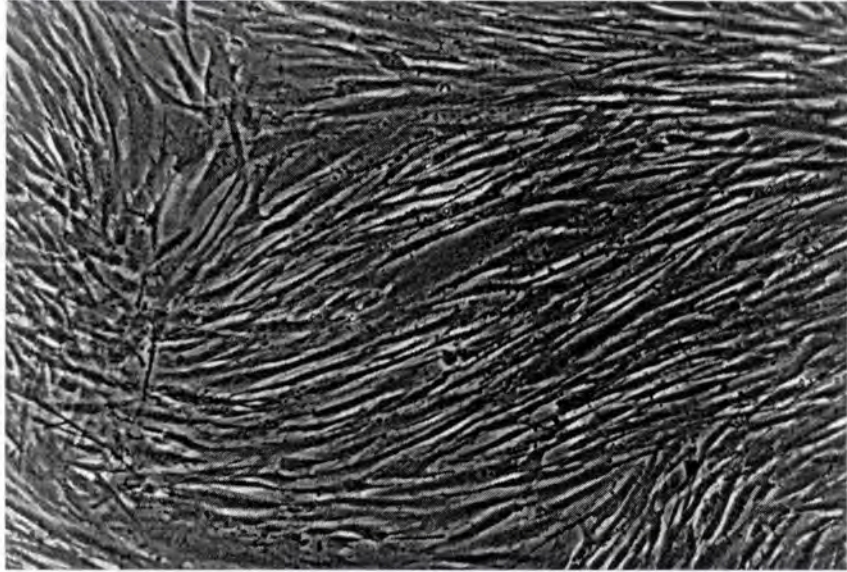
Nous constatons que la proportion de cellules positives au test augmente avec la concentration en t-BHP utilisée. Ainsi, on observe une augmentation de l'ordre de 35, 55 et 100% pour les concentrations respectives de 20, 25 et 30  $\mu$ M (fig. III-4).

En ce qui concerne les cellules stressées à l'éthanol, on observe également une hausse de la proportion de cellules positives au test de l'ordre de 25 et 60% pour les concentrations respectives de 4 et 5% d'éthanol (fig. III-5).

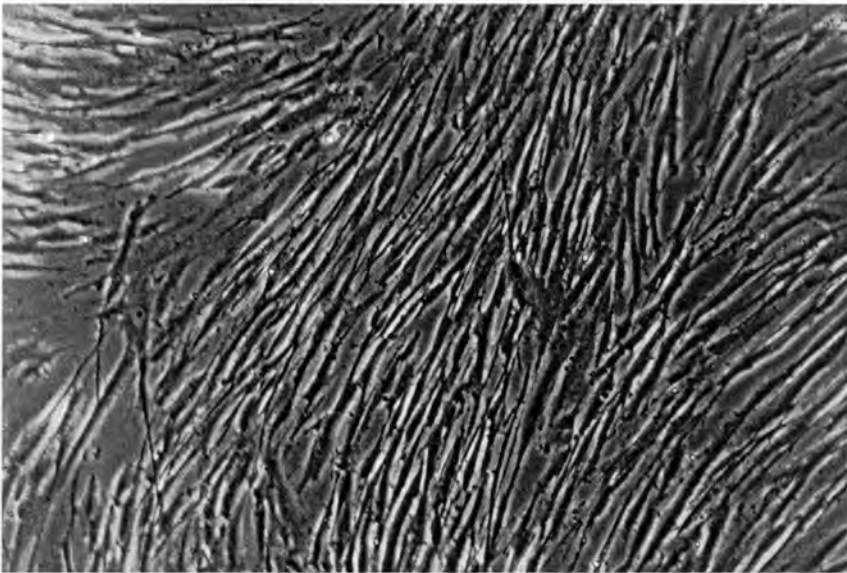
### 1.2.b. Discussion

On remarque que la proportion de cellules montrant une activité SA  $\beta$ -gal tend à augmenter après les stress, et ce en fonction de la concentration utilisée. En suivant ce biomarqueur, ces résultats

A



B



C



Fig. III-6a : Cellules stressées au t-BHP

A : Avant le premier stress

B : Après le premier stress

C : Le lendemain du premier stress



correspondent à une augmentation de la proportion de cellules sénescents chez les cellules soumises au stress, ce qui semble donc révéler une accélération du processus de vieillissement *in vitro*. Ces résultats confirment les résultats précédemment obtenus (Dumont, P. *et al*, en préparation).

En conclusion, suite à ces différents résultats obtenus, nous utiliserons des stress d'une concentration de 30  $\mu$ M pour le t-BHP et de 5% pour l'éthanol, ce qui correspond aux doses optimales n'impliquant pas une mortalité cellulaire et induisant le vieillissement cellulaire *in vitro*.

## **2. Differential display**

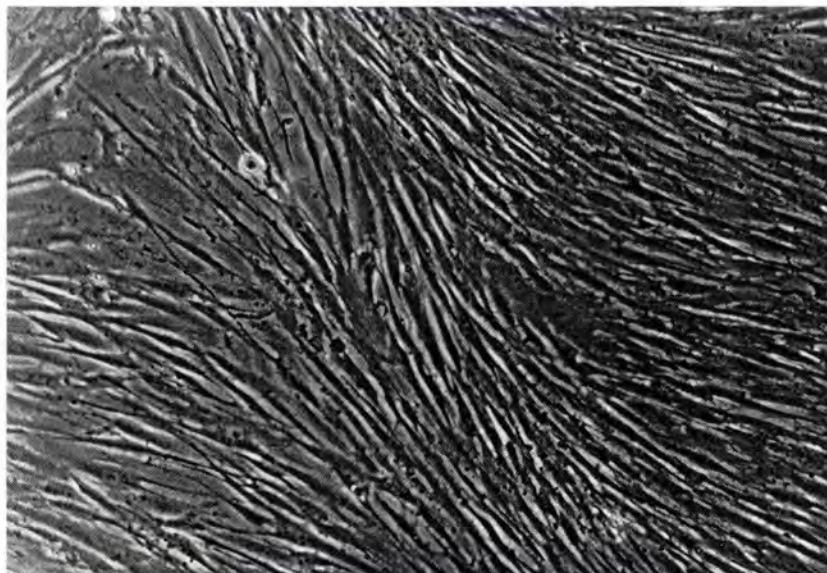
### **2.1. Résultats**

#### **2.1.a. Stress successifs et extraction d'ARN**

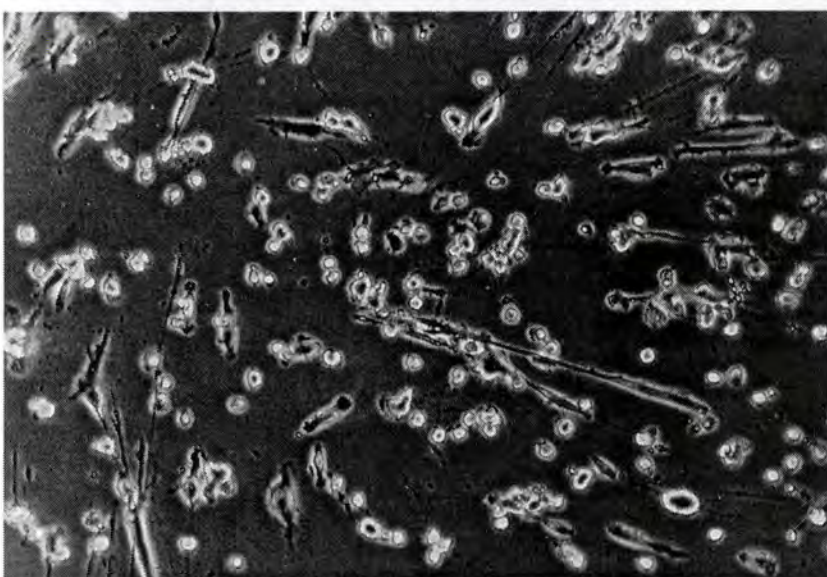
Suite aux différentes mises au point des conditions de stress, nous avons réalisé deux séries de stress répétés aux concentrations de 30  $\mu$ M pour le stress au t-BHP (fig. III-6a) et de 5% pour le stress à l'éthanol (fig. III-6b). Comme contrôle, nous prenons d'une part des cellules n'ayant subi aucun stress (jour 0) et d'autre part des cellules ayant été soumises aux mêmes conditions que les cellules stressées mais sans contact avec une molécule stressante (contrôle). Toutes ces cellules sont jeunes (à 60% de leur durée de vie proliférative) et de plus, nous analyserons l'expression génique de cellules sénescents (se trouvant à 95% de leur durée de vie proliférative). Toutes sont issues d'une même culture cellulaire de départ de fibroblastes WI-38. Suite aux 5 jours de stress, on laisse une période de récupération de 2 jours. Le 2<sup>ème</sup> jour de récupération, le milieu de culture des cellules est remplacé par du nouveau milieu, ceci afin que les cellules soient toutes dans les mêmes conditions avant l'extraction.



A



B



C

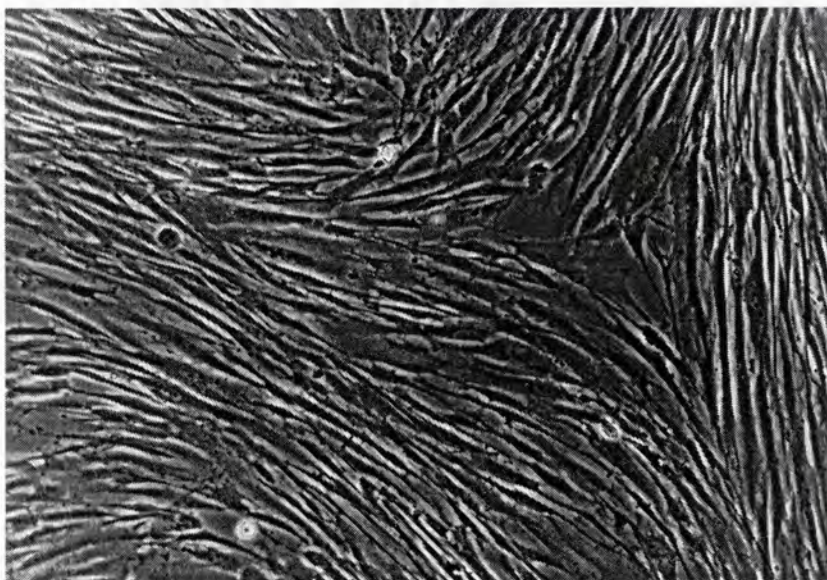


Fig. III-6b : Cellules stressées à l'éthanol

A : Avant le premier stress

B : Après le premier stress

C : Le lendemain du premier stress



Pour ce qui est de l'extraction de l'ARN, nous avons suivi le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes. Notons toutefois que nous avons dû modifier ce protocole par rapport à sa version originale qui comprenait une étape de rinçage préalable des cellules au PBS froid. En effet, l'extraction d'ARN chez les cellules sénescents semblait inefficace car le profil d'ARN total sur gel montrait une dégradation importante de l'ARN. Ceci était probablement dû à l'activité de RNAses lors de la lyse. Nous avons trouvé deux hypothèses explicatives possibles. Tout d'abord, il a été montré que les cellules sénescents ont une membrane cellulaire moins fluide et donc plus fragile qui pourrait être plus vite lésée que celle des jeunes lors des rinçages précédents la lyse cellulaire. Deuxièmement, les cellules sénescents contiennent un plus grand nombre de lysosomes qui contiennent, entre autres des RNAses (Remacle, J. *et al*, 1980). Dès lors, nous avons décidé de minimiser les risques de dégradation en ne rinçant plus les cellules au PBS froid mais en les lysant directement après avoir retiré leur milieu de culture.

#### 2.1.b. Transcription inverse et PCR

Une fois les ARN extraits, ils ont été traités à la DNase I afin de retirer tout ADN résiduel, cause principale de faux-positifs lors du differential display. Après cette étape, l'ARN est rétro-transcrit en utilisant 4 amorces poly-T (TVA, TVT, TVC et TVG, cfr. Matériels et Méthodes). Ces amorces vont venir s'hybrider avec la queue poly-A de l'ARN-m et permettre ainsi leur sélection à partir de l'ARN total et leur rétro-transcription en ADN-c. Les populations d'ADN-c sont ensuite amplifiées en utilisant les amorces "aléatoires" arbitrairement choisies (cfr. Matériels et Méthodes) et les amorces utilisées à l'étape précédente. Chaque échantillon est alors déposé sur gel de polyacrylamide.

Nombre total de variations									
156									
Communes à la sénescence et t-BHP et/ou EtOH		Communes aux stress t-BHP et EtOH		Spécifiques à la sénescence		Spécifiques au t-BHP		Spécifiques à l'EtOH	
22		18		30		44		42	
+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
9	13	7	11	23	7	34	10	31	11

Variations communes à la sénescence <sup>et</sup> à au <del>au</del> moins un type de stress					
22					
Sénescence + t-BHP + EtOH		Sénescence + t-BHP		Sénescence + EtOH	
13		4		5	
+	-	+	-	+	-
2	11	3	1	4	1

Fig. III-7 : Classification des 156 bandes d'intérêt obtenues sur gels de polyacrylamide. Un «+ » signifie que ces bandes sont sur-exprimées sur les gels, un «-» signifie que ces bandes sont sous-exprimée. Dans, le cadre de ce travail, nous allons analyser les 22 bandes variant de façon similaire chez les cellules sénescents et chez les cellules soumises à un des 2 stress.



		CTL	tBHP	EtOH	G44
1	01A1		1		1
2	03C1	1			
3	03G1	1			
4	03T1		1		1
5	10A1	1			
6	10G1	1			
7	10G4		1	1	1
8	11C11	1			
9	11G4	1			
10	13G4	1			
11	14C1			1	1
12	14T4	1			
13	14T9	1		1	
14	15A9	1			
15	15T1			1	1
16	16T1		1		1
17	16T2	1			
18	16T3	1			
19	21A2			1	1
20	21C2			1	1
21	21G1	1	1		
22	21G2		1	1	1

Fig.III-8 : Représentation des 22 bandes choisies dans le cadre de notre travail. Chaque bande est identifiée par son numéro d'ordre (de 1 à 22, que nous utiliserons par la suite pour les différencier), son numéro de code précis nous permettant de retrouver de quel gel cette bande a été excisée (reprenant le numéro de l'amorce aléatoire « arbitrairement » choisie et le type d'amorce poly-T ayant servi à l'amplifier, ainsi que sa position sur la piste du gel. Par exemple, la 2<sup>ème</sup> bande d'intérêt se trouvant sur la piste correspondant aux échantillons amplifiés avec l'amorce « aléatoire » arbitrairement choisie 16 et le poly-T TVT est codée 16T2.)

1 2 3 4

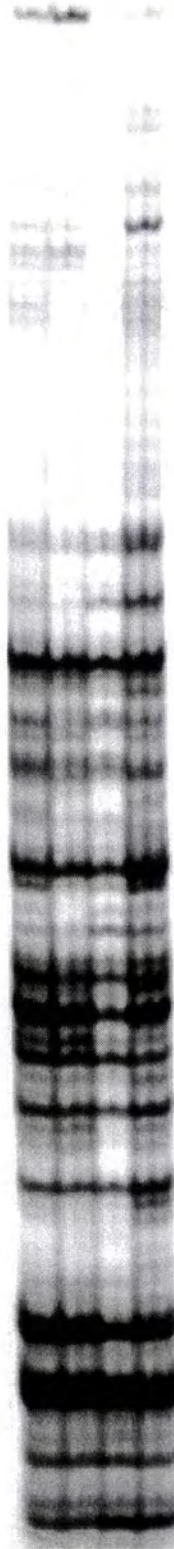
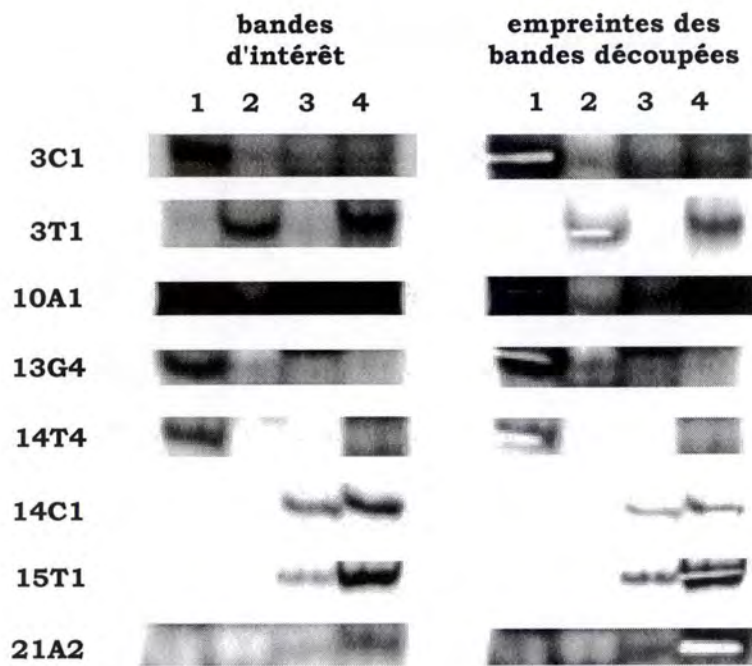


Fig. 3-9a : Profil type obtenu sur gel de polyacrylamide  
lors du differential display  
1 : échantillons contrôles  
2 : échantillons t-BHP  
3 : échantillons éthanol  
4 : échantillons sénescents

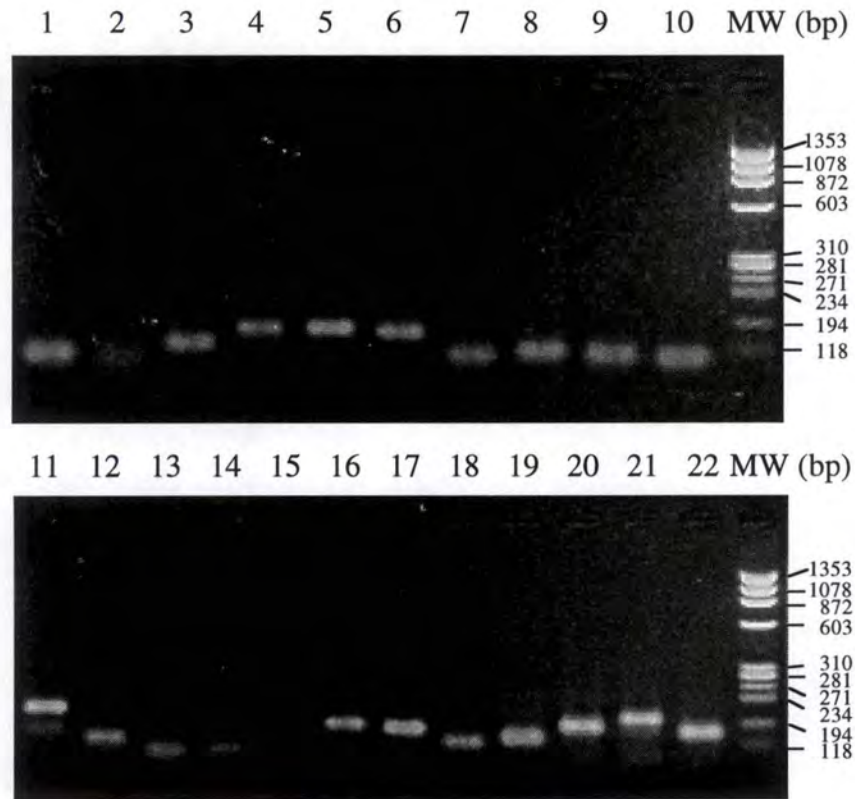


**Fig. 3-9b :** Autoradiographies des bandes d'intérêt à partir desquelles une séquence a été obtenue au cours de ce travail.

A droite, autoradiographies montrant que les bonnes bandes ont été excisées du gel de polyacrylamide.

- 1 : échantillons contrôles
- 2 : échantillons t-BHP
- 3 : échantillons éthanol
- 4 : échantillons sénescents





**Fig. III-10 :** Visualisation sur gel d' agarose des bandes d' intérêt réamplifiées par PCR. Les produits PCR obtenus sont purs (une seule bande), à l' exception des pistes 11, 20 et 21. Les n° correspondent au numéro d' ordre des bandes (cf. fig III-8)



**Fig. III-11 :** Vérification de l' excision des seules bandes d' intérêt dans les pistes 11, 20 et 21. Les n° correspondent au numéro d' ordre des bandes (cf. fig III-8)

### 2.1.c. Gels de polyacrylamide et isolation des bandes d'intérêt

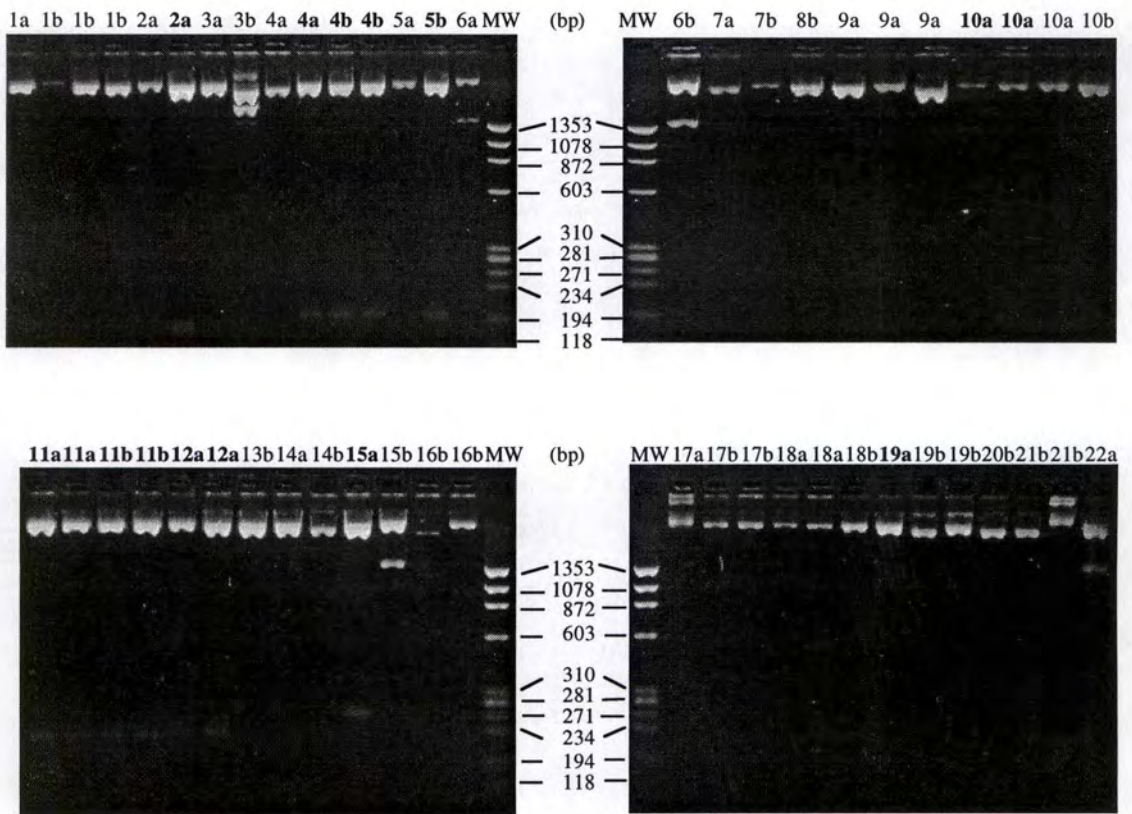
Après avoir comparé les différentes bandes sur le gel suivant les populations, nous avons identifié une série de bandes d'intérêt, c'est-à-dire celles dont l'expression varie selon les populations. Nous avons ainsi répertorié 156 bandes d'intérêt, pouvant être classées dans 5 catégories différentes suivant qu'elles sont spécifiques à un des deux stress ou aux deux, à la sénescence ou à un seul/ou aux deux stress et à la sénescence (fig. III-7).

Nous avons décidé de nous consacrer dans le cadre de ce travail aux variations communes à la sénescence et à au moins un type de stress, ce qui correspond à 22 bandes d'intérêt (fig. III-8).

Chacune de ces bandes a alors été extraite du gel et réamplifiée en utilisant le même couple d'amorces (cfr. Matériels et Méthodes). Nous vérifions l'excision de la bande en réexposant le gel après excision durant 2 jours (fig. III-9).

### 2.1.d. Purification des produits PCR après récupération des bandes d'intérêt

Afin de contrôler leur taille, leur amplification et leur pureté, les échantillons PCR sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 2%. En effet, il est nécessaire de vérifier qu'une seule bande a bien été excisée avant de purifier cet échantillon en vue du clonage. Sur notre gel (fig. III-10), nous pouvons observer que 19 bandes sont pures et peuvent donc être purifiées directement à partir de leur échantillon PCR, par contre on remarque des bandes supplémentaires pour les échantillons n° 11, 20 et 21. Ces 3 bandes seront dès lors excisées du gel d'agarose et purifiées à partir de celui-ci. Une photo est ensuite réalisée afin de vérifier l'excision (fig. III-11).



**Fig. III-12 :** Vérification de la présence d'un insert dans les plasmides par restriction Eco RI.

Les n° correspondent au numéro d'ordre des bandes (cf. fig III-8)

a = rapport de concentrations insert : plasmide = 3 : 1

b = rapport de concentrations insert : plasmide = 1 : 1

Chaque piste correspond à un clone différent



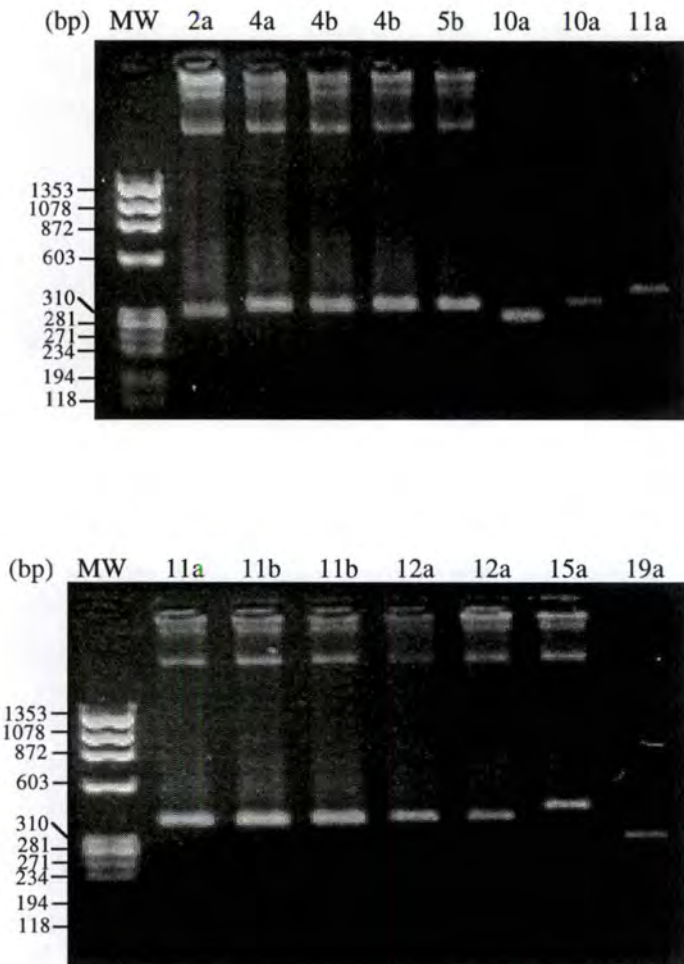


Fig. III-13 : Réamplification des inserts clonés dans le vecteur pGEMT-easy par PCR en utilisant les amorces M13 situées de part et d' autre du site de clonage. Tous les inserts clonés ont bien été réamplifiés et vont être séquencés.

Les n° correspondent au numéro d' ordre des bandes (cf. fig III-8)

a = rapport de concentrations insert : plasmide = 3 : 1

b = rapport de concentrations insert : plasmide = 1 : 1

n°	n° bande	transcrit identifié	sens de la variation			
			CTL	t-BHP	EtOH	Sén.
2	3C1	p34-Arc	•			
4	3T1	SAP 145		•		•
5	10A1	non séquencé	•			
10	13G4	Rad 17	•			
11	14C1	EST fibroblast senescent			•	•
12	14T4	EST thyroid	•			
15	15T1	non séquencé			•	•
19	21A2	KNP-I			•	•

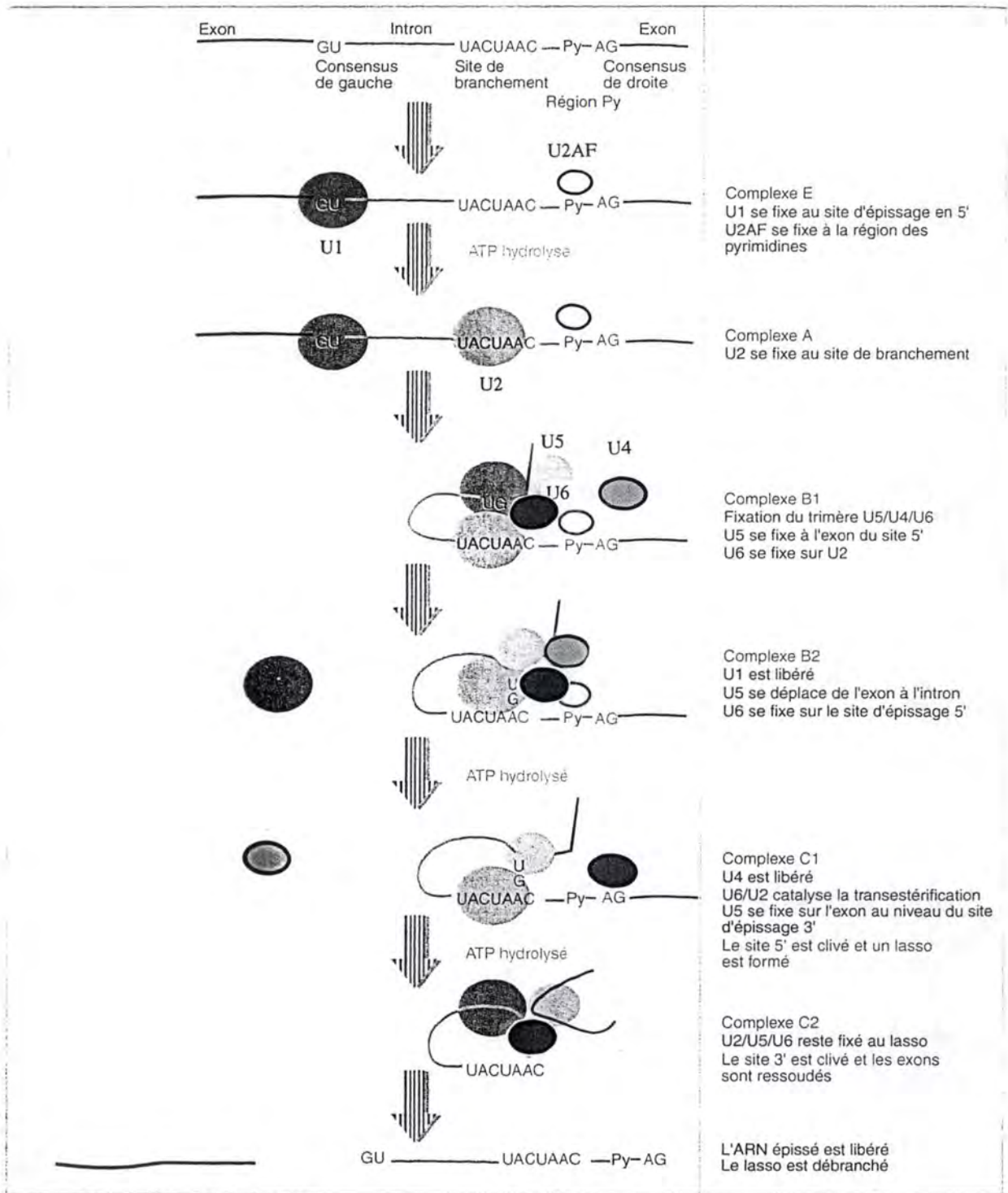
Fig. III-14 : Tableau reprenant le numéro des bandes excisées, le transcrit identifié suite au séquençage ainsi que le sens de la variation (un point indique une sur-expression de la bande)

### 2.1.e. Clonage et séquençage des bandes d'intérêt

Une fois les échantillons purifiés, nous pouvons les insérer par ligation dans le plasmide pGEMT-easy. Nous avons testé 2 rapports de concentration inserts:plasmide, 1:1 et 3:1. Le plasmide est ensuite introduit dans des bactéries *E. Coli Sure* rendues compétentes avec du CaCl<sub>2</sub> puis transformées par la technique du choc thermique. La sélection est ensuite réalisée sur milieu additionné d'Ampicilline et de x-gal. En effet, le vecteur pGEMT-easy permet une sélection supplémentaire dite blanc-bleue suivant que l'insert a été ou non incorporé dans le vecteur. Les colonies dont le vecteur ne contient pas d'insert deviendront bleues sur milieu x-gal, tandis que les autres resteront blanches. Les colonies blanches sont ensuite récupérées et mises en culture liquide dans du milieu LB + Amp.

Des mini-préparations d'ADN plasmidique sont ensuite réalisées, et nous récupérons l'ADN plasmidique tel que cela a déjà été décrit dans le Matériels et Méthodes. Connaissant l'ensemble des sites de restriction du vecteur, nous avons réalisés des restrictions par l'enzyme EcoRI afin de vérifier si nos inserts ont bien amplifiés dans le vecteur. Les profils de restriction, réalisés sur gel d'agarose 2%, montrent que 15 inserts ont bien été amplifiés (fig III-12), ceux-ci correspondent à 8 clones différents. De plus, nous avons utilisé une autre méthode consistant en la réamplification de l'insert par les amorces M13, situées de part et d'autre du site de clonage (fig. III-13). Ceux-ci ont été ensuite séquencés (cfr. séquences complètes en annexe) et comparés aux séquences présentes dans le programme BLAST disponible sur internet. Voici un tableau reprenant l'ensemble des résultats obtenus :





**Fig. III-15 :** Schéma général de la maturation de l'ARN-m par la particule d'épissage ou spliceosome. (Lewin, 1998)

## 2.1.f. Description des gènes correspondants aux fragments d'ADN identifiés lors du séquençage

### 1. SAP 145

La protéine SAP 145 (Spliceosome Associated Protein) intervient dans la constitution du spliceosome ou particule d'épissage, lors de la maturation de l'ARN-m. D'autres protéines SAP interviennent avec elle dans la composition des facteurs d'épissage SF3a (SAPs 61, 62 et 114) et SF3b (SAPs 49, 130, 145 et 155) associées à la particule ribonucléoprotéique (RNPs<sub>sn</sub>) U2 (Staknis, D. *et al*, 1994). La RNPs<sub>sn</sub> U2, constituée de ces protéines et de l'ARN<sub>sn</sub> U2, interagit lors de la formation du complexe A (fig. III-15) avec le site de branchement, site bien conservé lors de l'évolution et se trouvant dans l'intron. Cette reconnaissance se fait via l'ARN<sub>sn</sub> U2 et est capitale pour les étapes suivantes car elle engendre une conformation réactionnelle des bases impliquées dans l'épissage (fig. III-16).

Les protéines SAP, capables de reconnaître l'ARN, peuvent s'y attacher et leur rôle serait donc, probablement de stabiliser le complexe entre le pré-ARN-m et la RNPs<sub>sn</sub> U2 (Gozani, O. *et al*, 1998).

### 2. KNP-I

Ce gène, dont la fonction exacte n'est pas encore connue, se trouve sur le chromosome 21 humain en position 21q22.3 (Nagamine, K. *et al*, 1996). Homologue du gène bactérien d'*E. Coli* SCR<sub>P</sub>-27A, ce gène est exprimé dans une grande partie des tissus humains et apparaît comme un gène qui pourrait être impliqué dans une fonction cellulaire de base.

Sa protéine KNP-I semble contenir une séquence d'adressage vers la mitochondrie dans sa région N-terminale. De plus, il a été montré que son expression était plus importante dans le cœur, le muscle squelettique et le foie, organes dans lesquels le nombre de mitochondries est supposé

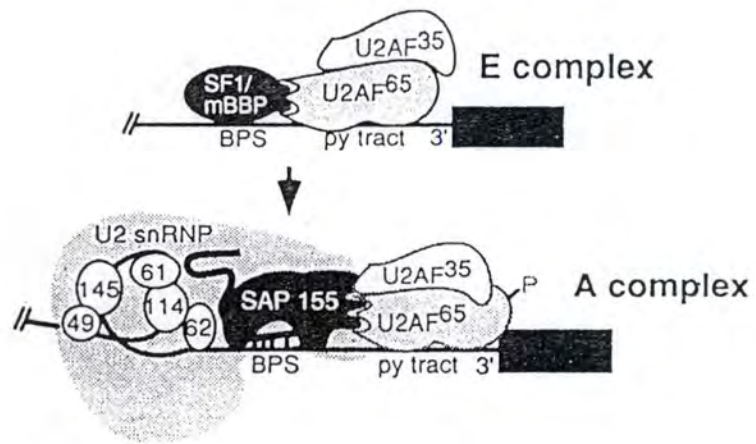


Fig. III-16 : Modèle de recrutement de la RNPsn U2.  
(Gozani, O. *et al*, 1998)

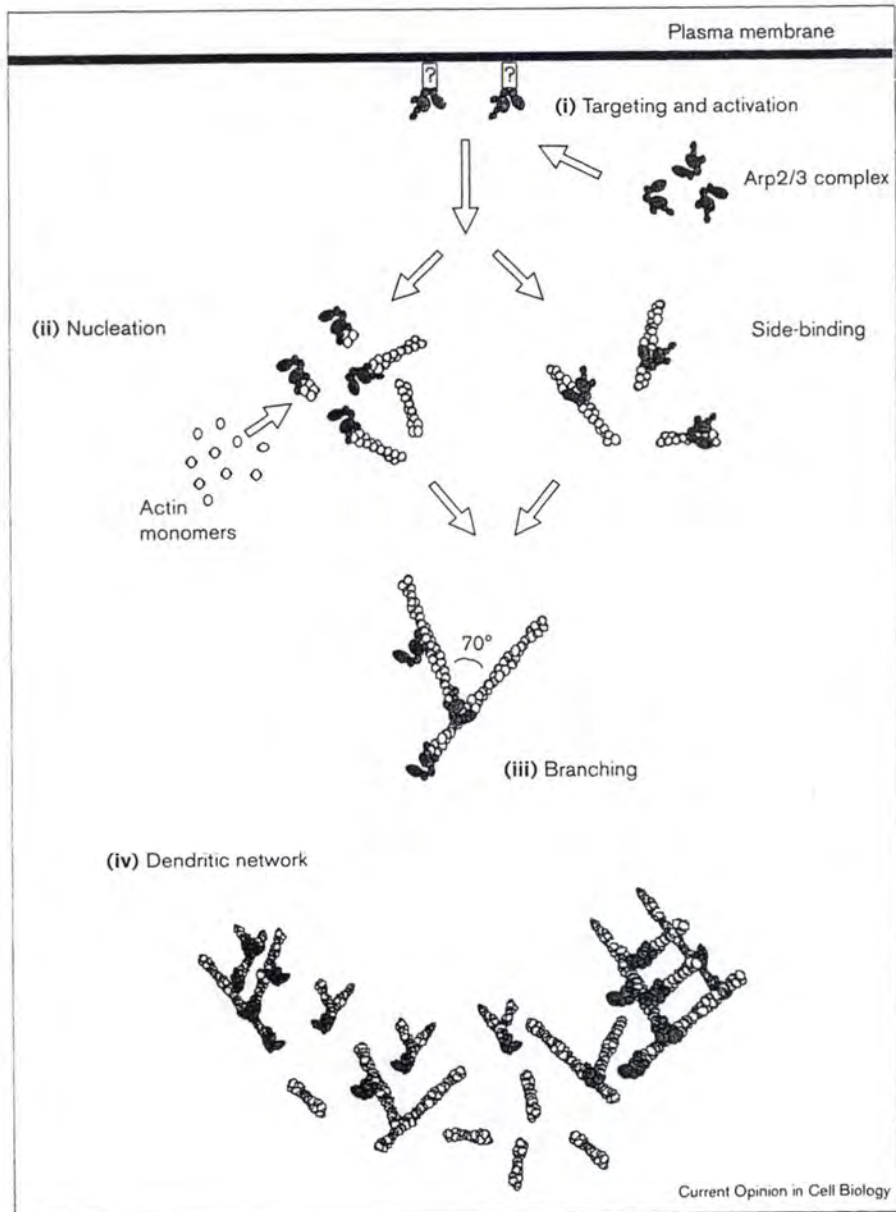


Fig. III-17 : Schéma reprenant les différents rôles du complexe Arp2/3 *in vitro* dans la polymérisation et l'organisation de l'actine.  
(Machesky, L. et Gould, K., 1999)



élevé, ce qui suggère aussi une relation de cette protéine avec la mitochondrie.

Enfin, se situant dans une région chromosomique où sont localisées plusieurs maladies comme la maladie polyglandulaire auto-immune de type I (APECED), l'holoprosencéphale (HPE) et l'épilepsie myoclonale de type I (EPMI), ce gène est présenté comme candidat potentiel fragile pouvant être affecté dans celles-ci.

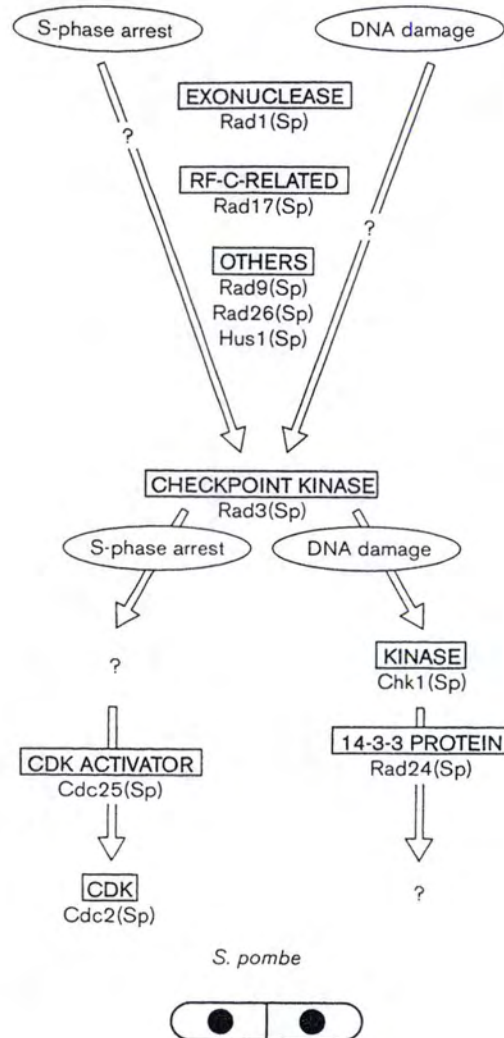
### 3. p34-Arc

Le gène *p34-Arc* code pour une protéine intervenant comme sous-unité du complexe Arp2/3.

*In vitro*, il a été montré que ce complexe semblait stable et qu'il intervenait dans l'augmentation de la polymérisation des monomères d'actine et dans l'organisation des filaments d'actine en structure tri-dimensionnelle (Mullins, R. *et al*, 1998). Le modèle proposé est le suivant (fig. III-17) : dans un premier temps, le complexe Arp2/3 serait activé et envoyé à un site de polymérisation d'actine par un mécanisme encore inconnu (peut-être via les WASP protéines). Une fois sur place, il est capable de s'associer à un monomère d'actine et de stimuler la polymérisation. De plus, il a la capacité de pouvoir s'attacher à des filaments d'actine déjà formés. Suite à ces différentes propriétés, il se forme des branchements entre le complexe Arp2/3 et l'actine jusqu'à la formation d'un réseau 3D. *In vivo*, ce mécanisme semble modifié en ce sens que la profiline se fixerait d'abord au complexe Arp2/3 puis induirait la capture de monomères d'actine et l'induction de leur polymérisation.

### 4. Rad 17

Ce gène est l'homologue du gène *rad17+* présent chez *S. Pombe* (Bluyssen, H. *et al*, 1999). Ce gène est bien conservé au long de l'évolution et semble jouer un rôle dans le contrôle de l'arrêt du cycle cellulaire en phase S lorsque des dommages sont détectables sur l'ADN (fig. III-18). De



**Fig. III-18 :** Schéma général reprenant les différents points de contrôle du cycle cellulaire chez *S. Pombe*, montrant notamment l'emplacement du contrôle de rad17+.  
(Stewart, *et al*, 1996)

plus, sa protéine rad17+ provoque l'arrêt du cycle en G2/M lorsque la réplication est incomplète (Stewart, E. *et al*, 1996). Cette protéine possède plusieurs domaines homologues au facteur de réplication RF-C : un domaine de liaison aux nucléotides (walker A) et un site catalytique de liaison de métal (walker B). Il est probable que Rad17 joue un rôle semblable à RF-C qui est responsable de la liaison de l'ADN polymérase  $\delta$  et  $\epsilon$  à l'ADN.

## 5. EST

Deux EST (expressed sequence tag) ont également été retrouvées, une qui a été isolée au niveau de la glande thyroïde humaine et une autre qui a été isolée chez des fibroblastes humains sénescents. Malheureusement, aucune information supplémentaire n'a pu être retrouvée les concernant.

## 2.2. Discussion

Au niveau de l'interprétation des résultats, il faut être prudent. En effet, ceux-ci doivent encore être vérifiés par d'autres techniques d'analyse différentielle telles que le Northern blot ou les biochips. Notons qu'en ce qui concerne ces derniers, il serait envisageable d'en réaliser en utilisant comme trappeurs les séquences obtenues suite au clonage des candidats. Ensuite, nous pourrions mettre ces biochips en contact avec différents extraits cellulaires ("jour 0", "contrôle", "t-BHP", "EtOH" et "sénescents") afin de vérifier les expressions différentielles de ces gènes.

De plus, une vérification supplémentaire à effectuer sera de comparer l'expression de ces gènes avec les cellules "jour 0", qui, pour des raisons essentiellement techniques, n'ont pu être analysées sur gel avec les autres populations cellulaires testées.



Toutefois, nous pouvons émettre certaines hypothèses suite aux premiers résultats obtenus.

Tout d'abord, pour les 2 EST qui ont été isolées, nous ne pouvons guère nous approfondir car les connaissances établies les concernant ne sont encore que très peu informatives. Cependant, nous pouvons nous intéresser d'un peu plus près à l'EST isolée chez des fibroblastes humains sénescents et qui semble y être sur-exprimée. Dans nos résultats, celle-ci correspond à la bande d'intérêt 11 (14C1) sur-exprimée chez les cellules stressées à l'éthanol et les cellules sénescents. Lorsque l'expression différentielle de cette EST sera vérifiée, des recherches plus poussées la concernant seront sans aucun doute extrêmement intéressantes à réaliser et constituent une des perspectives possibles de ce travail.

En ce qui concerne le gène *SAP 145*, dont la protéine intervient dans la constitution du spliceosome, son expression semble augmenter chez les cellules soumises au t-BHP et les cellules sénescents. Ici, nous pouvons nous référer à des résultats obtenus par d'autres équipes concernant la maturation de l'ARN au cours du vieillissement. En effet, il se trouve que certains ARN-m sont épissés d'une façon différente lors du vieillissement. Nous pouvons citer ici l'exemple de la fibronectine dont l'ARN-m est épissé de manière différente lors du vieillissement (Magnuson, V. et al, 1991). De ce fait, il ne semble pas surprenant de retrouver des modifications de l'expression de gènes impliqués dans le mécanisme d'épissage au cours du vieillissement.

Pour le gène *KNP-I*, qui semble surexprimé chez les cellules stressées à l'éthanol et chez les cellules sénescents, son rôle n'est pas encore assez connu pour qu'on puisse émettre des hypothèses quant à son implication dans le vieillissement cellulaire. Malgré tout, le fait qu'il y ait apparemment un lien entre sa protéine et la mitochondrie a particulièrement attiré notre attention. En effet, de nombreux changements (délétions, mutations, expression de certaines protéines) touchent la mitochondrie au cours du vieillissement. *KNP-I* pourrait avoir un rôle régulateur dans ces processus au cours du vieillissement.

Au niveau de l'expression différentielle du gène *p34-Arc* qui apparaît comme un gène sur-exprimé chez les cellules "contrôle", nous pouvons penser que ce gène est inhibé lors des stress et du vieillissement. Ceci entraînerait donc une expression moindre de sa protéine et donc une désorganisation structurale de l'actine. Une telle désorganisation pourrait avoir des conséquences sur la mobilité cellulaire, dont on sait qu'elle diminue chez les cellules âgées.

Enfin, concernant le gène *Rad17*, celui-ci semble apparemment sur-exprimé dans les cellules "contrôle". Comme son rôle défini jusque maintenant l'implique dans l'arrêt du cycle cellulaire, nous pouvons émettre l'hypothèse que celui-ci serait en fait sur-exprimé suite à l'inhibition de contact chez ces cellules arrivées à confluence. Une autre hypothèse serait que cette protéine serait exprimée constitutivement chez toutes les cellules arrivées à confluence, mais serait réprimée chez les cellules stressées et sénescents.

*Conclusions*  
*et*  
*perspectives*



Avant de terminer ce travail, nous pouvons discuter des différentes perspectives engendrées par celui-ci.

Tout d'abord, il faudra vérifier ces expressions différentielles par une autre technique d'analyse comme le Northern blot et les biochips. Une biochips pourrait être mise au point pour cela comme cela a été précédemment expliqué lors de la discussion des résultats.

Ensuite, on pourra terminer le clonage, le séquençage et l'identification des 16 autres bandes qui n'ont pu être menées à terme pour ce travail.

Dans la même veine, nous pourrons également effectuer le même travail avec les 134 bandes que nous n'avons pas analysées dans le cadre de ce travail.

Ainsi, même si nous savons que nous n'arriverons probablement pas à l'identification de 156 gènes candidats différents, ne fût-ce que pour des raisons de "recoupement" des amorces arbitraires tel que nous l'avons déjà mentionné au début de ce travail. Néanmoins, nous trouverons tout de même un certains nombre de gènes dont l'expression varie dans nos conditions expérimentales. Et suite à cela, nous pourrons établir une liste des gènes exprimés de façon différentielle lors des stress et/ou du vieillissement normal par rapport aux cellules jeunes.

Nous pourrons alors comparer ces résultats que nous avons obtenus à partir de l'expression des ARN-m dans ces cellules avec d'autres résultats. Une recherche actuellement en cours au laboratoire vise à trouver des différences dans l'expression protéique par analyse de protéomes dans le même modèle cellulaire avec les mêmes types de stress que ceux que nous utilisons dans nos travaux .

Ainsi, on pourrait avoir une vision globale des modifications intervenant lors du vieillissement cellulaire normal ou accéléré *in vitro*. Et ceci pourrait avoir une série d'applications différentes.

Tout d'abord, ceci pourrait servir dans l'étude d'autres types de stress sur les fibroblastes. On pourrait ainsi mettre en évidence des gènes

dont l'expression est modifiée soit de manière différentielle entre les cellules ayant subi des stress différents par rapport aux cellules jeunes, soit de manière commune entre les cellules sénescents et stressées par rapport aux jeunes.

Ensuite, on pourrait élargir cette vision à d'autres types cellulaires et comparer l'effet des stress sur ceux-ci. Ainsi, on pourrait étudier l'effet de ces stress sur des cellules de type prolifératif (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses mais aussi ostéoblastes, chondrocytes, entérocytes). On peut aussi envisager des modèles de stress non létaux sur des types cellulaires non prolifératifs tels que les cellules nerveuses.

On pourra également mettre en évidence des différences dans la réaction de ces différents types cellulaires aux stress que nous utilisons sur les fibroblastes. En effet, on sait déjà qu'il existe des différences, par exemple, sur le stress à l'éthanol entre les fibroblastes et les hépatocytes. Ainsi, chez les fibroblastes, il s'agit surtout d'un stress osmotique et de modifications de fluidité membranaire, tandis que chez les hépatocytes, l'éthanol agit comme un stress radicalaire via sa dégradation par le cytochrome p450 (non présent chez les fibroblastes), qui génère lors de son cycle de dégradation, des radicaux libres.

On peut également noter qu'une autre suite à ce travail serait de cloner et d'identifier les séquences pour lesquelles aucune information n'est connue et donc essayer de trouver la fonction de ces gènes et leur éventuelle implication dans le vieillissement.

Enfin, suite à ces différentes recherches, on pourrait peut-être élucider certaines interrogations comme les mécanismes moléculaires exacts se produisant suite aux stress et/ou à la sénescence et rechercher d'éventuelles voies de transduction du signal.

De plus, on pourrait rechercher des explications possibles à certaines observations qui ont déjà été réalisées sur les cellules sénescents comme leur différenciation terminale (Campisi, J. *et al*, 1996), leur destruction, leur accumulation dans les tissus. Par exemple, la destruction possible de ces cellules sénescents est souvent présentée comme responsable de micro-inflammations dues à l'activation des



macrophages venant les détruire (Giacomoni, P. et D'Alessio, P., 1996). Ces cellules sénescents sont aussi peut-être liées aux pathologies associées à la sénescence au vu de leur impossibilité à proliférer, de leur résistance à l'apoptose et de leur phénotype différencié altéré (comme par exemple la synthèse d'Il-6 par les fibroblastes sénescents).



# *Bibliographie*

- Afshari, C. & Barrett, J. (1996). Molecular genetics of *in vitro* cellular senescence. In *Cellular aging and cell death* (ed. N. Holbrook, G. Martin and R. Lockshin). John Wiley & Sons, New York.
- Bayreuther, K., Rodemann, H. P., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M. & Francz, P. I. (1988). Human skin fibroblasts *in vitro* differentiate along a terminal cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5112-5116.
- Bluyssen, H., Naus, N., van Os, R., Jaspers, I., Hoeijmakers, J. & de Klein, A. (1999). Human and mouse homologs of the *Schizosaccharomyces pombe* rad17+ cell cycle checkpoint control gene. *Genomics* **55**, 219-228.
- Bodnar, A., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S., Chiu, C., Morin, G., Harley, C., Shay, J., Lichtsteiner, S. & Wright, W. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349-352.
- Campisi, J., Dimri, G. & Hara, E. (1996). Control of the replicative senescence. In *Handbook of the Biology of Aging*, vol. 4 (ed. J.N.), pp. 121-149. Holbrook, San Diego.
- Colonna-Romano, S., Leone, A. & Maresca, B. (1998). *Differential-display reverse transcription-PCR (DDRT-PCR)*. Springer.
- Cutler, R. G. (1991). Recent progress in testing the longevity determinant and dysdifferentiation hypotheses of aging. *Arch. Gerontol. Geriatr* **12**, 75-98.
- Diatchenko, L., Lau, Y.-F. C., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, G., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverlov, E. D. & Siebert, P. D. (1996). Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6025-6030.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubeli, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M. & 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.
- Giacomini, P. & D'Alessio, P. (1996). Skin ageing : the relevance of antioxidants. In *Molecular gerontology : research status and strategies* (ed. S. Rattan and O. Toussaint). Plenum press, New York.
- Gonos, E. S., Deventzi, A., Kveiborg, M., Agiostratidou, G., Kassen, M., Clark, B. F. C., Jat, P. S. & Rattan, S. I. S. (1998). Cloning and identification of genes that are associate with mammalian replicative senescence. *Exp. Cell Res.* **240**, 66-74.
- Gozani, O., Potashkin, J. & Reed, R. (1998). A potential role for U2AF-SAP 155 interactions in recruiting U2 snRNP to the branch site. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4752-4760.
- Greider, C. & Harley, C. (1996). Cellular aging and cell death. In *Cellular aging and cell death* (ed. N. J. Holbrook, G. R. Martin and R. A. Lockshin). Wiley and Sons, New York.
- Harley, C., Futcher, A. & Greider, C. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**, 298-300.
- Harman, D. (1998). Extending functional life span. *Exp. Gerontol.* **33**, 95-112.
- Hayflick, L. (1985). Theories of biological aging. *Exp. Gerontology* **20**, 145-159.



- Hayflick, L. (1996). *How and why we age*, Ballantine books edition, New York.
- Hayflick, L. & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res* **25**, 585-621.
- Kanungo, M. S. (1980). *Biochemistry of aging*. Academic Press, New-York.
- Kirkwood, T. B. L. & Cremer, T. (1982). Cytoogerontology since 1881: a reappraisal of August Weismann and a review of modern progress. *Human Genetics* **60**, 101-121.
- Kozian, D. H. & Kirschbaum, B. J. (1999). Comparative gene-expression analysis. *Tibtech*. **17**, 73-78.
- Lewin, B. (1999). *Genes VI*. De Boeck Université, Bruxelles.
- Liang, P. & Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-71.
- Liang, P. & Pardee, A. B. (1995). Recent advances in differential display. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 274-80.
- Linskens, M. H. K., Feng, J., Andrews, W. H., Enlow, B. E., Saati, S. M., Tonkin, L. A., Funk, W. D. & Villeponteau, B. (1995). Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display. *Nucl. Acids Res.* **23**, 3244-3251.
- Lisitsyn, N., Lisitsyn, N. & Wigler, M. (1993). Cloning the differences between two complex genomes. *Science* **259**, 946-951.
- Lowry, O., Rosebrought, N., Farr, A. & Randall, R. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Luce, M. C. & Bunn, C. L. (1989). Decreased accuracy of protein synthesis in extracts from aging human diploid fibroblasts. *Exp. Gerontol.* **1989**, 113-118.
- Machesky, L. & Gould, K. (1999). The Arp2/3 complex : a multifunctional actin organizer. *Cur. Opin. Cell Biol.* **11**, 117-121.
- Magnuson, V., Young, M., Schattenberg, D., Mancini, M., Chen, D., Steffensen, B. & Klebe, R. (1991). The alternative splicing of fibronectine pre-mRNA is altered during aging and in response to growth factor. *J. Biol. Chem.* **266**, 14654-62.
- Matz, M. V. & Lukyanov, S. A. (1998). Different strategies of differential displays: areas of application. *Nucl. Acids Res.* **26**, 5537-5543.
- Medvedev, Z. A. (1990). An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Physiol. Rev.* **65**, 375-398.
- Mullins, R., Heuser, J. & Pollard, T. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin : nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Sci. USA* **95**, 6181-6186.
- Nagamine, K., Kudocho, J., Minoshima, S., Kawasaki, K., Asakawa, S., Ito, F. & Shmizu, N. (1996). Isolation of cDNA for a novel human protein KNP-I that is homologous to the E. Coli SCRP-27A protein from the autoimmune polyglandular disease type I (APECED) region of chromosome 21q22.3. *Bioch. Biophys. Res. Com.* **225**, 608-616.
- Orgel, L. E. (1963). The maintenance of accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **67**, 517-521.
- Orgel, L. E. (1973). Ageing of clones of mammalian cells. *Nature* **243**, 441-445.
- Poot, M. (1991). Oxidant and antioxidant in proliferative senescence. *Mut. Res* **256**, 177-190.



- Remacle, J., Houbion, A. & Houben, A. (1980). Subcellular fractionation of WI-38 fibroblasts. Comparison between young and old cells. *Biochim. Biophys. Acta* **630**, 57-70.
- Remacle, J., Raes, M., Corbisier, P., Pigeolet, E., Michiels, C., Houbion, A. & Lambert, D. (1990). A tentative unification of cellular theories of ageing. In *The theoretical basis of aging research* (ed. M. Robert and G. Hofecker), pp. 83-90. Proceedings of the 7th Wiener symposium, Facultas Verlag Wien, Wien.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. & Brown, P. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470.
- Staknis, D. & Reed, R. (1994). Direct interactions between pre-mRNA and six U2 small nuclear ribonucleoproteins during spliceosome assembly. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2994-3005.
- Stewart, E. & Enoch, T. (1996). S-phase and DNA-damage checkpoints : a table of two yeasts. *Cur. Opin. Cell Biol.* **8**, 781-787.
- Strehler, B. L. (1986). Genetic instability as the primary cause of human aging. *Exp. Gerontol.* **21**, 283-319.
- Toussaint, O. (1992c). Approche globale du vieillissement cellulaire à partir de la théorie des systèmes ouverts, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix.
- Toussaint, O., Fuchs, S. Y., Ronai, Z. A., Isoyama, S., Yuko, N., Petronilli, V., Bernardi, P., Gonos, E. S., Dumont, P. & Remacle, J. (1998). Reciprocal relationships between the resistance to stresses and cellular ageing. In *Stress of Life: From Molecules to Man*, vol. 851, pp. 450-464. Annals of the New-York Academy of Sciences, New-York.
- Toussaint, O., Houbion, A. & Remacle, J. (1992b). Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture. *Mech. Ageing Dev.* **65**, 65-83.
- Toussaint, O., Houbion, A. & Remacle, J. (1994b). Effects of modulations of the energetic metabolism on the mortality of cultured cells. *Bioch. Biophys. Acta* **1186**, 209-220.
- Toussaint, O., Raes, M., Pigeolet, E., Michiels, C. & Remacle, J. (1992a). Failures to increase the maximum *in vitro* life-span of human fibroblasts and some theoretical justifications. Experimental arguments in favour of the concept of critical threshold of error accumulation. In *Modification of the rate of aging* (ed. A. Ruiz-Torres and G. Hofecker), pp. 25-32. Facultas Verlag Wien, Wien.
- Toussaint, O., Raes, M. & Remacle, J. (1991). Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. *Mech. Ageing Dev.* **61**, 45-64.
- Toussaint, O. & Remacle, J. (1994a). Arguments en faveur du concept de seuil critique d'accumulation d'erreurs dans la mort cellulaire qualités et limites de ce concept dans le vieillissement cellulaire. *Path. Biol.* **42**, 305-311.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. (1995). Serial Analysis of Gene Expression. *Science* **270**, 484-487.
- Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Döcke, W. & Lotze, C. (1995). Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp. Cell Res.* **220**, 186-193.

Westendorp, G. J. R. & Kirkwood, T. B. L. (1998). Human longevity at the cost of reproductive success. *Nature* **396**, 743-746.

# *Annexes*





Model 377  
Version 2.1.1

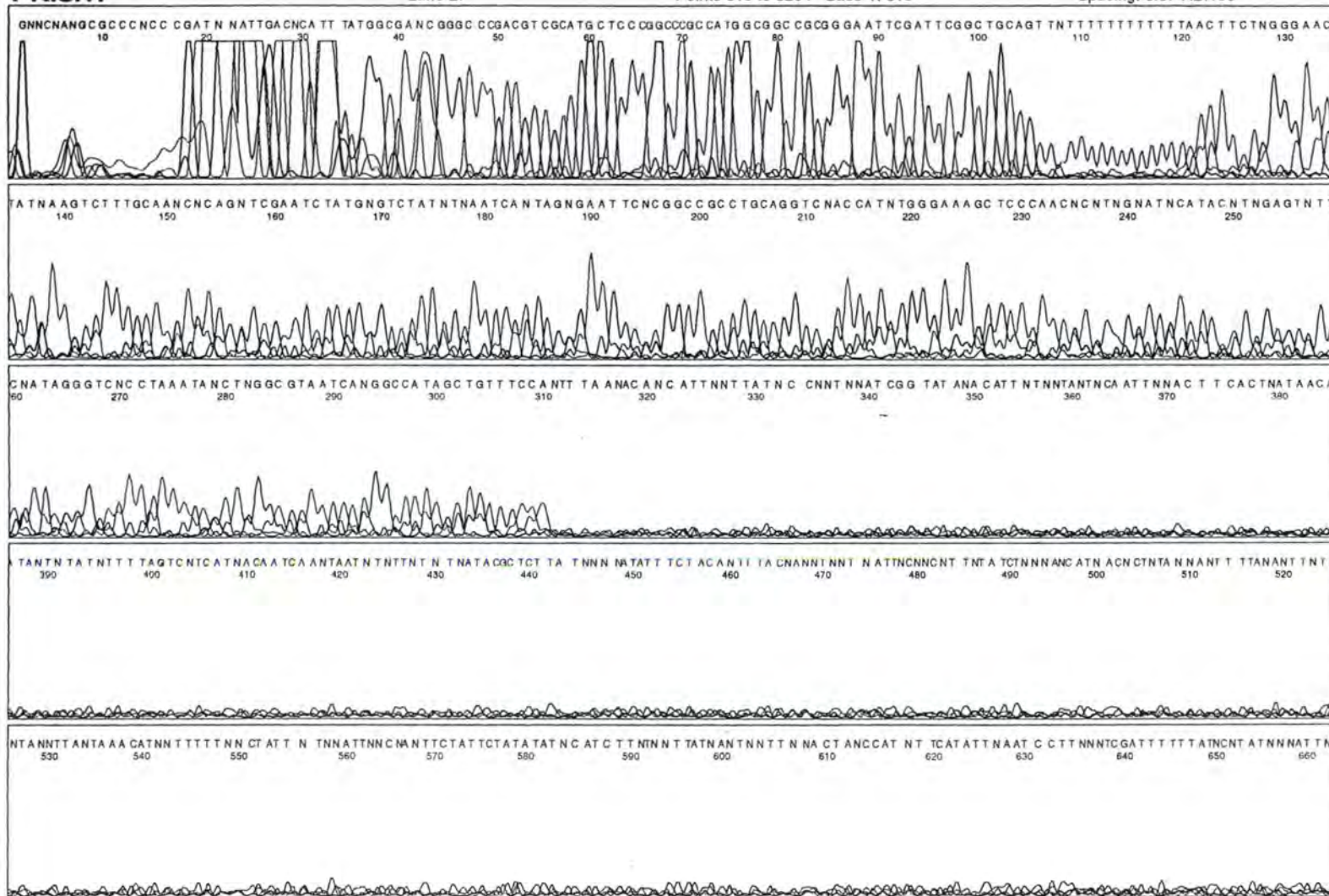
27\*1 thierry

1 thierry  
Lane 27

Signal G:60 A:37 T:58 C:58  
DT (BD Set Any-Primer)  
dRhod  
Points 819 to 8264 Base 1: 819

Mar 1 juin 1999 9:33  
Lun 31 mai 1999 11:57  
Spacing: 8.57 ABI100

Page 1 of 2



Annexe 1 : Séquence de la bande d'intérêt n°2 (3C1) après réamplification avec les amorces M13.



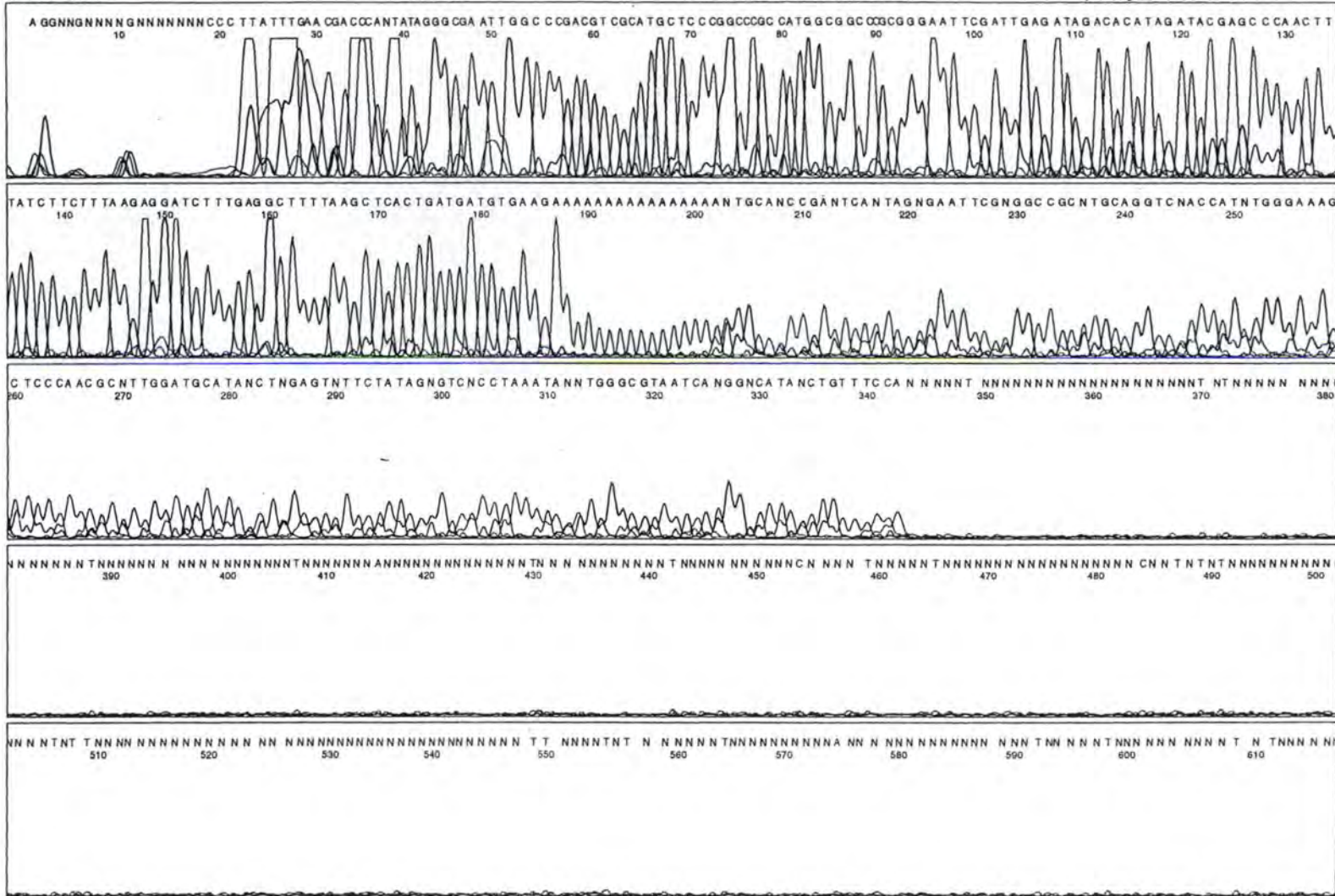
Model 377  
Version 2.1.1

28\*2 thierry

2 thierry  
Lane 28

Signal G:105 A:80 T:86 C:100  
DT (BD Set Any-Primer)  
dRhod  
Points 801 to 8264 Base 1: 801

Page 1 of 2  
Mar 1 juin 1999 9:33  
Lun 31 mai 1999 11:57  
Spacing: 8.45 ABI100



Annexe 2 : Séquence de la bande d'intérêt n°4 (3T1) après réamplification avec les amorces M13.





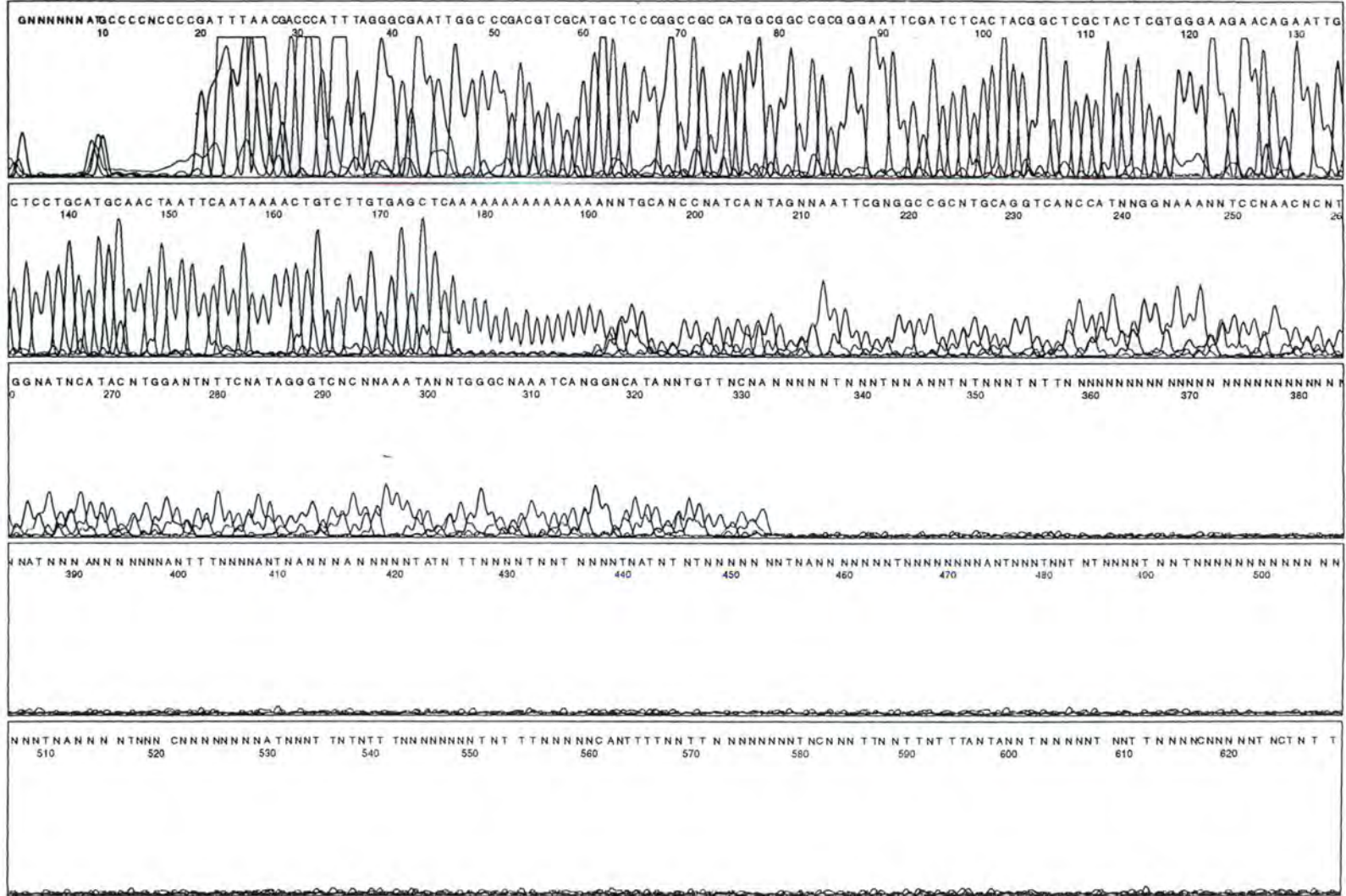
Model 377  
Version 2.1.1

29\*3 thierry

3 thierry  
Lane 29

Signal G:112 A:73 T:91 C:106  
DT (BD Set Any-Primer)  
dRhod  
Points 812 to 8264 Base 1: 812

Page 1 of 2  
Mar 1 juin 1999 9:33  
Lun 31 mai 1999 11:57  
Spacing: 8.57 ABI100



Annexe 3: Séquence de la bande d'intérêt n°5 (10A1) après réamplification avec les amorces M13.





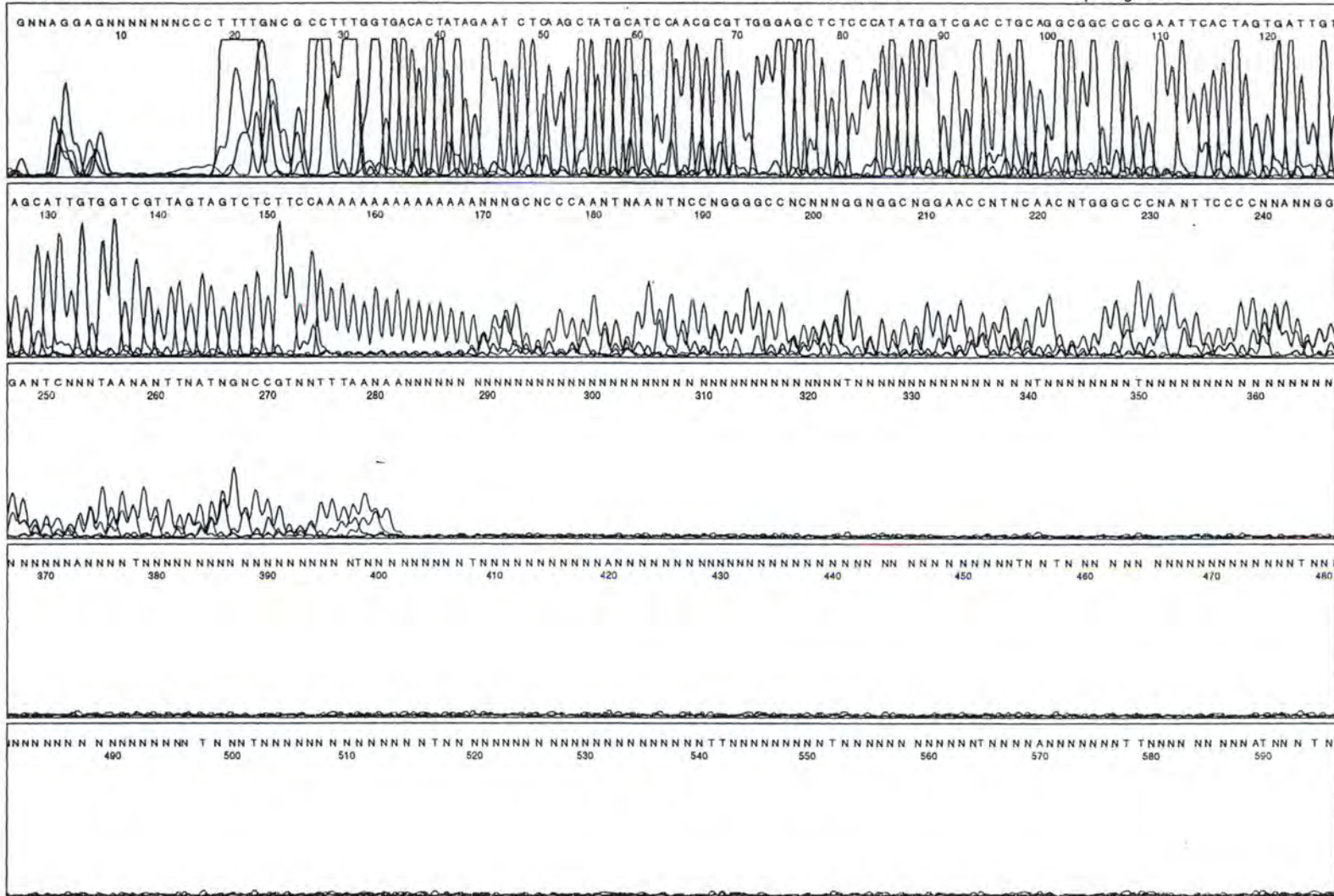
Model 377  
Version 2.1.1

04•13

13  
Lane 4

Signal G:127 A:84 T:101 C:126  
DT (BD Set Any-Primer)  
dRhod  
Points 787 to 8264 Base 1: 787

Page 1 of 2  
Mer 2 juin 1999 9:25  
Mar 1 juin 1999 14:23  
Spacing: 8.47 ABI100



Annexe 4 : Séquence de la bande d'intérêt n°10 (13G4) après réamplification avec les amorces M13.



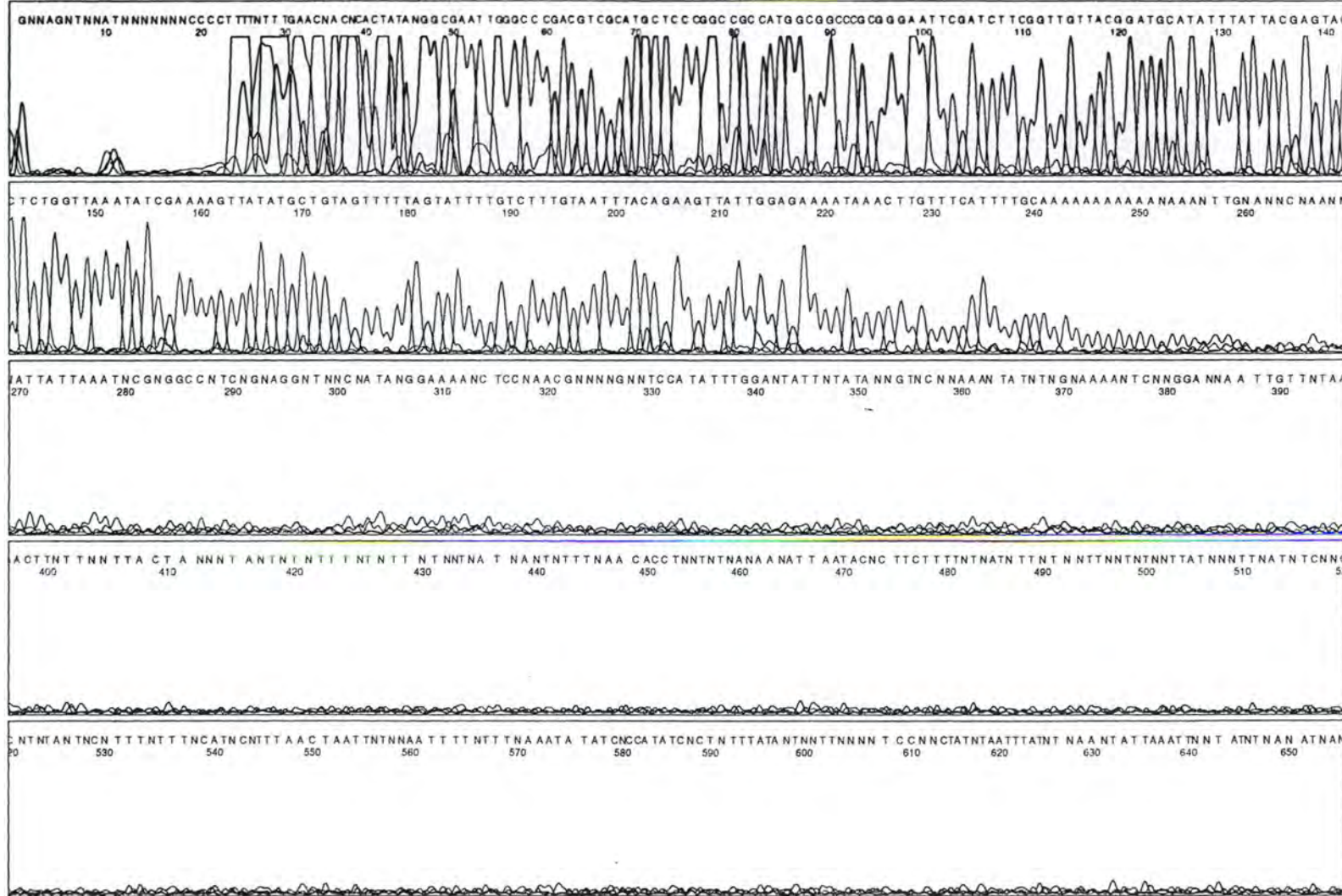
Model 377  
Version 2.1.1

32\*6 thierry  
6 thierry  
Lane 32

Signal G:69 A:45 T:58 C:62  
DT (BD Set Any-Primer)  
dRhod  
Points 805 to 8264 Base 1: 805

Page 1 of 2

Mar 1 juin 1999 9:33  
Lun 31 mai 1999 11:57  
Spacing: 8.65 ABI100



Annexe 5: Séquence de la bande d'intérêt n°11 (14C1) après réamplification avec les amorces M13.





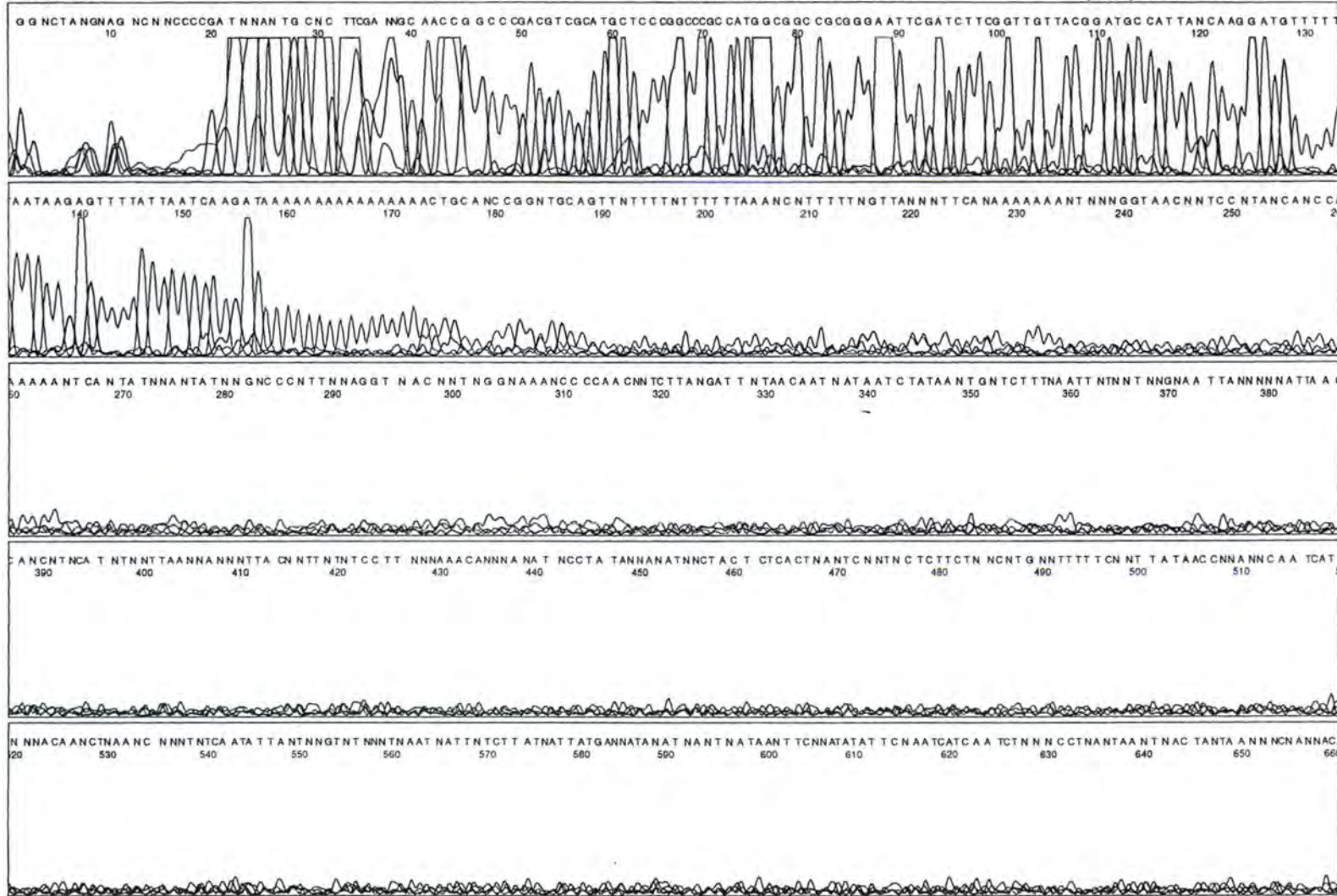
Model 377  
Version 2.1.1

33\*7 thierry

7 thierry  
Lane 33

Signal G:47 A:34 T:49 C:53  
DT (BD Set Any-Primer)  
dRhod  
Points 804 to 8264 Base 1: 804

Page 1 of 2  
Mar 1 juin 1999 9:33  
Lun 31 mai 1999 11:57  
Spacing: 8.58 ABI100



Annexe 6: Séquence de la bande d'intérêt n°12 (14T4) après réamplification avec les amorces M13.





Model 377  
Version 2.1.1

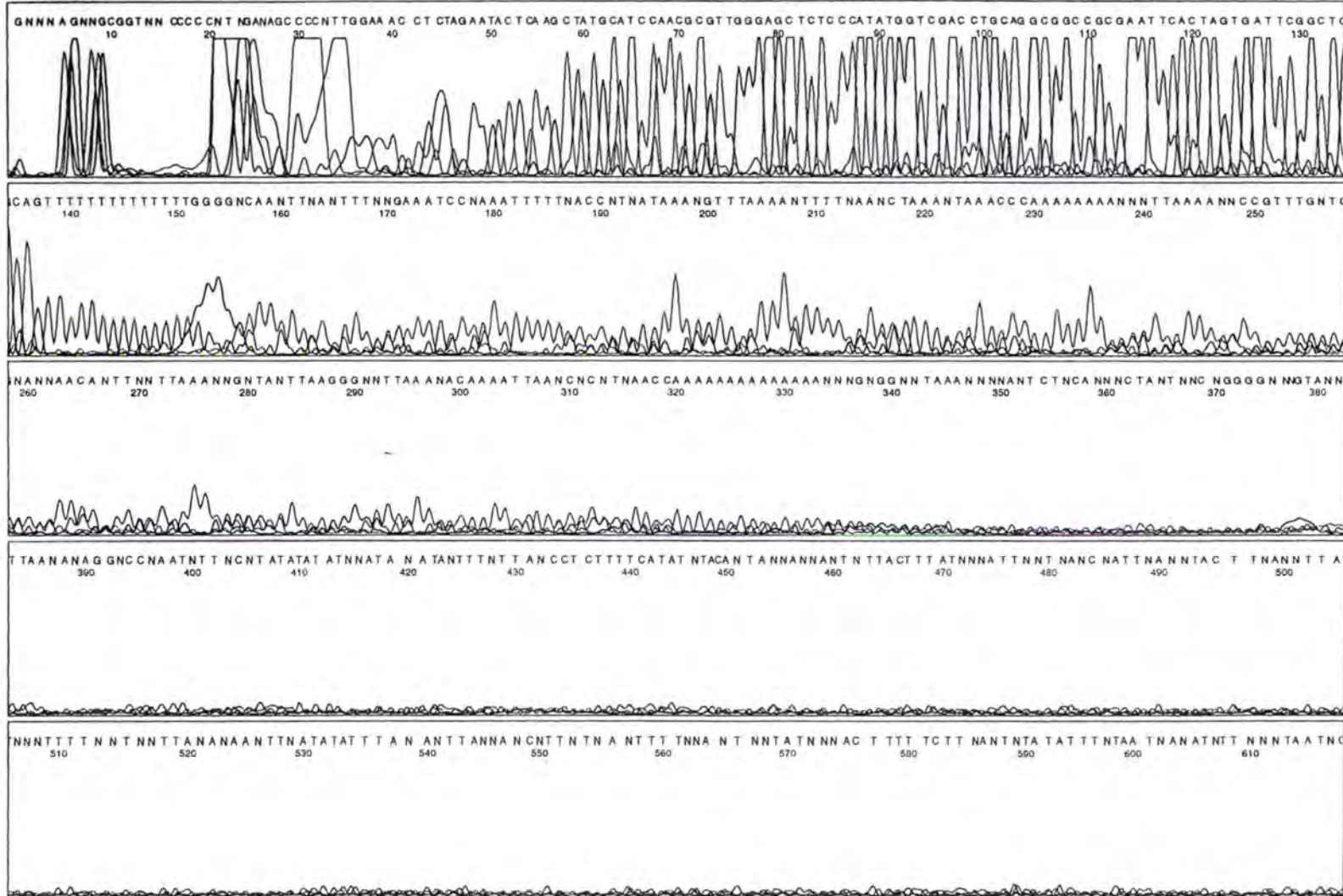
06-16

16  
Lane 6

Signal G:82 A:52 T:70 C:78  
DT (BD Set Any-Primer)  
dRhod  
Points 787 to 8264 Base 1: 787

Mer 2 juin 1999 9:25  
Mar 1 juin 1999 14:23  
Spacing: 8.76 ABI100

Page 1 of 2



Annexe 7: Séquence de la bande d'intérêt n°15 (15T1) après réamplification avec les amorces M13.



Model 377  
Version 2.1.1

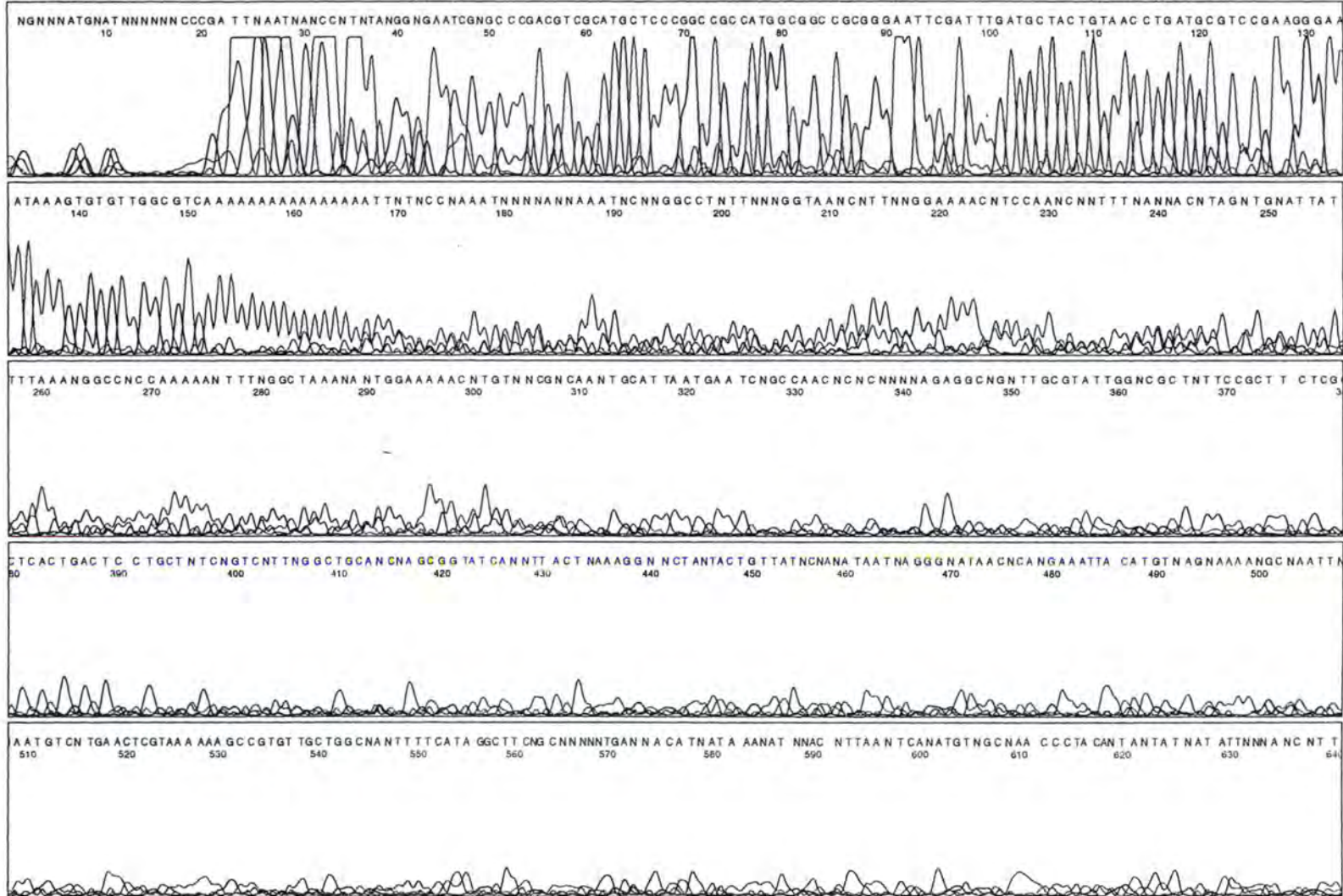
35•9 thierry

9 thierry  
Lane 35

Signal G:89 A:55 T:66 C:80  
DT (BD Set Any-Primer)  
dRhod  
Points 802 to 8264 Base 1: 802

Mar 1 juin 1999 9:33  
Lun 31 mai 1999 11:57  
Spacing: 8.38 ABI100

Page 1 of 2



Annexe 8 : Séquence de la bande d'intérêt n°19 (21A2) après réamplification avec les amorces M13.

SECRETARIAT BIOLOGIE  
F.U.N.D.P.

Rue de Bruxelles, 59  
B 5000 NAMUR (Belgique)  
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20

14 JUIN 1999