



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Comparaison des mécanismes d'arrêt irréversible de la prolifération in vitro de fibroblastes âgés ou ayant subi des stress oxydatifs successifs: rôle de pRb et p21

Mazarati, Jean-Baptiste

Award date:
1997

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 ?

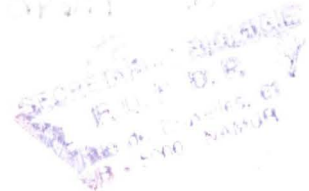
Take down policy

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

**COMPARAISON DES MÉCANISMES D'ARRÊT IRRÉVERSIBLE DE LA
PROLIFÉRATION *IN VITRO* DE FIBROBLASTES ÂGÉS OU AYANT SUBI
DES STRESS OXYDATIFS SUCCESSIFS. RÔLE DE pRb ET DE p21.**

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

Jean-Baptiste MAZARATI

Juin 1997

**COMPARAISON DES MÉCANISMES D'ARRÊT IRRÉVERSIBLE DE LA
PROLIFÉRATION *IN VITRO* DE FIBROBLASTES ÂGÉS OU AYANT SUBI
DES STRESS SUCCESSIFS. RÔLE DE pRb ET DE p21.**

Jean-Baptiste MAZARATI

Résumé

Des stress successifs au tert-butylhydroperoxyde, appliqués à des doses subléthales, induisent dans les cultures *in vitro* de fibroblastes WI-38, un vieillissement accéléré. Cet état de sénescence induite est corroboré par un triple test de suivi, à savoir : le modèle des morphotypes cellulaires, le test de prolifération, par la mesure de la synthèse d'ADN par les cellules en culture, et la détection à pH 6 d'une activité β -galactosidase spécifique au phénotype sénescents.

Nous montrons, par ailleurs, dans cette étude du vieillissement cellulaire *in vitro*, que l'irréversibilité de la sénescence s'accompagne de deux événements moléculaires : une expression différentielle de p21 et une phosphorylation différentielle de pRb. Les westerns blots auxquels nous avons procédé confirment la surexpression de p21 et la non phosphorylation constitutive de pRb dans des cultures cellulaires ayant subi un vieillissement normal ou ayant subi des stress successifs. La concordance des résultats obtenus indique que l'inhibition des mitoses semble être contrôlée par des mécanismes similaires dans les cellules âgées et les cellules ayant reçu des stress successifs.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1997

Promoteur: J. Remacle

Notre gratitude va en premier lieu au professeur José Remacle. En nous admettant dans votre laboratoire, vous nous avez donné un horizon à explorer. Merci pour ce crédit qui a transformé notre inexpérience en une recherche assidue et passionnante.

À Olivier Toussaint, la profondeur et la pertinence de tes analyses nous ont permis d'affiner nos expériences et d'apprécier à juste titre nos résultats. Ta disponibilité et ton humanité ne sont pas à marchander, car elles coulent de source. Ce fut une joie de bénéficier de ce soin intellectuel et humain!

À toi Patrick Dumont qui a su transformer tous mes essais. Tu connais aussi bien que moi les aléas de l'aventure. Mon effort est le fruit d'un labeur commun. Quel dommage que le français n'ait que 5 lettres pour dire Merci. Que mon dire déborde sur le dit pour reconnaître que tu as toujours été là pour moi fût-ce la veille d'un congrès!

À François Eliaert qui a toujours mis à notre disposition des cultures saines et des milieux de cultures exempts de contamination.

À Isabelle Roland dont le support moral et l'assistance nous furent assurés jusqu'à u lever du jour.

À Isabelle Alexandre et Edouard Delaive qui m'ont fait aimer le travail de laboratoire.

À tous ceux et celles auprès de qui nos questions banales et sérieuses ont trouvé réponse et compréhension: des premières règles de tenue sous la hotte à la façon de diluer au dixième! du lieu de rangement des produits à l'heure du minifoot !

À tous ces visages à qui la rigueur de la recherche ne ravit point la gaieté, le sourire et la bonne humeur. Cette ambiance de proximité et de convivialité révèlent que votre générosité ne tient pas du mercantilisme académique mais bien d'une façon propre à chacune et chacun d'être-au-monde.

À la Province d'Afrique Centrale qui m'a permis d'approcher la science de la vie. Aux membres de Saint Jean-Berchmans et Cojena auprès de qui j'ai toujours trouvé courage et réconfort.

À toutes ces personnes inconnues dont la science trame la nôtre: Campisi, Chen, Ames, ...que notre effort soit un hommage rendu à ce savoir que plus d'un voudrait si riche et si partagé.

Table des matières

Avant-propos

Introduction

pages

1. Aperçu théorique de la sénescence cellulaire.....	1
1.1. Théories génétiques du vieillissement.....	2
1.2. Théories environnementales.....	3
1.3. Approche thermodynamique des systèmes vivants.....	4
1.3.1. Modèle thermodynamique.....	4
1.3.2. Incidence thermodynamique dans les systèmes vivants.....	6
1.3.3. Arguments expérimentaux en faveur du modèle thermodynamique.....	6
2. Étude moléculaire de la sénescence répliquative.....	7
2.1. Généralités.....	7
2.2. Etablissement de la sénescence répliquative.....	9
2.3. De la sénescence répliquative à l'immortalité cellulaire.....	11
2.4. Etude moléculaire de la sénescence répliquative.....	12
3. Objet du travail.....	14

Matériels et Méthodes

1. Culture des fibroblastes WI-38.....	15
1.1. Origine des cellules.....	15
1.2. Stérilisation des milieux et du matériel.....	15
1.3. Conditions de culture.....	15
1.4. Conservation des cellules : congélation et décongélation.....	16
1.4.1. Congélation.....	16
1.4.2. Décongélation.....	16
1.5. Repiquage des cellules.....	17
1.5.1. Méthode.....	17
2. Mise au point de stress successifs au tert-butylhydroperoxide.....	18
2.1. Matériel.....	18
2.2. Méthode	18

3. Détermination des morphotypes cellulaires.....	19
3.1. Matériel.....	19
3.2. Méthode.....	19
4. Détection de l'activité S-A- β -galactosidase.....	20
4.1. Matériel	21
4.2. Méthode.....	21
5. Mesure de la synthèse d'ADN par incorporation de thymidine tritiée.....	22
5.1. Matériel.....	22
5.2. Méthode.....	22
6. Etude de protéines régulatrices du cycle cellulaire (p21, p53, pRb) lors du vieillissement accéléré et du vieillissement normal des fibroblastes WI-38 par la technique du western blotting.....	23
6.1. Stimulation des cultures au sérum ou privation de sérum	23
6.2. L'extraction des protéines.....	24
6.2.1. Matériel.....	24
6.2.2. Méthode.....	24
6.3. Dosage des protéines.....	25
6.3.1. Matériel.....	25
6.3.2. Méthode.....	25
6.4. Electrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-page)	26
6.4.1. Matériel.....	27
6.4.2. Méthode.....	27
6.4.2.1. Préparation du montage.....	27
6.4.2.2. Préparation du gel séparateur.....	28
6.4.2.3. Préparation du gel concentrateur.....	29
6.4.2.4. Préparation des échantillons.....	29
6.4.2.5. Réalisation de l'électrophorèse.....	30
6.5. Transfert des protéines (western blotting).....	31
6.5.1. Matériel.....	31
6.5.2. Méthode.....	31
6.6. Détection par anticorps de p21 et pRb.....	32
6.6.1. Matériel.....	32
6.6.2. Méthode.....	32

Résultats et discussion	<i>pages</i>
1. Mise au point d'une méthode de vieillissement accéléré de cultures de fibroblastes WI-38 sous l'effet de stress oxydatifs successifs au moyen de tert-butylhydroperoxide.....	34
1.1. Préliminaire.....	34
1.2. Durée des stress.....	35
1.3. Nature du milieu d'incubation lors des stress.....	35
1.3.1. Intensité des stress.....	36
2. Détermination des morphotypes cellulaires.....	37
3. Détection de l'activité S-A- β -gal.....	39
4. Mesure de la synthèse d'ADN par l'incorporation de thymidine tritiée	41
5. Détection de pRb et p21 par "western-blotting".....	42
5.1. L'extraction.....	43
5.2. Electrophorèse sur gel dénaturant.....	43
5.3. Immunoblotting.....	44
5.3.1. Mise au point.....	44
5.3.2. Résultats.....	45
Conclusion et perspectives.....	46

Bibliographie

Liste des abréviations.

ADN: acide déoxyribonucléique
AP1: activator protein 1
ARNm: acide ribonucléique messenger
bHLH: basic helix-loop-helix
BME: basal medium Eagle
BME: basal medium eagle
bp: paire de base
cdks: kinases dépendantes des cyclines
cpm: coups par minute
DHFR: dihydrofolate réductase
DMF: diméthylformamide
DMSO: diméthylsulfoxyde
dNTPs: déoxynucléotides
HPV: human papilloma virus
Kda: kilodalton
mA: milliampère
MF: morphotype mitotique
PBS: phosphate buffer saline
PD: doublement de population
PDGF: platelet derived growth factor
PMF: morphotype postmitotique
pRb: protéine du rétinoblastome
rpm: rounds per minute
S: entropie
SDS: dodécylsulfate de sodium
SV40: virus simien 40
t-BHP: tert-butylhydroperoxide
TBST: tris buffered saline tween
TCA: acide trichloroacétique
TK: thymidine kinase
TS: thymidine synthétase
UV: ultraviolet

AVANT-PROPOS.

Si la raison scientifique récuse les certitudes immédiates, il n'en reste pas moins que nul vivant ne résiste aux assauts du temps. En effet, s'il n'est pas victime de la prédation ou d'accident mortel, il sera sujet aux maladies chroniques, au vieillissement. Cette triste et angoissante réalité qui lui échoit constitue une épreuve sans merci aux fonctions vitales du vivant. La vie qui nous porte et nous transit est ainsi si fragile et si fugace.

L'étude du vieillissement que nous amorçons est moins pour conjurer cet acharnement du sort que pour explorer les "abords" moléculaires d'un processus, certes complexe, mais commun aux systèmes vivants, du moins supérieurs.

Vouloir cerner les enjeux moléculaires du vieillissement cellulaire est une tâche mal aisée. L'abondance des théories fait de notre entreprise une aventure sur un terrain encore en friches, sillonné de voies qui s'enchevêtrent mais dont les issues se nouent en une seule interrogation : dans quelle mesure le vieillissement est-il programmé et stochastique ? Nous nous intéresserons moins à cette disjonction qu'à élucider la possibilité d'une voie conciliante qui allie sans les opposer la thèse du programme et celle qui donne le poids à l'environnement cellulaire dans les processus de vieillissement. C'est dans ce cadre que nous inscrivons l'approche thermodynamique des systèmes ouverts décrite par Prigogine et l'école de Bruxelles. Elle nous permet de comprendre la vie comme un phénomène se passant loin de l'équilibre et qui concourt à "*l'ordre par fluctuation, c'est-à-dire à l'ordre dont le non-équilibre est la source*" (Prigogine et Stengers, La nouvelle alliance, 1979, p. 169).

Toutefois, le passage d'une théorie globale d'évolution des êtres vivants à l'étude des mécanismes moléculaires qui les régissent est une approche nécessaire pour une compréhension en profondeur de la gérontologie cellulaire.

Nous nous proposons, dans ce préluce, de montrer l'évolution dans le temps de la problématique du vieillissement cellulaire. Puis, nous amorcerons une approche des mécanismes de la sénescence répllicative avant d'en explorer les enjeux moléculaires. Enfin, nous brosserons les grandes lignes de l'objectif de ce travail.

**Prolégomènes à la sénescence
cellulaire.**

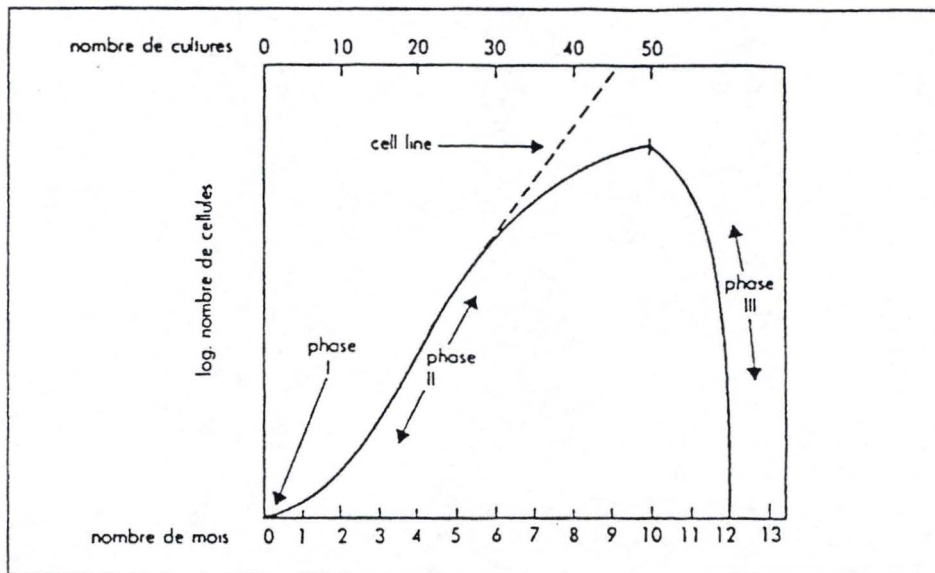


Figure 1. Représentation schématique de l'évolution d'une culture cellulaire au cours des subcultures successives. La phase I se termine avec la formation de la première culture confluente à partir de l'explant. La phase II est caractérisée par une croissance importante nécessitant de nombreux repiquages. Une altération de la croissance donnant lieu à un point d'inflexion de la courbe finit par avoir lieu. La culture entre en phase III. Plus tard les cellules arrêtent de se diviser puis finissent par dégénérer et mourir après un temps fini. Pour des cellules provenant de certaines espèces, les cellules peuvent donner des lignées à potentiel prolifératif infini: "cell line" sur la figure. (à partir de Hayflick, 1977).

1. Aperçu théorique de la sénescence cellulaire

Quand on interroge ces dernières décennies, on remarque que les efforts n'ont cessé d'affluer pour tenter une approche de la problématique du vieillissement. Par delà les jets d'expériences fallacieuses d'Alex Carrel (1912) qui stipule l'immortalité des cellules cultivées *in vitro* hors de l'organisme, l'amorce d'une théorie du vieillissement s'ébauche avec Hayflick et Moorhead (1961). Leurs expériences sur les fibroblastes humains embryonnaires montrèrent, en effet, que le pouvoir prolifératif de cellules en culture *in vitro* est limité. Après la phase correspondant à la mise en culture d'un explant obtenu par digestion enzymatique, et dont la cinétique est fonction de l'environnement immédiat des cellules, suit une seconde phase de croissance exponentielle relayée par une troisième phase révélant une occurrence mitotique décroissante, signe d'une sénescence répllicative établie (figure 1).

Cette piste balisée par Hayflick fut reprise et affinée par Bayreuther (1988) qui démontre que les cellules en culture passent par sept morphotypes distinctement reconnaissables, et biochimiquement identifiables. Les 3 premiers morphotypes sont mitotiques (MF I à III) tandis que les morphotypes IV, V, VI et VII sont dits "post mitotiques" (PMF IV à VI), car à ce stade, les cellules ne se divisent plus.

Cet apport de Bayreuther est clé. Il suggère, d'ores et déjà, que le vieillissement cellulaire est un processus à gradations successives (Bayreuther, 1988), un passage d'un état à un nouvel état que l'on peut approcher de divers points de vue : physico-chimique, physiologique, énergétique ou moléculaire.

Mais alors, ce passage d'un morphotype à l'autre est-il le fruit d'un programme intrinsèque à la cellule ou le fruit d'aléas qui, advenant, augurent à la cellule sa mort certaine? Les tenants de l'une ou l'autre thèse sont légion et ne manquent pas d'arguments pour asseoir leurs théories.

1.1. Théories génétiques du vieillissement

Ceux qui prônent l'existence d'un programme présidant au vieillissement sous-entendent "*l'existence d'un nombre restreint de gènes présents au cours de la vie d'une cellule ou d'une lignée cellulaire et régissant le vieillissement*" (Toussaint et Remacle, 1994).

Cette façon d'associer au processus de vieillissement une partie de l'informaion génétique présuppose une expression différentielle du patrimoine cellulaire régulant sa vie au cours du temps. De fait, diverses techniques de la biologie moléculaire, northern blot, western blot, criblage de banques d'expression, hybridation soustractive, differential display... permettent de mettre en évidence cette différentialité génétique chez les cellules jeunes et les cellules vieilles normalement ou sous stress.

Néanmoins, aussi attrayant qu'il paraisse, ce crédit moléculaire ne pourrait seul rendre compte d'un phénomène aussi complexe que le vieillissement des cellules. Ainsi, passer outre le caractère aléatoire des multiples altérations pouvant survenir dans le génome ou dans la machinerie enzymatique impliquée dans les voies métaboliques serait mal apprécier les enjeux de la sénescence cellulaire. Pourtant, les théories génétiques stochastiques qui soulignent les modifications dues aux divers changements dans l'environnement génomique valent la peine d'être relevées.

La première est la régulation génique proposée par Kanungo (1980). Ce dernier y stigmatise le vieillissement comme une conséquence sans conteste des dysfonctionnements du métabolisme basal, dont le corollaire est une expression différentielle du génome. La seconde est la différenciation terminale émise par Cutler (1991) stipulant que le vieillissement est une "dysdifférenciation" découlant de l'accumulation éventuelle des radicaux libres. Ceux-ci s'accumuleraient et entraîneraient une différenciation aberrante voire la mort cellulaire. Enfin, Strehler (1986) souligne, non seulement, l'effet néfaste des corps radicalaires mais aussi des radiations UV dans l'instabilité du génome. Celle-ci se manifeste par des mutations ponctuelles, des inversions, des délétions de copies de gènes ou par des transformations des bases.

Cette dimension stochastique des théories génétiques renoue avec l'écho de ceux qui, dans le vieillissement cellulaire, donnent le poids à l'environnement immédiat des cellules.

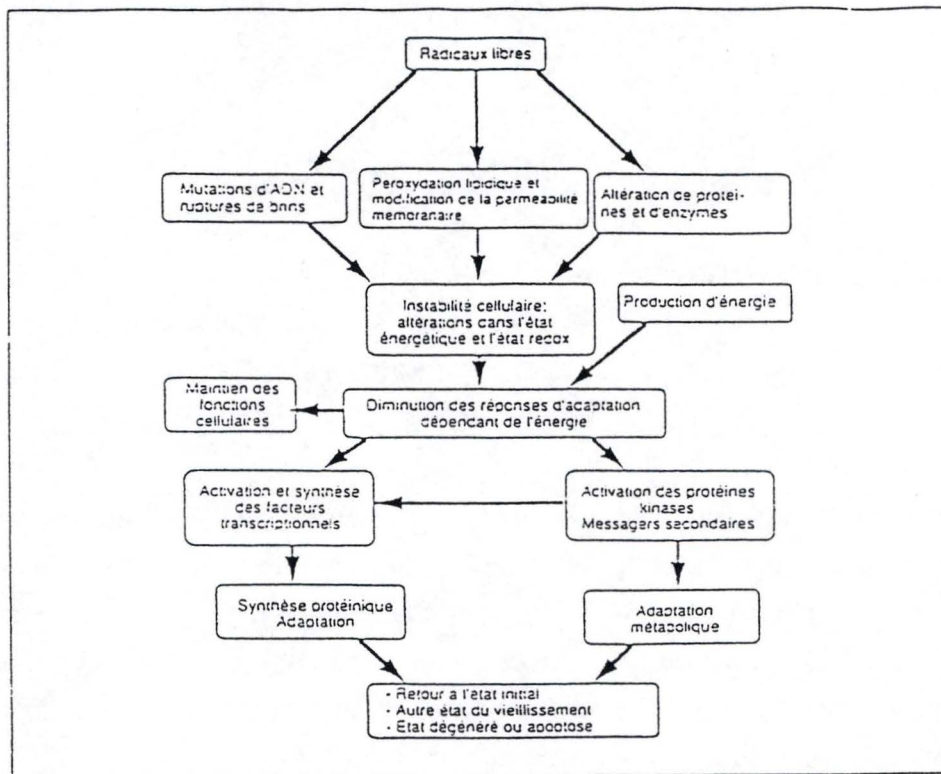


Figure 2. Représentation schématique de la manière dont les stress comme les radicaux libres peuvent avoir des effets similaires sur le comportement cellulaire. Le stress oxydatif étant d'un des nombreux stress auxquels les cellules font face. Lorsque la production d'énergie n'est pas optimale, les cellules deviennent plus sensibles aux stress (d'après Remacle et Renard).

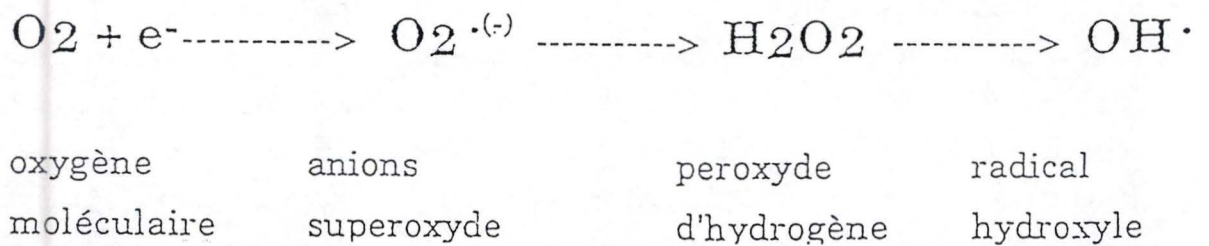


Figure 3. La réduction monovalente de l'oxygène (Remacle et al.).

1.2. Théories environnementales

Les théories environnementales sont multiples mais ont en commun d'être stochastiques. La plus sensationnelle fut la théorie de l'erreur catastrophique émise par Orgel en 1963. Au delà de l'anecdote, ce dernier imagine ce qui adviendrait de l'erreur qui entre par "effraction" dans la machinerie cellulaire de synthèse protéique. Le malheureux "avènement", suggère Orgel, s'amplifie et devient un événement dont la conséquence immédiate est la réduction de la viabilité des mécanismes translationnels de l'information génétique. En s'abstenant, dans sa version généralisée (1973), d'indiquer le site d'introduction de l'erreur, Orgel confère à sa théorie une dimension plus conciliante aussi bien à l'égard des théories environnementales qu'elle recouvre qu'à l'égard des théories génétiques (cfr les commentaires faits par O. Toussaint dans sa dissertation doctorale : Approche globale du vieillissement cellulaire à partir de la théorie des systèmes ouverts, 1992 pp13-15).

Une autre théorie à esquisser est celle qui met au coeur du vieillissement l'effet des radicaux libres (figure 2). Ces éléments nocifs qui proviennent de la réduction monovalente de l'oxygène (figure 3), de l'activité des oxydases (xanthine, aldéhyde oxydase) ou s'échappent de la chaîne de transfert d'électrons dans la mitochondrie (Remacle et al., 1992) réagissent avec des molécules cellulaires et les altèrent. La dénaturation des bases de l'ADN, la peroxydation des acides gras insaturés (Kappus, 1985), l'oxydation des ponts disulfures dans les protéines sont autant d'exemples qui peuvent hâter la sénescence cellulaire.

Cependant, l'impact des radicaux libres dans le vieillissement n'est appréciable que quand il est considéré en rapport avec les mécanismes de défense de la cellule. Ceux-ci sont soit enzymatiques ou non enzymatiques. Les premiers recouvrent l'activité des peroxydases, de la catalase, de la superoxyde dismutase et surtout de la glutathion peroxydase qui consitue l'avant-garde de la batterie anti-oxydante de la cellule. Les seconds comprennent des molécules anti-oxydantes tels que l'alpha tocophérol (vitamine E) ou l'acide ascorbique (vitamine C). D'autres équipes de chercheurs ont démontré que l'introduction, par microinjection, d'enzymes antioxydantes dans le cytosol de fibroblastes ou de cellules endothéliales rendait ces cellules résistantes aux stress radicalaires (Michiels et al. 1990). L'effet radicalaire dans le vieillissement est, dès lors, à chercher dans le compromis entre l'intensité du stress et la capacité cellulaire à y répondre.

Cette revue non exhaustive des théories génétiques déterministes, génétiques stochastiques et environnementales, montre à quel point une approche "monolithique" d'un processus multifactoriel qu'est le vieillissement cellulaire est voué à l'échec. Aussi, la recherche des voies de synthèse qui allient la dimension génétique et environnementale s'impose. La thermodynamique des systèmes ouverts loin de l'équilibre nous semble appropriée pour articuler les transactions moléculaires au niveau cellulaire au cours du vieillissement.

1.3. Approche thermodynamique des systèmes vivants

1.3.1. Modèle thermodynamique

La singularité de l'approche thermodynamique réside dans le fait qu'elle considère le système comme un tout et les transformations qui s'y déroulent dans leur globalité. Nous voudrions dans les lignes qui suivent exposer laconiquement la démarche développée par Prigogine (1979) et l'école de Bruxelles avant d'en juger l'applicabilité aux systèmes vivants.

Dans la Nouvelle Alliance, Prigogine structure le champ de pertinence thermodynamique en trois domaines : le domaine proche de l'équilibre, le domaine de l'équilibre et le domaine de non-équilibre ou loin de l'équilibre. Dans les régions à l'équilibre ou qui lui sont proches, les flux intrasystémiques de matière et d'énergie sont colinéaires aux forces qui les génèrent. Les processus obéissent encore à la logique de la réversibilité. Tandis que dans les régions de non-équilibre, les processus qui y prévalent sont irréversibles. Les flux produits et dissipés en périphérie du système sont une fonction de loin plus complexe des forces qui les suscitent (Prigogine et Stengers, La nouvelle alliance, 1979, p.151). Les lois du système sont non linéaires et lui dictent des restructurations en fonction des *conditions aux limites*, -expression prigoginienne qui désigne un ensemble de conditionnements qui font que le système peut bifurquer dans telle ou telle autre direction-.

L'entropie (S), définie par Boltzman comme une mesure du désordre moléculaire, est une fonction d'état qui permet de mieux cerner les forces en jeu dans un système et les diverses transformations qui en découlent. Sa variation comporte une double composante liée, d'une part, à l'entropie produite dans le système et, d'autre part, à celle exportée hors du système. En termes formalisés : $\partial S = \partial S_i + \partial S_e$. " ∂S_e est lié aux échanges, aux

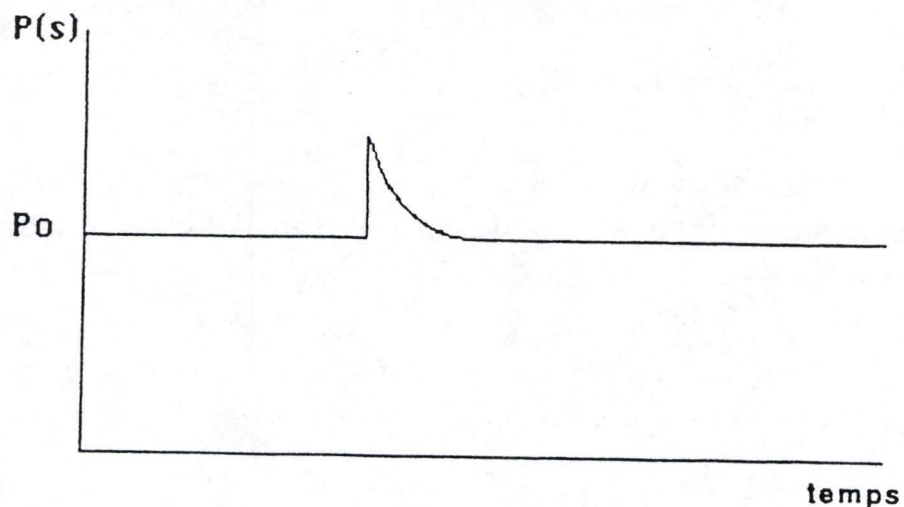


Figure 4. Représentation du théorème de Prigogine affirmant qu'un système ouvert linéaire éloigné de son état stationnaire par une fluctuation se comporte de manière à ce que sa production d'entropie $P(S) = \partial_i S / \partial t$ diminue au cours du temps pour revenir à la valeur initiale de production d'entropie P_0 (Toussaint et al., 1991)

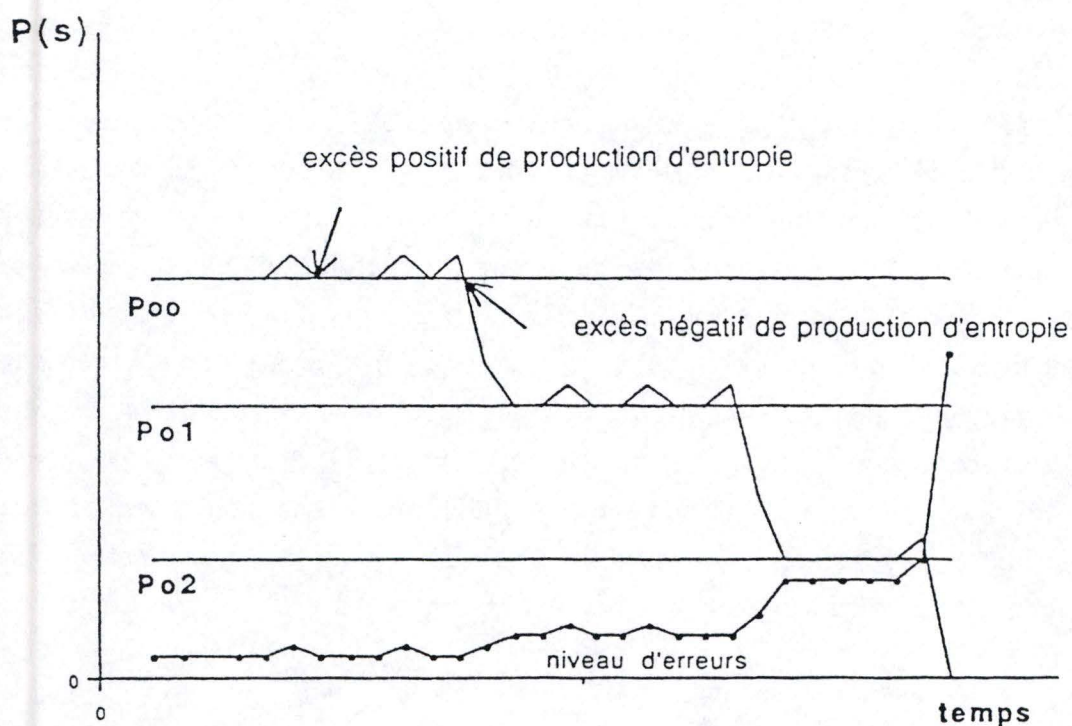


Figure 5. Évolution de la production d'entropie $P(S) = \partial_i S / \partial t$ en fonction du temps dans un système ouvert loin de l'équilibre. Les différents niveaux de P_0 représentent les différents états stationnaires qui peuvent exister après un excès négatif de production d'entropie. En même temps, le niveau d'erreurs, à l'intérieur du système, va augmenter, cela conduisant finalement à une déstabilisation totale du système (Toussaint et al., 1991).

flux entre le système et le reste du monde, tandis que ∂S_i est un terme de production d'entropie dû aux processus réversibles et dont le signe est toujours positif ($\partial S_i > 0$) sauf à l'équilibre où il s'annule ($\partial S_i = 0$). (Prigogine et Stengers, La nouvelle alliance, p.145).

Dans un système ouvert, l'évolution de l'entropie du système dans le temps peut être corrélée à l'évolution de la fonction de production d'entropie dans le temps : $\partial P(S)/\partial t = \partial S_i/\partial t$. Cette fonction présente plusieurs niveaux de complexité. Dans les régions proches de l'équilibre, la fonction entropique est linéaire et est une sommation de tous les changements locaux qui surviennent dans le système. $\partial P(S)/\partial t = \sum J_i X_i$ où "J" est la vitesse du processus irréversible et "X" la force (affinité, gradient...). (la nouvelle alliance p.150). A l'équilibre, le système n'est plus viable, il est mort. Les flux et les forces s'annulent et il n'y a donc pas de production d'entropie. La fonction d'état est une constante.

Loin de l'équilibre, la fonction entropique évolue dans un domaine non linéaire et son évolution n'est guère prévisible. Dans cette région, en effet, le système semble atteint "d'oubli des conditions initiales" et engagé dans "la dualité créatrice et destructrice des processus irréversibles" (Prigogine et Stengers, Entre le temps et l'éternité, 1988, p.51). C'est alors que le système génère de nouvelles structures intégrant toutes les transformations dictées par les conditions aux limites.

Dans un état aussi fort fluctuant, comment les systèmes ouverts assurent-ils leur viabilité ? Ces derniers opèrent dans un état dit stationnaire. C'est-à-dire un état de production minimale d'entropie où les transactions entropiques entre le système et le milieu ambiant sont constantes et permanentes. Ces échanges continus constituent une condition *sine qua non* pour la stabilité de l'état stationnaire considéré.

Dans les régions du système où prévalent les lois linéaires, on ne peut y concevoir qu'un seul état stationnaire, alors que dans les régions non linéaires, les états stationnaires sont innombrables. Ces régions du système différemment régies sont différemment affectées par les multiples fluctuations qui lui échoient. Dans le domaine linéaire, en effet, les changements qui surviennent n'occasionnent qu'un écart momentané à l'état stationnaire (figure 4). Le système finit par recouvrer son état opérationnel. Tandis que, dans le domaine non linéaire, la moindre fluctuation imprime au système un devenir imprévisible, en le faisant passer d'un état stationnaire à un autre, de façon irréversible (figure 5).

1.3.2. Incidence thermodynamique dans les systèmes vivants.

Les systèmes vivants sont ouverts et évoluent loin de l'équilibre. Cette particularité fait des systèmes vivants un domaine pertinent de la thermodynamique des systèmes ouverts. En effet, les diverses réactions chimiques qui émaillent leur métabolisme, les cascades transductionnelles occasionnées par des événements intra et épisystémiques ne relèvent plus du déterminisme linéaire mais des lois non linéaires.

Au niveau d'une entité vivante telle qu'une cellule, la pertinence thermodynamique est patente. Le challenge cellulaire à maintenir son homéostasie, à réguler sa prolifération,... est assuré par diverses interactions de type autocatalytique - le produit catalyse sa propre synthèse -, retroinhibiteur - le produit inhibe une de ses voies de synthèse - ou cross-catalytique - deux produits favorisent la synthèse l'un de l'autre et vice-versa-. Ce complexe de boucles actives et rétroactives qui se font et se défont au gré de diverses fluctuations qui affectent la cellule ne seraient plus astreintes qu'à des lois non linéaires dont l'issue est l'apparition de nouvelles cohérences.

Ainsi, les modifications physico-chimiques, moléculaires, si infimes soient-elles, se traduiront par des conséquences aussi naturelles que la différenciation, le vieillissement,... ou aussi dramatiques que l'apoptose ou la mort cellulaire. L'apparition de ces phénomènes est loin d'être soudaine ou univoque. Elle est l'issue de processus souvent longs et multi-phases.

1.3.3. Arguments expérimentaux en faveur du modèle thermodynamique

L'approche thermodynamique est riche de significations quand on pense le processus de vieillissement cellulaire. En effet, plusieurs arguments expérimentaux viennent accréditer les prévisions du modèle thermodynamique. Dans l'étude du vieillissement, l'apparition de différents morphotypes mitotiques et post-mitotiques dans les cultures successives de fibroblastes, ne pourrait s'expliquer que par une vision globale des processus se déroulant dans la cellule ou dans son environnement.

Ainsi, les expériences de Bayreuther (1988) qui mettent en évidence l'existence de 7 morphotypes différents ne pourraient être envisagés qu'en tenant compte des différents événements qui surviennent au niveau cellulaire et lui confèrent un devenir irréversible.

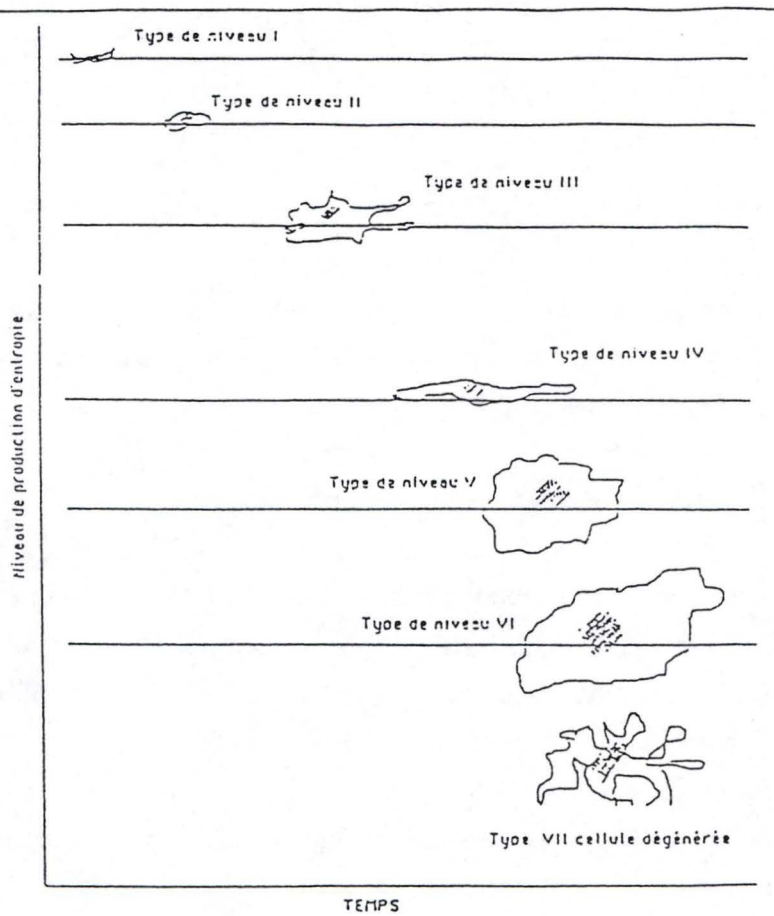


Figure 6. Modèle de "vieillesse" *in vitro* des fibroblastes humains par un passage progressif en sept morphotypes cellulaires. Ces derniers sont caractérisés par une diminution de leur production d'entropie, ce qui signifie que la quantité d'énergie qu'elles produisent et utilisent diminue avec l'âge (Toussaint et al., 1995).

Pas mal de publications montrent qu'il est, d'ores et déjà, possible d'induire dans la cellule des transformations irréversibles. Rodemann et al.(1989) montrent que l'on peut accélérer par les UV, dans des cultures de fibroblastes humains de la peau riches en morphotypes II (75%-85%), l'apparition des morphotypes postmitotiques. Von Zglinicki et al. (1995) montrent que l'exposition de cultures de fibroblastes WI-38 à 40 % de pression partielle d'oxygène entraîne un arrêt irréversible de la prolifération. Tandis que des cellules cultivées sous hypoxie subissent un nombre élevé de passages en culture par rapport aux cellules sous une oxygénation normale. Chen et Ames (1994) constatèrent aussi que les stress au peroxyde d'hydrogène ($2.10^{-4}M$) des fibroblastes humains F65 inhibaient la réponse cellulaire aux stimulations avec le sérum ou les facteurs de croissance. Dans la même foulée, Toussaint et al.(1992) démontraient que des stress à l'éthanol et au tert-butyl hydroperoxyde appliqués à des doses subléthales sur des fibroblastes embryonnaires WI-38 et AGO 4432 des poumons humains induisaient des modifications irréversibles et l'apparition des morphotypes sénescents. Ces différents stress sont d'autant plus significatifs qu'ils sont appliqués à des intervalles de temps réguliers. La même équipe établit une corrélation entre l'effet de ces divers stress survenant au niveau cellulaire et la variation du métabolisme énergétique de la cellule, au cours du temps. Ainsi, les cellules stressées dans du PBS affichent une grande mortalité par rapport à celles stressées dans du milieu contenant du sérum.

Corrélativement au modèle thermodynamique, les expériences susmentionnées concourent à l'idée que l'utilisation de doses non léthales d'agents chimiques (éthanol, tBHP,...) ou physiques (UV,...), modifie l'état stationnaire du système cellulaire et induit graduellement l'apparition des morphotypes âgés suivant la nature et l'intensité du stress subi (figure 6).

2. Étude moléculaire de la sénescence répllicative

2.1. Généralités

A part les cellules germinales, cancéreuses ou transformées, les cellules souches d'eucaryotes accomplissent un nombre fini de doublements de populations (PD), puis arrêtent leur croissance en phase G1 de leur cycle cellulaire (Christofalo et Pignolo,

1993). Cette inhibition du pouvoir prolifératif, n'est ni une différenciation terminale ni un arrêt de l'activité cellulaire.

La différenciation est, en effet, un processus par lequel une cellule acquiert sa fonction dans un tissu ou un organe donné. Dans cet état, la cellule peut maintenir sa vie proliférative (cellules épithéliales du revêtement du tractus gastro-intestinal) ou ne plus se diviser (cas des neurones). Cependant, la possibilité qu'une cellule puisse se différencier pour reprendre sa vie répliquative n'est pas exclue : "*les cellules hépatiques ne se divisent pas, mais peuvent recouvrer cette faculté si ceci s'avère nécessaire*" (Wheater, Burkitt, Daniels, histologie fonctionnelle, 2^e édition, 1987, p.28) . Les cas possibles de métaplasie -des cellules différenciées d'un épithélium donné qui se transforment en d'autres cellules différenciées d'un autre type d'épithélium- ne font que confirmer la singularité de la différenciation cellulaire. Aussi, "*Chez les gros fumeurs de cigarettes, l'épithélium respiratoire revêtant les bronches peut-il se transformer en un épithélium malpighien*" (Junqueira et Carneiro, Histologie, 1987, p. 81).

La sénescence répliquative est, quant à elle, un état irréversible qui échoit à une cellule au terme de son potentiel de doublements de population. Ainsi, dépendra-t-elle, non point du temps ni des conditions de prolifération, mais du type cellulaire, de l'espèce et de l'âge du donneur (Cristofalo et Pignolo, 1993). Les cellules provenant d'un donneur à longue, moyenne ou courte espérance de vie verra sa vie proliférative condamnée aux arrêts à long, moyen ou à court terme (Campisi et al., 1996). Par exemple, les fibroblastes provenant d'explants embryonnaires arrêtent leur répliquative après 60 à 80 PD tandis que ceux venant d'adultes âgés ne dépassent point 10 à 20 PD (Campisi et al., 1996). Les fibroblastes embryonnaires de souris accompliront leur sénescence après 10 à 20 PD alors que les tortues du galapagos qui vivent très longtemps l'accomplissent après plus de 100 PD (Goldstein, 1974; Hayflick, 1977; Rohme, 1981).

Une fois la sénescence établie, la cellule demeure métaboliquement active (Matsumura, 1979) et physiologiquement viable (Goldstein, 1990; Mc Cormic et Campisi, 1991; Shay et al., 1991; Cristofalo et Pignolo 1993). On sait que, chez les cellules sénescents, les substances mitogéniques ne déclenchent plus l'entrée en phase S du cycle cellulaire et que certains gènes sont réprimés (voir le point 3.4). Néanmoins, la synthèse de certains gènes de réponse précoce : c-myc, c-jun, c-ras-Ha (Rittling et al., 1986; Chang et Chen, 1988; Sehadri et Campisi, 1990; Philips et al., 1992) et de certaines protéines propres à la phase G1 précoce : une MAP-kinase de 42 Kda continue (Afshari et al., 1993).

Cette nouvelle donne de connaissances dans le domaine du vieillissement n'a pas manqué d'éveiller l'intérêt d'un grand nombre de chercheurs qui ont investi les pistes de la "gérontologie moléculaire". Comment, en effet, la cellule compte-t-elle le nombre de passages qui dictent l'entrée en phase sénescence ? Comment rendre compte, du point de vue biomoléculaire, de l'arrêt de croissance des cultures cellulaires au phénotype sénescence ? Grosso modo, quels sont les mécanismes moléculaires qui servent de soubassement au vieillissement des cellules ?

Si l'étude moléculaire est loin d'avoir élucidé toutes ces interrogations, l'ampleur des recherches en cours et les résultats déjà parus montrent que la dimension moléculaire de la sénescence répliquative est bel et bien entamée. Nous allons, à présent, voir de près les mécanismes cellulaires d'entrée en sénescence répliquative, avant d'en explorer les bases moléculaires qui les sous-tendent.

2.2. Etablissement de la sénescence répliquative

Mise en évidence dans des cultures successives *in vitro* des fibroblastes ou des cellules endothéliales, l'enclenchement de la sénescence répliquative est un mécanisme aux contours encore mal définis. Si le pouvoir répliquatif d'un type de cellules donné est thématé en termes de doublements de population ou en nombre de passages en culture, on est encore loin de savoir quand et comment la cellule amorce l'arrêt de sa vie proliférative. Cependant, certaines pistes sont déjà balisées.

L'une des hypothèses émises pour expliquer l'arrêt de la réplication des cellules est le raccourcissement des télomères (Levy et al., 1992). Ceux-ci sont des séquences *consensus* (TTAGGG) qui terminent des chromosomes linéaires, chez l'homme et chez certains vertébrés. L'hypothèse avancée stipule que ces télomères se raccourciraient au cours de la vie répliquative de la cellule (Allsopp et al., 1992; Levy et al., 1992). L'exemple des fibroblastes humains en culture a révélé une réduction des télomères à raison de 50 bp à chaque doublement de population (Campisi et al., 1996). Et d'autres types cellulaires provenant de divers donneurs perdraient une quinzaine de paires de bases à chaque réplication (Campisi et al., 1996). Cette perte de bases entraînerait à la longue une situation critique interférant avec les mécanismes cellulaires de la réplication et induirait son arrêt. Ainsi, la sénescence répliquative serait une réponse aux différents dommages survenant au niveau de l'ADN suite au raccourcissement des télomères (Levy et al., 1992).

Cette idée est d'autant plus alléchante que la longueur télomérique des cellules immortalisées *in vitro*, des cellules tumorales et de la lignée germinale demeure constante. Cette constance serait assurée par l'expression, chez ces cellules, d'une télomérase (Counter et al., 1992; 1994; Kim et al. 1994) qui reconstituerait la longueur du télomère en répliquant les bases non répliquées par l'ADN polymérase, à l'extrémité 3'(Campisi et al. 1996).

Néanmoins, plusieurs constats mettent à dure épreuve l'hypothèse susmentionnée. En effet, si la plupart de cellules somatiques n'expriment pas la télomérase, il en est d'autres qui, quoique ayant l'activité télomérase, continuent à se raccourcir (Bryan et al., 1995). Enfin, si l'activité télomérase semble requise pour des types cellulaires à réplication indéfinie, sa réduction chez des lignées lymphocytaires B et T au moyen d'oligo-antisens n'affecte pas le phénotype immortel (Stralh et Blackburn, 1996).

Une deuxième hypothèse est la *réorganisation chromatinienne des cellules en prolifération* qui met en exergue l'idée que *la perte moléculaire de la plasticité conformationnelle est un paramètre important* de la sénescence réplivative (Macieira-Coelho, 1991). En effet, la molécule d'ADN, longue d'1m, requiert une superstructure faite d'enroulements et superenroulements pour pouvoir se confiner dans l'espace nucléaire. Cette complexité structurale, par ailleurs nécessaire à l'expression génique, implique des interactions typiques ADN-chromatine, des interactions ADN avec des protéines de la matrice nucléaire (Berezeny et Coffey, 1975), et donc une certaine plasticité conformationnelle.

De nombreux travaux ont déjà montré que ces interactions se font et se défont au cours de la vie proliférative de la cellule et que la plasticité génomique diminue proportionnellement aux niveaux de doublement de population (Macieira-Coelho, 1991). Ainsi, des aberrations dans le réarrangement chromosomique augmenteraient-elles chez des individus plus âgés (Hedner et al., 1982; Martin et Rademaker, 1987); et l'ADN deviendrait de plus en plus thermolabile et la chromatine fragilisée au cours des multiples passages des cellules en culture (Macieira-Coelho, 1991).

Ces modifications structurelles ajoutées à différents événements qui leur sont inhérents : délétions, recombinaisons illégitimes, amplification génique...(Macieira-coelho, 1991), rendraient irréversible l'avènement de la sénescence réplivative.

2.3. De la sénescence réplivative à l'immortalité cellulaire

L'irréversibilité de la sénescence réplivative contraste avec le caractère étendu ou indéfini de la prolifération des cellules tumorales, cancéreuses ou transformées. Étudié de près, le vieillissement s'est révélé être un phénotype dominant tandis que le phénotype immortel était récessif (Stein et al., 1982; Pereira-Smith et Smith, 1983). Ce constat est étayé par une série d'expériences qui viennent confirmer l'état de dominance de la sénescence.

La fusion de la plupart des cellules immortelles issues des tumeurs avec les cellules vieilles induit chez les hybrides l'inhibition de la réplication de l'ADN. Quand les cellules prolifératives sont fusionnées avec les cellules sénescents, elles ne synthétisent plus d'ADN en réponse aux substances mitogéniques (Campisi et al., 1996). En plus, la microinjection dans les cellules pré-sénescents d'ARNm provenant des cellules âgées leur interdit la synthèse d'ADN et inhibe le cours du cycle cellulaire (Lumpkin et al., 1986). Enfin, la fusion des cellules jeunes non transformées avec les cellules à croissance indéfinie donne des hybrides au phénotype sénescents (Campisi et al., 1996). Les conclusions de ces expériences ont conduit pas mal de chercheurs à considérer que l'irréversibilité de la sénescence cellulaire était due à une série de molécules qui transactiveraient de façon encore mal connue pour prévenir l'entrée en phase S du cycle (Campisi et al., 1996).

Cette irréductibilité du processus de vieillissement est, cependant, prise en défaut quand les cellules sont transformées par le large antigène-T provenant du virus simien 40 (SV40). Celui-ci permet aux cellules sénescents de recouvrer leur potentiel réplivative (Tsuji et al., 1983; Gorman et Christofalo, 1985) sans toutefois pouvoir amorcer la phase mitotique (Gorman et christofalo, 1985).

Le cycle cellulaire des cellules vieilles présenterait donc deux blocs : le premier qui prévient l'entrée en phase S et est surmonté par le large antigène-T et le second qui inhibe l'entrée en mitoses (Campisi et al., 1996). Cette barrière mitotique est surmontée quand l'action du large antigène-T est conjuguée avec des gènes E1a et E1b des adénovirus et avec des oncoprotéines E6 et E7 des types 16 et 18 des virus HPV (Boulanger et Blair, 1991).

L'immortalisation induite par ces oncogènes et oncoprotéines viraux est fonction de l'espèce et du type cellulaire. Alors que la plupart des cellules des rongeurs sont immortalisées (Shay et Wright, 1991), les cellules humaines prolongent leur potentiel proli-

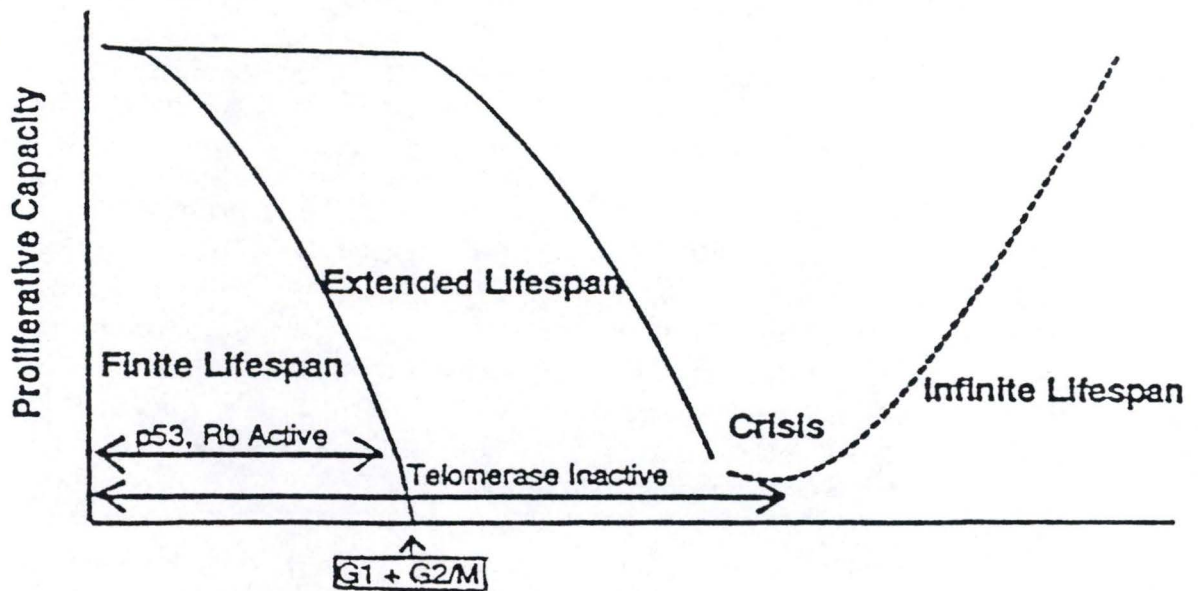


Figure 7. Étapes nécessaires pour échapper à la sénescence réplivative : la sénescence réplivative se traduit par un arrêt irréversible de la réplivative et par un blocage du cycle cellulaire en phase G1/S et G2/M. Certains virus étendent la durée du potentiel réplivative et font culminer les cultures en un état de "crise" d'où quelques rares cellules décrochent et s'immortalisent (Campisi et al., 1996).

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 δ function	Late G1/S	Chang <i>et al.</i> (1991)
pola	DNA polymerase α	Late G1/S	Pendergrass <i>et al.</i> (1991)
RNR	Ribonucleotide reductase	Late G1/S	Pang and Chen (1993, 1994)
TIMP-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)

Figure 8. Exemple des gènes dont l'expression est modifiée chez les fibroblastes humains sénescents (à partir de Campisi *et al.*, 1996).

fératif mais résistant à l'immortalisation (Boulanger et Blair, 1991; Shay et Wright, 1991). Les cellules humaines transformées par l'antigène-T outrepassent l'occurrence normale de niveaux de doublement de population et s'installent dans un état de crise -état où la croissance cellulaire est contrebalancé par la mort cellulaire d'où quelques rares cellules décrochent et deviennent immortelles (figure 7). Une cellule sur 10 millions de fibroblastes embryonnaires des poumons humains acquérait l'immortalité (Shay et Wright, 1989).

Après cette approche des mécanismes d'entrée cellulaire dans la sénescence répliative, il nous sied à présent d'en étudier l'incidence moléculaire.

2.4. Etude moléculaire de la sénescence répliative

La connaissance que l'on a des mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'arrêt de la réplication des cellules est encore limité. Toutefois, les découvertes qui émaillent les publications récentes montrent que l'étude moléculaire est en pleine expansion. Sans prétendre donner les causes de la sénescence cellulaire, nous allons passer brièvement en revue les événements moléculaires prépondérants dans les cellules vieilles.

Si la plupart des gènes de réponse immédiate sont encore inductibles chez des cellules sénescents, le protooncogène *c-fos* (Seshadri et Campisi, 1990) et les gènes *Id1* et *Id2* (Hara et al., 1994) sont réprimés. Le premier encode un produit qui entre dans la composition du facteur de transcription AP1 (Cohen et Curran, 1989), nécessaire à la réponse cellulaire aux mitogènes et aux facteurs de croissance, tandis que le second code pour des régulateurs négatifs du domaine basique *helix-loop-helix* (bHLH) -domaine d'interaction avec les éléments *cis* de l'ADN- de certains facteurs de transcription (Benezra et al., 1990; Sun et al., 1991).

Beaucoup de gènes de la phase tardive de la phase G1 et ceux de la frontière G1/S sont réprimés (figure 8); et des enzymes indispensables à la réplication de l'ADN : la thymidine kinase (TK), thymidine synthétase (TS), la dihydrofolate réductase (DHFR) ne sont plus exprimés. Si les causes de toutes ces répressions ne sont pas élucidées, la déficience de l'activité E2F chez les fibroblastes sénescents (Dimri et al., 1994), par ailleurs essentielle dans l'induction de beaucoup de gènes de la barrière G1/S, laisse supposer qu'elle en serait l'origine.

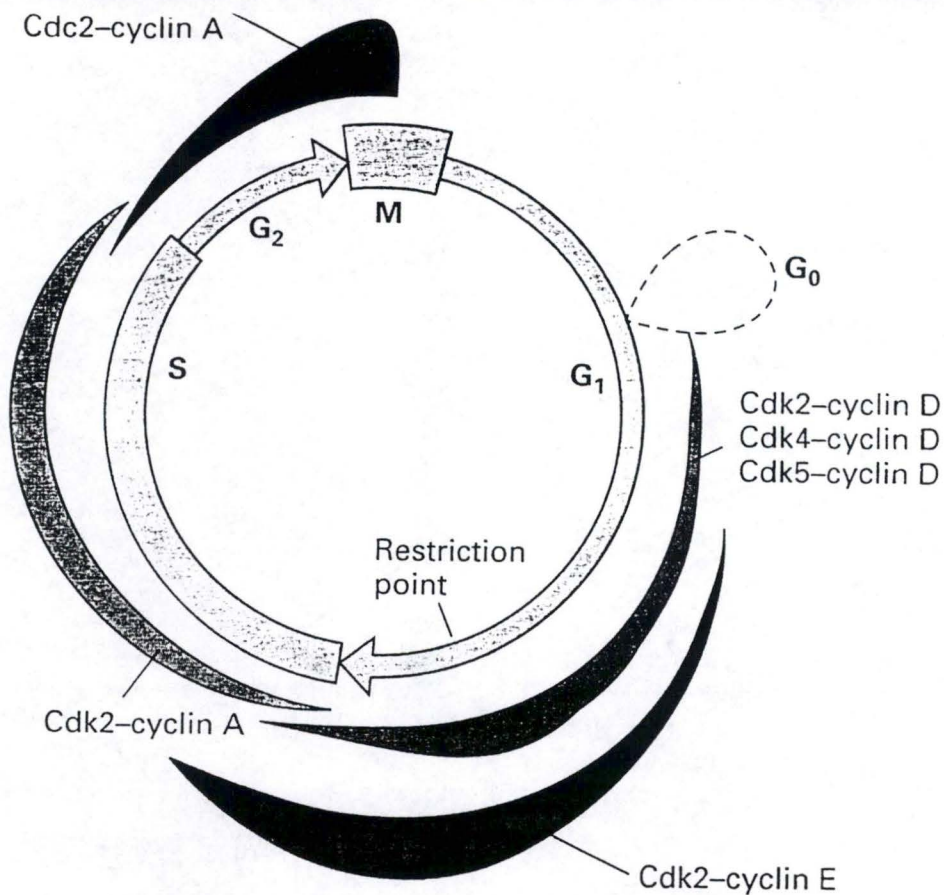


Figure 9. Occurrence des complexes cyclines-cdks dans le déroulement normal du cycle cellulaire. (tiré de Lodish, Molecular Biology, 3d Edition, 1995).

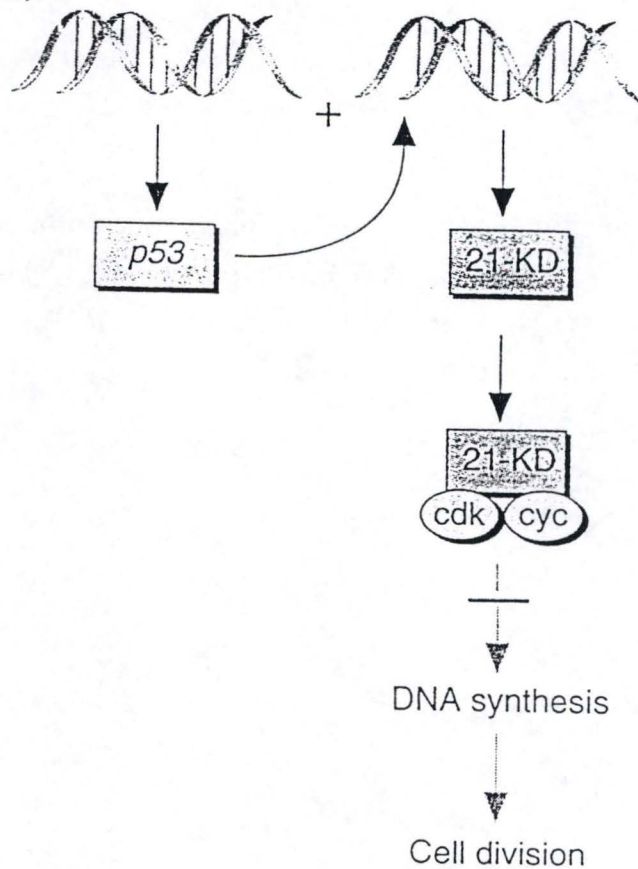


Figure 10. Schématisation de l'activation de p21. Le facteur de transcription p53 se lie au promoteur des gènes codant pour p21 et active sa transcription . La protéine p21 agit alors comme inhibiteur d'une série de complexes cyclines-cdks en s'y liant (d'après Marx, 1991).

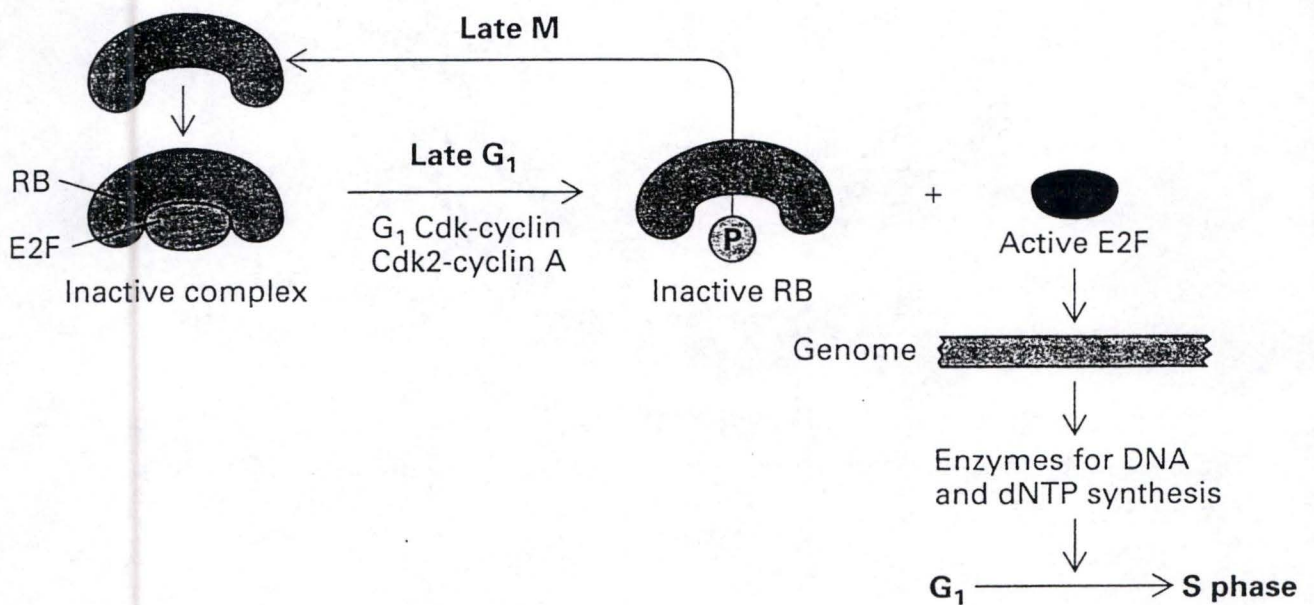


Figure 11. Sous sa forme phosphorylée, pRB forme un complexe inactif avec E2F. Dans la phase G₁ tardif, pRB est hyperphosphorylée par des complexes cyclines-cdks, ce qui prévient sa liaison à E2F. Cela rend possible l'entrée en phase S. (tiré de Lodish, Moléculaire Biology, 3d Edition, 1995).

L'occurrence d'expression des différentes cyclines et cyclines dépendantes des kinases (cdks) est modifiée. Les cyclines A, B et la cdc2 sont sous-exprimées et l'activité des complexes cyclines D-cdk et E-cdk diminuent sensiblement (Dulic et al., 1993). Or, ce sont ces complexes *cyclines-cdks* qui assurent la progression du cycle cellulaire normal (figure 9). En même temps, des inhibiteurs de croissance : p53, p21 et pRb sont sur-exprimés dans les cellules sénescents.

La protéine p53 est le produit d'un gène qui se trouve muté dans au moins 50 % de cancers humains (Hollstein et al., 1991). Si cela l'identifie comme un bon candidat suppresseur de tumeurs, son expression chez les cellules âgées en fait un inhibiteur soupçonné de la croissance cellulaire. En effet, p53 transactiverait la transcription d'un groupe de gènes dont la créatine kinase (Weinberg et al., 1991), mdm2 et p21 qui prévient l'action des complexes cyclines-cdks, indispensable au déroulement normal du cycle cellulaire (figure 10). Il aurait, en outre, une action négative sur plusieurs promoteurs dont ceux de c-fos et c-jun dont les produits forment le facteur de transcription AP1, HS70, ... (El-Deiry et al., 1993).

La surexpression de p21 est aussi dans les causes immédiates de la sénescence réplivative. Son effet répresseur des complexes cyclines-cyclines kinases dépendantes (figure 10) induit l'hypophosphorylation de la protéine rétinoblastome. Déphosphorylée, la protéine rétinoblastome forme un complexe avec une famille de facteurs de transcription appelée E2F, responsable de l'expression d'enzymes impliquées dans la synthèse de dNTPs et d'ADN (figure 11). La phosphorylation *in vitro* de pRb par des complexes de cycline-cdk de la phase G1 et par le complexe cycline A-cdk2 prévient sa liaison avec E2F, ce qui rend possible l'entrée en phase S (Lodish, Molecular biology, p.1236). La présence de pRb au cours du cycle et à différents états de phosphorylation fait de ce suppresseur de tumeurs une des clés des mécanismes de régulation de l'arrêt de croissance des cellules et de la sénescence réplivative.

Enfin, des travaux récents (Gonos et al., 1996) ont permis, par hybridation sous-tractive, de mettre en évidence une série de gènes qui sont propres aux cellules qui vieillissent. L'équipe de S. Gonos travaillait sur des lignées cellulaires tsa transformées par l'antigène-T. Cultivées à une température permissive de 33°C, les lignées tsa prolifèrent indéfiniment alors qu'elles ne poussent pas à 39,5°C. Cette température dégraderait l'antigène-T et entraînerait le retour de la cellule au prototype d'une cellule sénescence. Le criblage des banques d'expression provenant des souches à croissance continue et celles qui ne croissent plus a permis d'identifier et d'isoler des gènes surexprimés dans les cel-

lules non répliquatives. On trouvera entre autre les gènes de la fibronectine, du cytochrome C oxydase, de l'ostéonectine, du gène codant pour le récepteur de la laminine....

Cet éventail d'événements moléculaires qui interviennent dans la phase de sénescence répliquative montre combien le processus de vieillissement est complexe. Nous pensons inscrire notre démarche non pas dans une perspective qui n'était point, mais dans une approche qui explore de près l'état de la question (*status quaestionis*).

3. Objet du travail

Notre ambition est ainsi à double visée. D'une part, nous voudrions montrer que le vieillissement est un processus irréversible qui s'établit de façon graduelle dans les cultures de fibroblastes -WI-38- embryonnaires des poumons de fœtus humain et que cet état de sénescence cellulaire peut y être induit par des agents chimiques, en l'occurrence le tert-Butyl hydroperoxyde (tBHP). D'autre part, nous chercherons à cerner les transformations moléculaires induites au cours de la sénescence répliquative, respectivement chez les cellules jeunes non stressées, chez les cellules vieillies sous l'action de stress successifs et chez les cellules vieillies normalement.

Pour ce faire, nous procéderons à une mise au point de stress successifs subléthaux au t-BHP dans des boîtes de culture T75 en vue d'obtenir de grandes quantités d'extraits d'une culture de fibroblastes dont les proportions en morphotypes soient comparables à celles des cultures vieillies normalement.

Ce mode d'étude *in vitro* du vieillissement se déroulera en trois temps. Dans un premier temps, des stress au tBHP sont appliqués à des doses subléthales: 0,1 mM pendant une heure toutes les 48 heures, et sont effectués dans du BME + 10% de sérum en vue de réduire la mortalité. Dans un deuxième temps les résultats obtenus sont confirmés par un triple test de suivi du vieillissement :

- 1°. Le comptage des morphotypes
- 2°. Le test de prolifération cellulaire
- 3°. La détection à pH6 d'une activité β -galactosidase qui apparaît chez les cellules qui ont épuisé leur potentiel répliquatif.

Dans un troisième temps, nous initierons des Westerns en vue de détecter l'expression différentielle de p21 et de pRb.

Matériels et Méthodes

<u>COMPOSANTS</u>	<u>POUDRE (en mg/l)</u>
<u>Sels inorganiques:</u>	
CaCl ₂ (anhydre)	200,00
KCl	400,00
MgSO ₄ (anhydre)	97,67
Nacl	6800,00
Na ₂ PO ₄ .H ₂ O	140,00
<u>Acides aminés:</u>	
L-arginine.HCl	21,00
L-cystéine. 2HCl	15,65
L-glutamine	292,00
L-histidine	8,00
L-isoleucine	26,00
L-leucine	26,00
L-lysine.HCl	36,47
L-méthionine	7,50
L-phénylalanine	16,50
L-théonine	24,00
L-tryptophane	4,00
L-tyrosine (sel de sodium)	26,05
L-valine	23,50
<u>Vitamines</u>	
Biotine	1,00
D-Ca pantoophanate	1,00
Chlorure de choline	1,00
Acide folique	1,00
i-inositol	2,00
Nicotinamide	1,00
Pyridoxal HCl	1,00
Riboflaavine	0,10
Thymine	1,00
<u>Autres composants</u>	
D-glucose	1000,00
HEPES	10,00

Figure 12. Composants du milieu de culture BME

1. Culture des fibroblastes WI-38

1.1. Origine des cellules

Durant ce travail, nous avons utilisé la souche WI-38 de fibroblastes de poumons humains foetaux. Cette souche cellulaire provient d'explants de poumon d'un foetus humain de 15 semaines (avortement thérapeutique). La souche a été caractérisée par Hayflick et Moorehead (Hayflick et Moorehead, 1961) et déposée à "l'American Type Culture Collection" qui en est l'actuel fournisseur.

1.2. Stérilisation des milieux et du matériel

Tous les milieux et les solutions utilisées ont été stérilisées par filtration sur des filtres de 0,22 mm (Sartorius, Allemagne). Et tout le matériel de culture (bouteilles, pipettes, ...) a été rendu stérile soit par un traitement de six heures à 180°C dans un four prévu à cet effet (Heraeus Instruments, Van der Heyden, Belgique) soit par un autoclavage de 20 minutes à 121°C (Autoklav typ 23, Melag Apparate, Allemagne).

1.3. Conditions de culture

Les fibroblastes WI-38 sont cultivés dans du BME (Basal Medium Eagle; Flow Laboratories, U.K.; figure 12) enrichi avec 10 % de sérum de veau foetal (Flow Laboratories, U.K.). Le sérum de veau foetal est conservé à -20°C et les milieux de culture sont conservés à 4°C. Avant toute utilisation, ils sont réchauffés à 37°C.

Les cultures sont effectuées, en routine, dans des boîtes de culture de 75 cm² (T75) (Corning, USA) contenant 15 ml de milieu + sérum et conservées entrouvertes dans des étuves à 5 % de CO₂ (Heraeus Instruments, Van der Heyden, Bruxelles, Belgique). Les fibroblastes se développent et prolifèrent en formant une monocouche cellulaire.

1.4. Conservation des cellules : congélation et décongélation

Un stock de cellules est conservé sous forme congelée dans l'azote liquide, à -196°C . Cela nous permet de disposer de cellules à différents passages en culture, depuis le passage 20 jusqu'au passage 47.

1.4.1. Congélation

Les cellules sont détachées, par trypsinisation, de la boîte de culture (comme décrit au point suivant). Après une centrifugation de 10 minutes à 1000g (Hettich Universal, Allemagne), le culot de cellules est resuspendu dans 0,4 ml de BME additionné de 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO, Merck, Darmstadt, Allemagne), comme agent cryoprotecteur. Les cellules sont déposées dans un cryotube (Nunc, Denmark).

La congélation des cellules est réalisée grâce à un appareil conçu à cet usage (PTLD 75, l'Air Liquide, Belgique). Cet appareil de congélation est programmé pour réaliser un abaissement en deux phases de la température. La température est abaissée tout d'abord lentement (1°C par minute) jusqu'à -40°C puis très rapidement jusqu'à -100°C . Le cryotube contenant les cellules est ensuite déposé dans l'azote liquide à -196°C .

1.4.2. Décongélation

Le cryotube stocké, dans l'azote liquide à -196°C , est plongé immédiatement dans un bain à 40°C . Une fois décongelées, les cellules sont centrifugées pendant 10 minutes à 1000 g (Hettich Universal, Allemagne). Le surnageant est éliminé et le culot de cellules est resuspendu dans 1 ml de BME additionné de 10 % de sérum. Les cellules sont enfin transférées dans une boîte de culture qui reçoit 14 ml de BME + 10 % de sérum. Le lendemain, le milieu de culture est renouvelé.

1.5. Le repiquage des cellules

Lorsque la monocouche cellulaire couvre l'entièreté de la surface de culture, les cellules sont dites confluentes et sont repiquées. Cette opération consiste à répartir les cellules d'une boîte de culture dans deux ou quatre boîtes selon les besoins de l'expérimentateur. Les différents repiquages permettent aux cellules de passer d'un niveau de doublement de population à un autre.

1.5.1. Méthode

- Dans une étuve à 37°C, préchauffer des quantités suffisantes de milieu de rinçage (BME sans sérum, Flow laboratories, U.K.), de BME + 10 % de sérum et de trypsine. La trypsine utilisée est préparée sous la forme d'une solution stérile de trypsine 0.25 % diluée dans une solution A de Gibco contenant 0,4 g/l de KCl ; 2,2 g/l de NaHCO₃ ; 6,8 g/l de NaCl ; 1,0 g/l de glucose et 0,005 g/l de rouge de phénol (GIBCO, Grande-Bretagne).

- L'ancien milieu de culture est décanté et la boîte de culture est rincée au moyen de 10 ml de milieu de rinçage pendant environ 1 minute, en agitant lentement. Le milieu de rinçage est à son tour éliminé et 2 ml de trypsine 0,25% sont alors ajoutés. On laisse la trypsine agir pendant environ 1 minute à température ambiante, tout en surveillant le détachement des cellules au microscope à contraste de phase. La solution de trypsine est ensuite décantée et la boîte de culture est placée dans l'étuve (37°C) afin d'accélérer le processus de détachement des cellules. Une incubation d'une dizaine de minutes pour les fibroblastes WI-38 est amplement suffisante. Notons que ce temps peut varier en fonction de l'âge de la culture et de l'état de confluence de celle-ci.

- Lorsque la grande majorité des cellules est détachée et se trouve en suspension dans le liquide, on ajoute 10 ml de BME + 10% de sérum. Le sérum contient des inhibiteurs de trypsine. Afin de détacher l'entièreté des cellules et de rompre les agrégats cellulaires en suspension, le milieu est agité fortement à l'aide d'une pipette pasteur.

- A cette étape, quelques gouttes de liquide peuvent être prélevés à la pipette pasteur afin de réaliser un comptage de la densité cellulaire. Ce comptage est réalisé à l'aide d'un hématocymètre, plus communément appelé chambre de Neubauer (Brand, Allemagne).

-Ensuite, 20 ml ou 50 ml de BME + 10 % de sérum sont de nouveau ajoutés suivant que l'on veut réaliser un repiquage en 2 ou en 4 des cellules. Le milieu contenu dans la boîte de culture trypsinisée est finalement mélangé et réparti dans de nouvelles boîtes à raison de 15 ml par boîte de culture T75.

2. Mise au point de stress successifs au tertbutylhydroperoxyde.

2.1. Matériel

- Tert-Butylhydroperoxyde (Merck, Allemagne)
- BME (Flow Laboratories, U.K.) additionné de 10 % de sérum bovin foetal (Flow Laboratories, U.K.)
- Milieu de rinçage (=BME sans sérum, Flow Laboratories, U.K.)

2.2. Méthode

- Le tert-butylhydroperoxyde (tBHP) est conservé à 4°C. Ses dilutions dans du BME + 10% de sérum sont toujours préparées au moment même de leur utilisation, car le tBHP est une molécule instable.

- Les stress subléthaux sous tBHP sont utilisés dans notre pour accélérer le vieillissement des cultures de fibroblastes, et ce depuis plusieurs années (Toussaint et al., 1992, 1995). Cependant, ces stress ont toujours été réalisés à moindre échelle, en boîtes de culture multicompartimentées de 96 ou 24 puits. Ces expériences nous ont permis une mise au point d'une méthode qui permette de réaliser des stress oxydatifs sur des quantités importantes de cellules, c'est-à-dire, sur des cultures de fibroblastes en boîte de 75 cm². L'obtention de quantités importantes de cellules connaissant un vieillissement accéléré sous l'effet de stress oxydatifs permettra de réaliser des extractions de protéine en vue d'expériences de biologie moléculaire comme par exemple les westerns ou les northern blotting.

- Pratiquement, un stress est réalisé de la manière suivante. *Primo*, il convient de préparer le milieu de stress : le tBHP est dilué dans du BME + 10 % de sérum à une concentration voulue. Diverses concentrations en tBHP ont été testées : 5 mM, 1 mM, 500 μ M, 100 μ M et 50 μ M. Les stress sont réalisés sur des cultures de fibroblastes en boîte de 75 cm². *Secundo*, le milieu de culture est éliminé et remplacé par 10 ml de milieu de stress apprêté auparavant. Puis, les cultures sont incubées à 37°C, dans une étuve contenant 5 % de CO₂. Au bout d'une heure d'incubation, le milieu de stress est décanté, les cultures sont rincées 2 fois au moyen de milieu de rinçage et de nouveau remises dans 15 ml de BME + 10% de sérum.

- Les cellules ont reçu 5 stress successifs. Les stress étaient espacés de 24 ou 48 heures. Avant le premier stress, entre deux stress et après le dernier stress, les cellules sont maintenues dans du BME + 10 % de sérum.

3. Détermination des morphotypes cellulaires

3.1. Matériel

- Trypsine 0,25 % (GIBCO, Grande-Bretagne), BME (Flow Laboratories, U.K.) additionné de 10 % de sérum bovin foetal (Flow Laboratories, U.K.), milieu de rinçage (=BME sans sérum, Flow Laboratories, U.K.), paraformaldéhyde (Merck, Allemagne), éthanol (Merck, Allemagne), bleu de Coomassie (Fluka, Pays-Bas), NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄ (Merck, Allemagne) acide acétique (Janssen Biochimica, Belgique), méthanol (SDS, France).

3.2. Méthode

- Les cultures cellulaires sont trypsinisées comme décrit précédemment et resuspendues dans du BME + 10 % de sérum. On réalise alors un comptage de la densité cellulaire à

l'aide d'une chambre de Neubauer. Les cellules sont ensuite repiquées à très faible densité cellulaire (700 cellules par cm^2 , soit environ 20.000 cellules par boîte) dans des boîtes de pétri de 60 mm de diamètre (Falcon, Angleterre) préalablement quadrillées au moyen d'une aiguille montée.

- Après 24 heures en conditions normales de culture, les cellules sont fixées et colorées de la manière ci-après : le milieu de culture est éliminé et les cellules sont rincées 2 fois au PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4), puis fixées au moyen d'une solution aqueuse de paraformaldéhyde 3,7 % dilué dans du PBS, pendant 10 minutes. La solution de fixation est ensuite retirée et les cellules sont incubées dans une solution d'éthanol 70 % pendant 10 minutes. Les boîtes de pétri sont séchées à 42°C. La coloration des cellules est réalisée au Bleu de Coomassie pendant 30 secondes.

Préparation de 100 ml de bleu de Coomassie (tel que décrit par Bayreuther et al. en 1988).

50 mg de Bleu de Coomassie sont ajoutés à 100 ml d'une solution contenant 9% v/v acide acétique, 45% v/v méthanol et 46% v/v d' H_2O .

Ce colorant est filtré sur papier Wattman avant chaque utilisation.

La solution de coloration est éliminée et les boîtes de pétri sont rincées abondamment à l'eau distillée. Après séchage, dans une étuve à 42°C, on peut procéder au comptage des morphotypes. Les comptages des différents morphotypes sont effectués en microscopie à contraste de phase à deux reprises par deux expérimentateurs différents.

4. Détection de l'activité S-A- β -galactosidase

La β -galactosidase (β -gal) associée à la sénescence a été identifiée, pour la première fois, par l'équipe de Campisi comme un biomarqueur effectif d'une série de cellules qui vieillissent, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Dimri et al., 1995). Cette activité β -galactosidase spécifique aux cellules sénescents n'est détectable que par une coloration histochimique à pH 6 (Dimri et al., 1995). Ainsi, diffère-t-elle de l'activité β -gal des lysosomes qui n'est optimale qu'à pH 4, et de l'activité β -gal des bactéries qui connaît un maximum à pH 7.

4.1. Matériel

Formaldéhyde 2 % (Belgolabo, Belgique); glutaraldéhyde 0,2 % (Fluka, Pays-Bas); NaCl (Merck, Allemagne); acide citrique monohydrate (SDS, France); Na₂HPO₄.H₂O (Merck, Allemagne); ferrocyanure de potassium et ferricyanure de potassium (Merck, Allemagne) MgCl₂ (Merck, Allemagne); diméthylformamide, X-gal (Sigma,USA); KH₂PO₄ et K₂HPO₄ (Merck, Allemagne).

4.2. Méthode

Comme pour la détermination des morphotypes cellulaires, les cellules sont préalablement repiquées à faible densité cellulaire (700 cellules/cm²) dans des boîtes de pétri de 60 mm de diamètre (Falcon, Grande-Bretagne). Le milieu de culture est retiré et les cellules sont lavées 2 fois au moyen de PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4) et fixées, pendant 5 minutes, dans une solution aqueuse 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 colorées pour la détection de l'activité β-gal.

Préparation de la solution de coloration (pour 20 ml) :

- 4ml de tampon 0,2 M acide citrique/Na tampon phosphate, pH 6
- 1 ml d'une solution 0,1 M de ferrocyanure de potassium (K₃FeCN₆)
- 1 ml d'une solution 0,1 M de ferricyanure de potassium (K₄FeCN₆)
- 0,6 ml d'une solution de NaCl 5 M
- 40 µl d'une solution 1 M de chlorure de magnésium (MgCl₂)
- 12,36 ml d'eau distillée
- 1 ml d'une solution 20 mg/ml de 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside (X-gal) dilué dans du diméthylformamide (DMF). Le X-gal est conservé à -20°C sous forme d'une solution concentrée dans du DMF. Il est ajouté dans la solution de coloration juste avant usage.

Les cellules sont incubées à 37°C en l'absence de CO₂. Deux heures après, la coloration bleue est déjà visible mais elle n'est maximale qu'après 12 à 16h. Quand la coloration est déjà établie, elle est concentrée dans la région périnucléaire et plus ou moins diffuse dans le cytosol. Les cellules sont lavées 2 fois au PBS, puis 2 fois au méthanol et enfin, séchées à température ambiante. On peut, dès lors, déterminer les proportions des morphotypes colorés et non colorés.

5. Mesure de la synthèse d'ADN par incorporation de thymidine tritiée

5.1. Matériel

NaOH et HCl (Merck, Allemagne) ; acide trichloroacétique (TCA) (SDS, France); éthanol (SDS, France); Trypsine 0,25% (GIBCO, Grande Bretagne) ; BME (Flow Laboratories, U.K.) additionné de 10 % de sérum bovin foetal (Flow Laboratories, U.K.) ; thymidine tritiée (CEN Saclay, France, temps de demi vie biologique = 19 jours, aqualuma (Lumac, Pays-Bas).

5.2. Méthode

- Les cellules cultivées en boîte de culture de 75 cm² sont trypsinisées et resuspendues dans du BME + 10% de sérum. On réalise, à l'aide d'une chambre de Neubauer, une estimation de la densité cellulaire. Les cellules sont ensuite repiquées dans des boîtes multicompartimentées de 24 puits (Corning, USA) à une densité de 20.000 ou 50.000 cellules par puits, chaque puits recevant 1 ml de BME + 10 % de sérum.

- Le milieu de culture contenu dans les puits est remplacé, au moment désiré, par du BME + 10 % de sérum contenant 1 µCi/ml de thymidine tritiée. Les puits sont incubés pendant 3 h ou 24 h, selon les expériences, pour permettre l'incorporation de la radioactivité qui nous permettra de mesurer la prolifération ou la synthèse de l'ADN.

- Une fois l'incubation en présence de thymidine tritiée achevée, les puits sont rincés, tout d'abord, 2 fois au moyen de PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4). Les puits reçoivent ensuite 0,5 ml d'une solution de TCA 10 % préalablement refroidie sur glace. Les puits sont ensuite lavés 1 fois à l'éthanol 70 % et 1 fois au PBS. Quand le dernier rinçage est accompli, 500 µl de NaOH 0,5 M sont ajoutés dans chaque. Après 5 minutes d'incubation pour la lyse cellulaire, on neutralise au moyen de la même quantité d'HCl 0,5 M.

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

6. Etude de protéines régulatrices du cycle cellulaire (p21 et pRb) lors du vieillissement accéléré et du vieillissement normal des fibroblastes WI-38 par la technique du western blotting

6.1. Stimulation des cellules au sérum ou privation de sérum

Avant de procéder à l'extraction, les cultures jeunes (passage en culture 28), les cultures jeunes stressées et celles vieilles normalement sont synchronisées en vue d'obtenir des extraits respectifs en phase de quiescence et de prolifération du cycle cellulaire. Pour ce faire, 48 heures avant l'extraction, les cellules sont mises dans un milieu de privation composé de BME + 0,5 % d'hydrolysate de lactalbumine (GIBCO, Angleterre). Quarante huit heures après la privation, les cellules se trouvent en phase G0 du cycle cellulaire, constituant, par là, une culture quiescente. Une partie des cultures est ainsi extraite et une autre est restimulée avec du BME + 10 % sérum bovin pour 20 heures. Cette restimulation fait passer la plupart des cellules en phase S du cycle cellulaire.

6.2. L'extraction des protéines

6.2.1. Matériel

Aprotinine (Sigma, Saint-Louis, USA); β -glycérophosphate (Sigma, USA); EGTA (Sigma, USA) ; leupeptine (Sigma, USA); Nonidet P-40 (Sigma, USA); NaF (Merck, Allemagne); Orthovanadate de Sodium (Sigma, USA); Phénylméthylsulfonylfluoride (sigma, USA); Sodium (SDS, Merck, Allemagne); Tris-HCl (Merck, Allemagne); NaCl, KH_2PO_4 et K_2HPO_4 (Merck, Allemagne).

6.1.2. Méthode

Les cellules sont rincées 2 fois au moyen de PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9 % à pH 7,4) refroidi sur glace. Dans un premier temps, 150 μl de tampon de lyse sont déposés dans un coin de la boîte T75 et les cellules sont raclées dans le tampon à l'aide d'une gomme biseautée montée sur une tige métallique. Le tout est récupéré dans un tube de 5 ml muni d'un couvercle de type eppendorf (Sarstedt, Allemagne). On répète l'opération en remettant dans la boîte 50 μl de tampon de lyse. Les 200 μl récupérés dans l'eppendorf sont centrifugés à 10000 rpm (Heraeus, modèle Biofuge 13, Angleterre) pendant 10 minutes. Le surnageant, contenant les protéines cellulaires est récupéré dans un nouvel eppendorf, et congelé à -75°C . Une fraction de l'échantillon (40 μl) est mise de côté pour effectuer un dosage des protéines cellulaires.

Le tampon de lyse se compose de sels, de détergents, d'anti-protéases et d'anti-phosphatases. Le tableau ci-dessous donne les différents composants ainsi que leur concentration respective dans le tampon de lyse :

<u>Composés</u>	<u>Concentration finale</u>
B-glycérophosphate	60 mM
NaF	100 mM
Nonidet P-40	0,5 %
Orthovanadate de Sodium (Na_3VO_4)	1 mM
EGTA	2 mM
Aprotinine	80 $\mu\text{g/ml}$
Leupeptine	80 $\mu\text{g/ml}$
PMSF	0,6 mM
Tampon tris pH 8	50 mM
SDS	0,2 %

6.3. Dosage des protéines

6.3.1. Matériel

Les sels NaCl , KH_2PO_4 et K_2HPO_4 constituant le tampon PBS proviennent de Merck, Allemagne ainsi que le carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3), le Tartrate de sodium et de potassium, le Sulfate de Cuivre (CuSO_4), le NaOH 1 N et le Réactif de Folin-Ciocalteu (Merck, Allemagne). L'albumine sérique bovine 200 $\mu\text{g/ml}$ provient de chez Sigma, USA.

6.3.2. Méthode

Les dosages ont été réalisés suivant la méthode de Lowry (Lowry, O.H. *et al.*, 1951). Son principe général est la comparaison de l'absorbance d'échantillons d'extraits protéiques de concentration inconnue avec celle d'un étalon constitué d'une solution de 200 $\mu\text{g/ml}$ d'albumine sérique bovine. Le protocole est le suivant :

- A l'échantillon protéique à doser (200 μl d'une dilution 10 ou 20 fois, en général), ajouter 0,2 ml de NaOH 1N. Agiter fortement et incubé à température durant 30 minutes. Faire de même pour l'étalon albumine (200 μl d'une solution 200 $\mu\text{g/ml}$ d'albumine sérique bovine) et le blanc (200 μl d'eau distillée).

- Ajouter ensuite 2 ml de solution A. Agiter fortement et incuber pendant 10 minutes.

Préparation de la solution A (pour 102 ml) :

A 100 ml d'un solution 2% de Na_2CO_3 , ajouter 2 ml d'une solution de tartrate de sodium 2 % et 1 ml d'une solution 1% de CuSO_4 .

Cette solution est préparée juste avant l'emploi.

- Ajouter 0,2 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 2X dans de l'eau distillée. Agiter fortement et immédiatement. Incuber 30 minutes à température ambiante.

- A la trentième minute précisément, mesurer, sur un spectrophotomètre (Kontron, Zürich, Suisse), l'absorbance à 660 nm.

- La concentration en protéines de l'échantillon est calculée en utilisant la formule ci-dessous :

$$C_{\text{éch}} = ((\text{Abs}_{\text{éch}} - \text{Abs}_{\text{blanc}}) \times C_{\text{étalon}} \times \text{dilution}) / (\text{Abs}_{\text{étalon}} - \text{Abs}_{\text{blanc}})$$

où $\text{Abs}_{\text{éch}}$, $\text{Abs}_{\text{étalon}}$ et $\text{Abs}_{\text{blanc}}$ sont respectivement les absorbances de l'échantillon, de l'étalon et du blanc. Tandis que, $C_{\text{étalon}}$ est la concentration en protéines de l'étalon albumine, c'est-à-dire 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

6.4. Electrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-page)

Le principe de cette technique est de réaliser une séparation, suivant leur masse moléculaire, des protéines comprises dans un échantillon donné. Une quantité connue de protéines est déposée sur un gel de polyacrylamide-SDS traversé par un courant électrique. La présence de sodium dodécylsulfate qui est un détergent anionique, couvre l'échantillon protéique de charges négatives. Ainsi, les protéines migrent vers la borne positive, non plus en fonction de leur charge, mais en fonction de leur masse moléculaire. La vitesse de migration d'une protéine est, en effet, déterminée par sa taille et la concentration du gel en polyacrylamide qui détermine la taille de ses mailles.

6.4.1. Matériel

Acrylamide (Acros Organics, USA); Bisacrylamide, Bleu de Bromophénol (Janssen, Chimica, Belgique); Tris, Isobutanol, SDS, glycérol, HCl, (Merck, Allemagne); 2-Mercaptoéthanol (GIBCO, Angleterre); APS (SERVA); filtre de 0,45 μm (MN 615, Machen-Nagel, Allemagne); Temed (Biorad Laboratories, Angleterre); eau distillée.

6.4.2. Méthode

6.4.2.1. Réalisation du montage

- S'assurer que les plaques de verre, entre lesquelles le gel sera coulé, sont parfaitement propres. Dans le cas contraire, elles seront traitées de la manière suivante : lavage au moyen d'une éponge imbibée d'eau savonneuse, rinçage à l'eau de ville puis à l'eau distillée. Les plaques seront ensuite convenablement essuyées et toute trace d'humidité sera ôtée par un rinçage à l'acétone.
- Enduire les "spacers" de vaseline (Merck, Allemagne) et les assembler.
- Déposer les "spacers" sur la grande plaque et couvrir ceux-ci de la petite plaque.
- Disposer des pinces sur le montage.

6.4.2.2. Préparation du gel séparateur

Le pourcentage d'acrylamide dans le gel de séparation dépendra de la masse moléculaire de la protéine d'intérêt. Dans notre cas, nous avons utilisé des gels de 7,5 % en polyacrylamide pour l'étude de pRb et de 12% pour p21. Les proportions en acrylamide pour les différents gel de séparation sont données dans le tableau ci-dessous. Les volumes figurant dans ce tableau sont valables pour des gels de 45 ml :

Concentrations finales en acrylamide (en %)	5,00	6,00	7,00	7,50	8,00	9,00	10,00	12,00	13,00	15,00
Solution 30% acrylamide/0.8% bisacrylamide (en ml)	7,50	9,00	10,50	11,25	12,00	13,50	15,00	18,00	19,50	21,50
Tampon 1.5M tris-HCl, 0.4% SDS, pH 8.8 (en ml)	11,20	11,20	11,20	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25
Eau distillée (en ml)	26,25	24,75	23,25	22,50	21,75	20,25	18,75	15,75	14,25	12,25

6.4.2.2. Préparation du gel séparateur

- Mélanger les volumes adéquats de 30% acrylamide/0.8% bisacrylamide, de tampon 1.5 M tris-HCl, 0,4 % SDS, pH 8,8 et d'eau distillée.

Préparation de la solution d'acrylamide/bisacrylamide (30 : 0,8) (pour 100 ml) :

- Dissoudre 30 g d'acrylamide et 0,8 g de *N,N'*-méthylène-bisacrylamide dans 100 ml d'eau distillée.
- la solution se conserve jusqu'à 30 jours la solution à 4°C.

Préparation du tampon 1,5 M tris-HCl, 0,4 % SDS à pH 8,8 (pour 500 ml) :

- Dissoudre 91 g de tris et 2 g de SDS dans 300 ml d'eau distillée.
- Ajuster le pH à 8,8 au moyen de HCl 1N.
- Amener le volume à 500 ml au moyen d'eau distillée.
- Filtrer la solution à travers un filtre de 0,45 mm. Conserver la solution à 4°C.

- Ajouter 150 ml d'une solution de persulfate d'ammonium 10 % dans de l'eau distillée (cette solution sera impérativement préparée le jour même de son utilisation) et 30 ml de TEMED. Mélanger délicatement et couler directement le gel entre les deux plaques de verre jusqu'à 1,5 cm de la limite des puits du peigne.

- Enlever les bulles d'air.

- Déposer au sommet du gel 2 cm d'isobutanol saturé en eau.

Préparation de la solution d'isobutanol saturé en eau (pour 100 ml) :

- mélanger 50 ml d'isobutanol à un même volume d'eau distillée et agiter fortement.
- on obtient une solution biphasique dont la partie supérieure est l'isobutanol saturée en eau.

- Laisser polymériser pendant environ 1 heure.
- Enlever l'isobutanol en rinçant 2 fois à l'eau distillée. Eliminer la totalité du liquide à l'aide d'un papier buvard.

6.4.2.3. Préparation du gel concentrateur

Le gel concentrateur est le même quelle que soit la composition du gel séparateur.

Pour un gel de 12 ml :

- Mélanger 1,95 ml d'acrylamide/bisacrylamide (30 : 0,8); 3,75 ml de tampon 0,5 M tris-HCl; 0,4 % SDS à pH 6,8 et 9,15 ml d'eau distillée.

- Dissoudre 6,05 g de tris et 0,4 g de SDS dans 40 ml d'eau distillée.
- Ajuster le pH à 6.8 au moyen de HCl 1N et Préparation du tampon tampon 0.5M tris-HCl, 0.4% SDS, pH 6.8 (pour 100 ml) : amener le volume à 100 ml au moyen d'eau distillée.
- Filtrer la solution à travers un filtre de 0.45mm. Conserver la solution à 4°C.

- Ajouter 75 ml de persulfate d'ammonium 10 % et 15 ml de TEMED.
- Mélanger délicatement et couler le gel directement, au sommet du gel séparateur.
- Eliminer les bulles d'air.
- Mettre le peigne. Celui-ci doit s'enfoncer dans le gel de concentration qui, dès lors, polymérisera autour d'eux.
- Laisser polymériser pendant environ 1 h.

6.4.2.4. Préparation des échantillons

En général, on dépose par puit 10 µg de protéines contenues dans un volume compris entre 20 et 65 ml.

- Aux extraits protéiques à analyser, ajouter 1 volume de tampon d'échantillon.
- L'étalon de masse (Bio-rad SDS-PAGE1610304 ; 10-100 Kd) sera préparé comme suit (pour 100 ml) : à 5 ml d'étalon, ajouter 45 ml de tampon 0,5M tris-HCl; 0,4 % SDS à pH 6,8 et 50 ml de tampon d'échantillon.

Préparation du tampon d'échantillon (pour 100 ml) :

- mélanger 1,52 g de tris, 20 ml de glycérol, 2 g de SDS et 1 mg de bleu de bromophénol.
- ajouter 60 ml d'eau distillée.
- ajuster le pH à 6,8 au moyen de HCl 1 N.
- compléter au moyen d'eau distillée pour atteindre un volume final de 100 ml.

Au moment d'utiliser le tampon d'échantillon, y ajouter du 2-mercaptoéthanol à raison de 20 ml par ml.

- Dénaturer les protéines à 100 °C pendant 5 minutes.
- Refroidir sur glace pendant 5 minutes.

6.4.2.5. Réalisation de l'électrophorèse

- Enlever les peignes et ôter les surplus de gel non polymérisé à l'aide d'un papier buvard.
- Fixer les plaques à la cuve d'électrophorèse.
- Remplir le compartiment supérieur avec du tampon d'électrode 1 fois (de manière à ce que le sommet de la petite plaque soit recouvert par une hauteur de 1 cm de liquide). Vérifier l'étanchéité du compartiment supérieur.

Préparation du tampon d'électrophorèse 4X : dissoudre dans 2 litres d'eau distillée : 48,4 g de Tris (pour une concentration finale de 0,05 M; 230,6 g de glycine pour une concentration finale de 0,38 M; bien vérifier que le pH est aux environs de 8,3. Ajouter 40 ml de SDS 20 % pour une concentration finale de 0,1%. Cette préparation stock se conserve pendant un mois maximum. Diluer 4X avant l'usage.

- Remplir le réservoir inférieur avec le même tampon et chasser, à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille pliée, les éventuelles bulles d'air.
- Déposer les échantillons dans les puits.
- Migration : 1 heure à 30 mA (lorsque les échantillons se trouvent dans le gel concentrateur) puis environ 4 heures à 45 mA (elle est arrêtée quand le colorant des échantillons se situe au bas du gel).

6.5. Transfert des protéines (western blotting)

6.5.1. Matériel

Tris, glycine, NaOH, HCL (Merck, Allemagne), membrane d'immobilone (USA), papier whatman, eau distillée.

6.5.2. Méthode

- Préparer un morceau de membrane Immobilone et quatre feuilles de papier Whatman 3MM à la dimension du gel, soit environ 12,5 x 16 cm.
- Immerger la membrane dans du méthanol pendant 1 minute.
- Plonger la membrane et les feuilles de papier Whatman dans du tampon de transfert pendant 15 minutes.

Préparation du tampon de transfert (pour 5 l) :

- dans 3,8 l d'eau distillée, dissoudre 12 g de tris et 57,5 g de glycine
- ajuster le pH à 8,3 et porter, ensuite, le volume à 4 litre
- Ajouter 1 l de méthanol

- Arrêter l'électrophorèse, détacher le montage de la cuve, enlever les "spacers" et soulever délicatement une des deux plaques de verre. Découper le gel concentrateur.
- Placer délicatement le gel de séparation à même la membrane d'immobilone, les deux entre deux papiers whatman imbibés de tampon de transfert. Le tout est placé dans le système sandwich.
- Reserrer fermement le système sandwich et le placer dans l'appareil Hoeffler, le gel du côté de la cathode (borne négative) et la membrane du côté de l'anode (borne positive), car les protéines vont migrer du gel vers la membrane.
- Rajouter du tampon de transfert.
- Faire le transfert dans la chambre froide à 4°C pendant toute la nuit à 30 volts.

6.6. Détection par anticorps de p21 et pRb

6.6.1. Matériel

NaCl, Tris (Merck, Allemagne) , triton 20 (Merck, Allemagne), lait écrémé lyophilisé (Nestle, Suisse), anticorps primaire (anti-Rb (c-15), rabbit polyclonal IgG, n° SC-050, USA; anticorps anti-p21 anti-humain purifié, n° 15091A, Pharmingen, USA); anticorps secondaire (anti-souris; anti-lapin Ig, lié à de la peroxydase de Raifort (NA 931, NA 934, Amersham, G-B)), révélateur (N° 757277, Ilford, G-B); fixateur (n° 757277, Ilford, G-B); films (Hyperfilm MPRPN6H, Amersham, G-B).

6.6.2. Méthode

Préparation du tampon TBST (pour 1 l) : mélanger 6 ml de tris 1 M pH 8 avec 15 ml de NaCl 5 M et 250 μ l de tween 20. Porter le volume à 1 l.

- 1) Incuber la membrane, pendant 2 fois 1 h, dans du tampon TBST additionné de 5 % de lait lyophilisé (sous agitation douce).
- 3) Diluer 1000 fois l'anticorps primaire dans du TBST additionné de 5 % de lait lyophilisé :
- 4) Incuber la membrane avec l'anticorps primaire pendant 2 h, à température ambiante, sous agitation douce.
- 5) Laver la membrane pendant 3 X 10 minutes au moyen de tampon TBST.
- 6) Réaliser une dilution 1000 fois de l'anticorps secondaire (kit Amersham) dans du TBST additionné de 5 % de lait écrémé lyophilisé
- 7) Incuber la membrane avec l'anticorps secondaire pendant 1 heure, à T° ambiante, sous agitation douce.
- 8) Laver la membrane au moyen de TBST comme suit :
 - 1 X 15 minutes

- 4 X 5 minutes

9) Détection et révélation :

Nous avons procédé tel que décrit dans le kit Amersham : pour reconstituer la solution de détection : mélanger les solutions 1 et 2 à volume équivalent. La quantité requise est de 0,125 ml/cm². Après incubation de la membrane pendant 1 minute à température ambiante, elle est retirée de la solution de révélation et l'excès de réactif est égoutté. La membrane est enveloppée dans du papier saran tout en veillant à éviter les bulles d'air entre l'enveloppe et la membrane. Ainsi enveloppée, elle est mise dans une cassette et autoradiographiée sur des ultrafilms-ECL. Le temps d'exposition du film est variable suivant la quantité de la protéine cible transférée sur la membrane. Ces dernières opérations se déroulent, bien entendu, en chambre noire.

10) Développement des films d'autoradiographie.

Le film est incubé successivement dans trois solutions différentes, dans l'ordre suivant. Premièrement, pendant 3 minutes, dans un bain de révélateur. Le film est ensuite rincé, durant 30 secondes, dans un bain d'eau distillée et, enfin, incubé 3 minutes dans le bain de révélateur. Pour terminer, le film est abondamment rincé à l'eau courante.

Résultats et discussion

1. Mise au point d'une méthode de vieillissement accéléré de cultures de fibroblastes WI-38 sous l'effet de stress oxydatifs successifs au moyen de tert-butylhydroperoxide.

1.1. Préliminaire

Le principal objectif de ce travail est l'étude de trois protéines régulatrices du cycle cellulaire (p21 et pRb) lors du vieillissement normal et accéléré de la souche WI-38 de fibroblastes humains. Nous désirions comparer le niveau d'expression de p21 et le niveau de phosphorylation de pRb dans le cas d'un vieillissement accéléré sous l'effet de stress oxydatifs successifs par rapport au vieillissement normal des fibroblastes WI-38.

Le laboratoire de Biochimie Cellulaire dispose d'une grande expérience de la pratique des stress radicalaires appliqués à différentes cultures cellulaires. Cependant, toutes ces expériences avaient été, jusqu'à présent, réalisées à petite échelle dans des boîtes de cultures multicompartimentées de 24 ou 96 puits. Ces quantités de matériel biologique sont nettement insuffisantes pour réaliser, à partir de ces cultures vieilles de manière accélérée, des expériences de biologie moléculaire telle que l'étude de l'expression des protéines.

Nous avons donc cherché d'emblée, à mettre au point une méthode de vieillissement cellulaire accéléré sous l'effet de stress oxydatifs successifs à grande échelle. Des cellules ont été ainsi cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm², afin d'obtenir de grandes quantités d'extraits protéiques de cellules stressées. Ces mises au point ont été réalisées sur des cultures confluentes de fibroblastes WI-38 jeunes à des passages 27 à 30.

Durant la mise au point de notre méthode des stress successifs, trois paramètres majeurs ont été pris en compte, à savoir : l'intensité du stress (concentration de la molécule génératrice de radicaux libres dans le milieu d'incubation), la durée et la nature du milieu d'incubation lors des stress. Toussaint et al. (1992) ont montré précédemment

	Durée stress (min)					
	Contrôle	20	30	40	60	70
Morphotypes						
I	35,1±5,4	16,1±0,9	15± 0,8	15± 0,6	17,2±3,2	15±0
II	47,9± 2,8	42,5± 5,4	49,7± 4,8	58,1± 0,6	44,7±6	50,2±4,2
III	15,4 ±1,3	37,5± 5,3	24,5± 5,6	23,1± 3	31,7±2,3	24±1,4
IV	1,1 ±0,7	4 ±1,5	2,5± 0,6	3,2 ±0,7	6,1±0,1	8,1±4,3
V	0,6± 0,5	0,5± 0,3	0,7± 0,1	0,5± 0,8	0,4±0,1	3,1±0,8
VI	0	0	0	0	0	0
VII	0	0	0	0	0	0

Figure 13. Effet d'un stress unique sous t-BHP 10^{-4} M dilué dans du PBS pendant 20, 30, 40, 60, 70 minutes sur les proportions des différents morphotypes observés 5 jours après le stress en comparaison avec des contrôles. Les résultats sont donnés en pourcentage d'un morphotype donné dans les cultures contrôle et stressées. Pour chaque stress un minimum de 700 cellules a été compté.(d'après, Toussaint et al., 1992)

l'importance de ces facteurs : l'effet (léthalité) des stress à l'éthanol et au t-BHP est dépendant de l'intensité, de la durée et du milieu dans lequel le stress est administré.

1.2. Durée des stress

Les données empruntées à Olivier Toussaint (1992) (figure 13) mettent bien en évidence l'effet d'un stress unique appliqué pendant des durées différentes sur une culture de fibroblastes WI-38. Ces résultats démontrent bien que les cellules stressées pendant une durée de 70 minutes voient leurs proportions en morphotypes I (MF I pour Mitotic Fibroblasts I) passer de 35,1 % à 15 %. Alors que les MF II passent de 47 % à 50,2 %, les MF III de 15,4 % à 8,1 % et les morphotypes postmitotiques IV (PMF IV) de 1,1 à 8,1 %.

L'application de l'éthanol à des cultures cellulaires et à des concentrations différentes (2% et 4%) montre aussi, par rapport à des cultures contrôles, une diminution notable des morphotypes jeunes et une augmentation des morphotypes âgés, proportionnellement à la concentration (données non montrées).

Nous avons choisi arbitrairement de réaliser des stress de 1 h, durée commune d'un stress appliqué *in vitro* à des cultures cellulaires. Afin d'obtenir un vieillissement accéléré important, et donc des populations de fibroblastes qui, après traitement, sont composées d'une grande proportion de morphotypes âgés (III à VI), nous avons opté pour une méthode qui soumet les cellules à cinq stress successifs. Deux stress étant espacés de 24 ou 48 h en fonction de leur intensité.

1.3. Nature du milieu d'incubation lors des stress

Il est bien connu que la nature du milieu d'incubation influence fortement les effets de stress appliqués à des cultures cellulaires. Des stress oxydatifs réalisés dans du tampon PBS comme milieu d'incubation révèlent une viabilité cellulaire amoindrie par rapport à des stress appliqués dans du BME + 10 % de sérum (Toussaint et al., 1994) ou en présence de molécules antioxydantes comme la vitamine E (Paker et Smith, 1974).

Concentration en t-BHP pendant 1h	Nombre de stress effectués	Viabilité des cellules
5 mM	1	Mort cellulaire totale (> 95%) dès le 1er stress
1 mM	2 stress espacés de 24 h	Mort cellulaire totale (> 95 %) dès le 2nd stress
500 µM	3 stress espacés de 24 h	Mort cellulaire importante (> 80 %) après le 3è stress
50 µM	5 stress espacés de 24 h	Très bonne survie (> 90 %)
10 µM	5 stress espacés de 24 h	Très bonne survie (> 90 %)
100 µM	5 stress espacés de 48 h	Très bonne survie (> 90 %)

Figure 14: Effet de stress multiples sous t-BHP sur la survie cellulaire. Les cellules ont été soumises à diverses concentrations en t-BHP (de $50 \cdot 10^{-5}$ M à $5 \cdot 10^{-3}$ M) pendant 1 h. Lorsque la survie cellulaire le permettait, des stress successifs ont été effectués avec un maximum de stress à $5 \cdot 10^{-5}$ M ou 10^{-4} M, étant espacés soit de 24 h soit de 48 h.

1.3.1. Intensité des stress

Lors d'un stress radicalaire, la concentration de la molécule génératrice de radicaux libres est bien entendu le premier facteur qui déterminera l'importance de l'effet du stress sur des cultures de cellules, en terme de mortalité cellulaire et dans notre cas, en terme d'induction d'un vieillissement accéléré. Plus précisément, l'intensité du stress jouera sur les variations des proportions des différents morphotypes après l'administration du stress par rapport à la situation de départ.

Nous avons donc réalisé des stress successifs sous différentes concentrations en t-BHP. Les résultats de ces expériences sont repris dans la figure 14. Ces résultats proviennent d'observations des cultures réalisées au microscope à contraste de phase et d'estimations des densités cellulaires, à l'aide d'une chambre de Neubauer, avant le stress et 24 heures après celui-ci. Il s'avère que sous les concentrations en t-BHP utilisées à plus ou moins forte concentration (5,1 et 0,5 mM en t-BHP, dilué dans du BME + 10 % de sérum), une plus ou moins forte mortalité, au sein des cultures traitées, a été observée. A 5 mM, les effets léthaux du stress sont déjà observables seulement 1 h après l'administration : une grande majorité des cellules se trouvent en suspension dans le milieu de culture et non plus fixées au fond de la boîte de culture. On note que lorsque la concentration en t-BHP est abaissée, l'effet léthal ne survient qu'après deux et trois stress pour des concentrations respectivement de 1 et 0,5 mM en t-BHP. Par ailleurs, nous avons constaté que seuls les stress au t-BHP à des concentrations inférieures ou égales à 100 μ M, appliquées pendant une heure, dans du BME + 10 % de sérum comme milieu d'incubation, permettaient d'avoir une grande survie des cellules, après 4 ou 5 stress successifs.

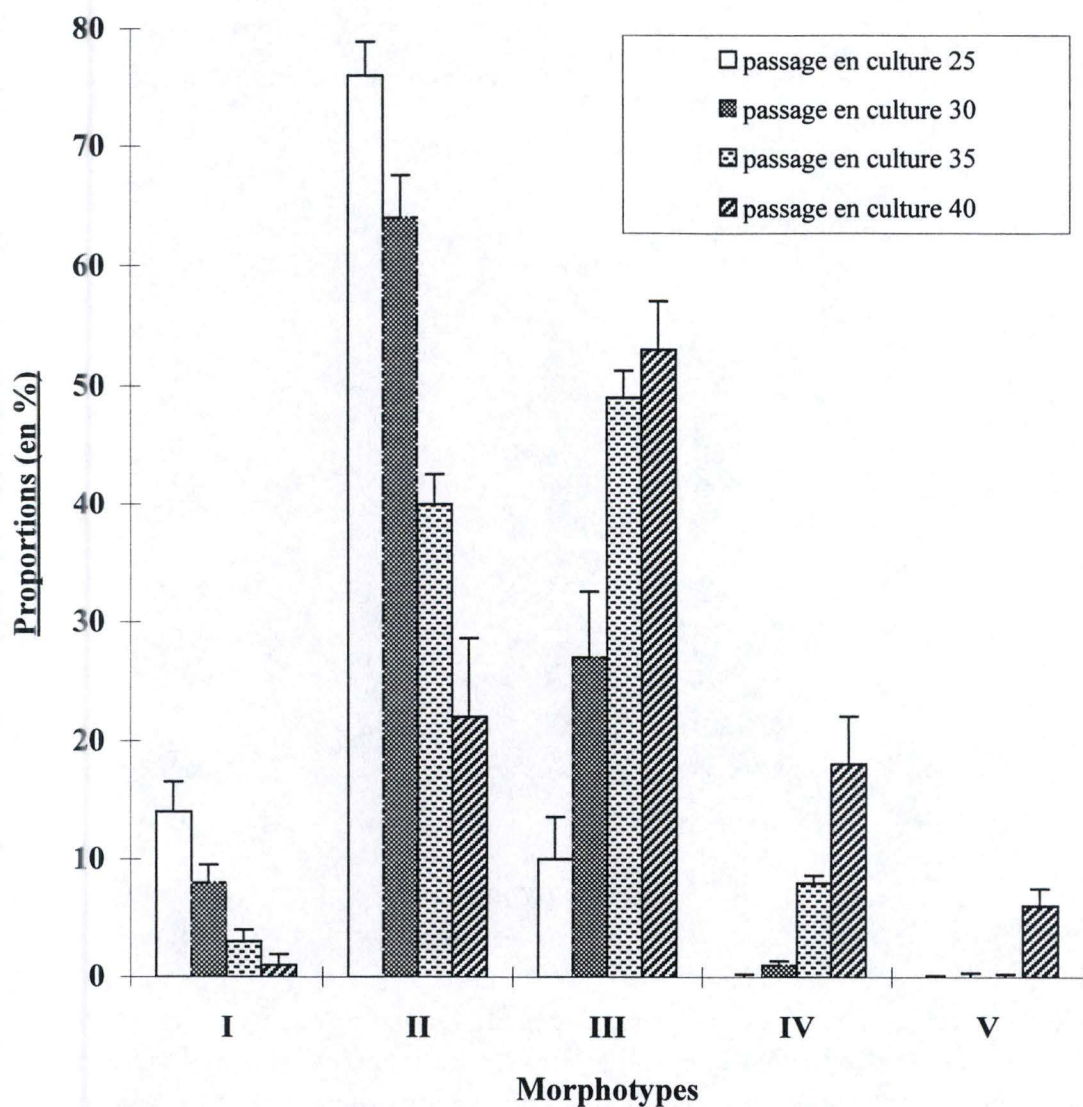


Figure 15. Évolution des proportions des différents morphotypes (I à V) au cours du vieillissement normal *in vitro* de la souche WI-38 de fibroblastes humains. Les résultats sont exprimés en pourcentage de morphotypes présents dans des populations cellulaires aux passages en culture 25, 30, 35 et 40.

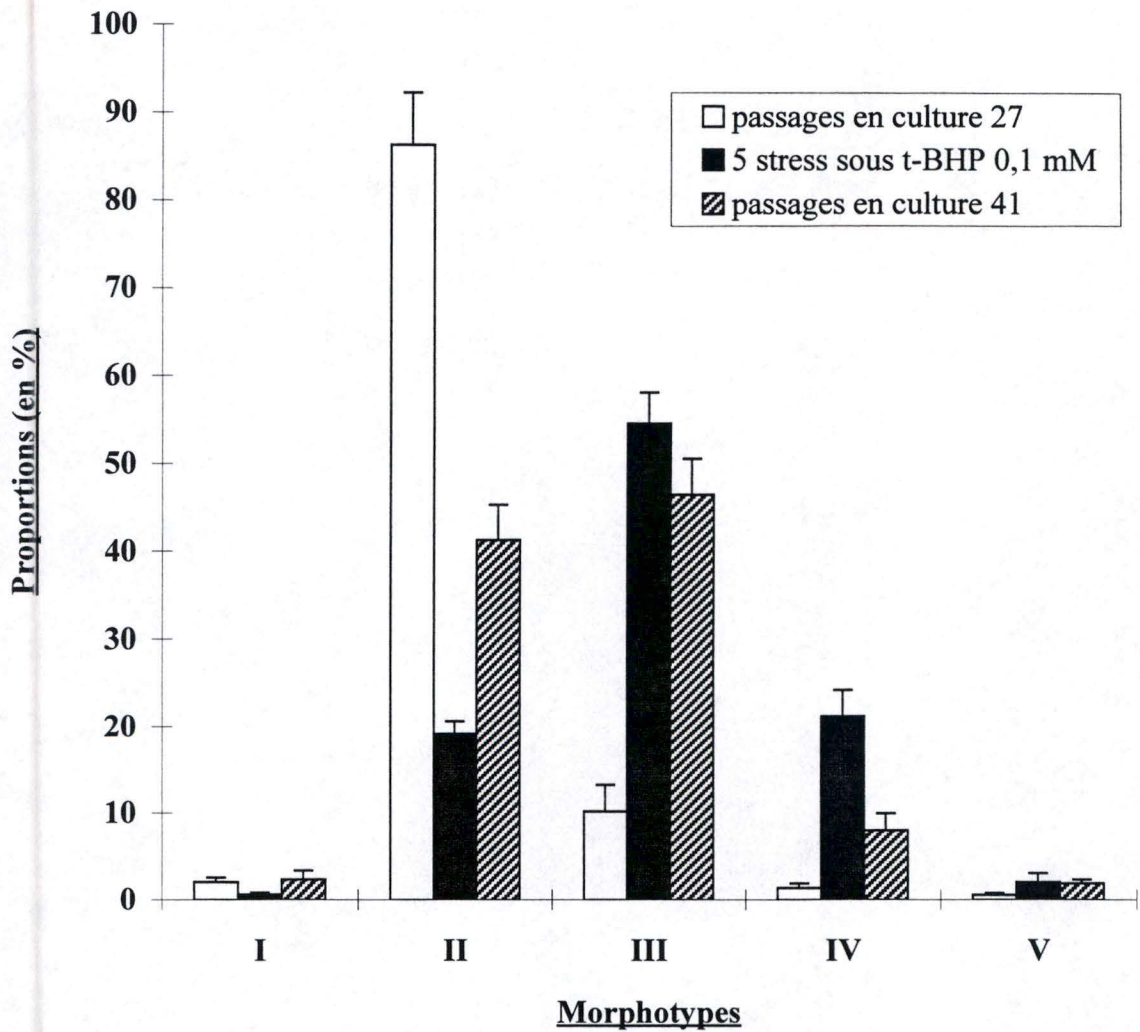


Figure 16. Comparaison des proportions des différents morphotypes (I à V) dans des cultures de fibroblastes WI-38 jeunes (passages en culture 27), vieilles normalement (passages en culture 41) ou ayant subi un vieillissement accéléré sous l'action de 5 stress successifs au moyen de t-BHP 0,1 mM dilué dans du BME+10% de sérum.

2. Détermination des morphotypes cellulaires

Quand des fibroblastes sont repiqués à très faible densité cellulaire, puis fixés au paraformaldéhyde et colorés au bleu de Coomassie, qui met en évidence de façon non spécifique des protéines diffuses dans le cytosol, on peut observer au sein de la culture des cellules, diverses morphologies selon leur stade de vieillissement. Les cellules de type I ou morphotype I (MF I), sont effilés et leur noyau est au centre. Les morphotypes II présentent une petite taille mais un volume plus prononcé par rapport aux premiers (figure 21a, page 40). Le type III se caractérise par une augmentation de taille et du volume ainsi que une apparition de "blebs" ou d'échancrures aux pôles de la cellule (figure 21b). Les PMF IV sont les plus allongés et présentent aussi de légères échancrures (figure 21c). Les PMF V sont de grande taille, arrondis et volumineux (figure 21d). Les PMF VI ont une très grande taille, avec un gros noyau et un cytoplasme aux bords mals délimités (figure 21e). Le PMF VII est rarement observé et constitue une forme de dégénérescence cellulaire.

Ces morphotypes sont présents dans des proportions diverses dans des cultures cellulaires à différents niveaux de doublement de population. La figure 15 nous montre que les morphotypes jeunes sont d'autant plus abondants que la culture est à un niveau précoce de doublement de population : les cellules à passage 25 comprendront ainsi plus de MF I que les cellules à passage 30, 35 ou 40. En effet, en fonction du nombre de passages en culture, ici de 25 à 40, nous observons une diminution et une disparition quasi totale des cellules de type I. Les MF II connaissent une chute importante dans leurs proportions, tandis qu'augmentent les proportions des MF III, des PMF IV et des PMF V. La détermination des proportions des différents morphotypes dans une population cellulaire donnera ainsi, une mesure de son état de vieillissement, puisque ces derniers sont fonction de l'âge de la culture en terme de doublement de population. Nous avons d'abord utilisé ce critère pour quantifier l'effet des stress successifs au t-BHP sur le vieillissement *in vitro* des fibroblastes WI-38.

Les proportions des différents morphotypes dans des cultures ayant subi un vieillissement accéléré suivant la méthode décrite au point précédent ont été déterminées et comparées à celles des cultures de fibroblastes jeunes ou ayant eu un vieillissement normal. Les résultats montrés dans la figure 16 révèlent une forte composition de MF II (> 85 %) des cultures jeunes non stressées et une teneur modérée en MF III (10,1 %), en PMF IV (1,3 %) et en PMF V (0,5 %). Dans les cultures jeunes ayant subi des stress successifs, par contre les MF II effleurent à peine les 20 % tandis que les MF III constituent plus de

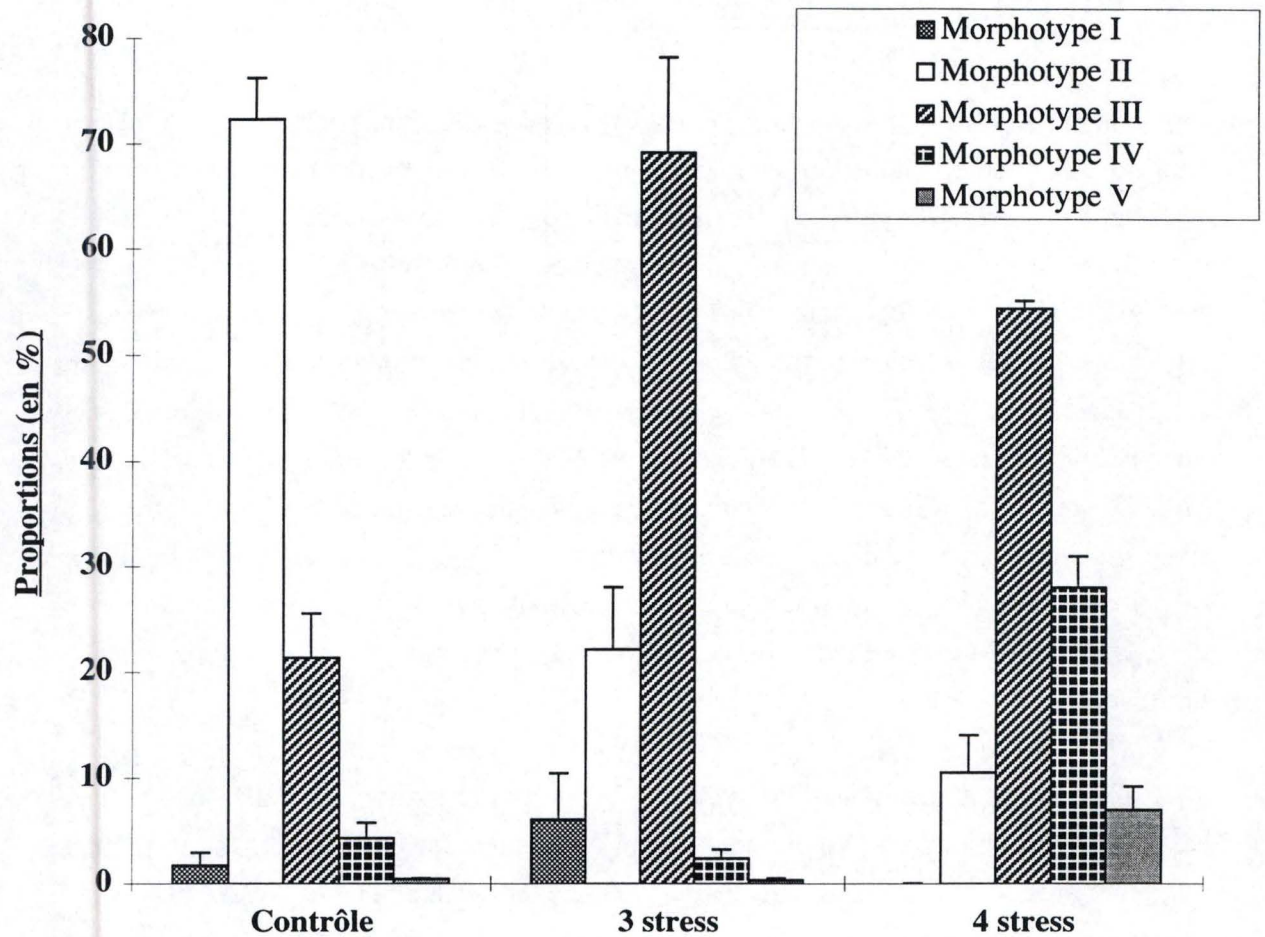


Figure 17. Analyse des proportions des différents morphotypes I à V présents dans des cultures de fibroblastes WI-38 ayant subi successivement 3 et 4 stress, de 1 h, au moyen de t-BHP 100 μ M dilué dans du BME+10 % de sérum. Les stress étant espacés de 48 h. Les cultures contrôles ont été incubées dans du BME+10 % de sérum en l'absence de t-BHP.

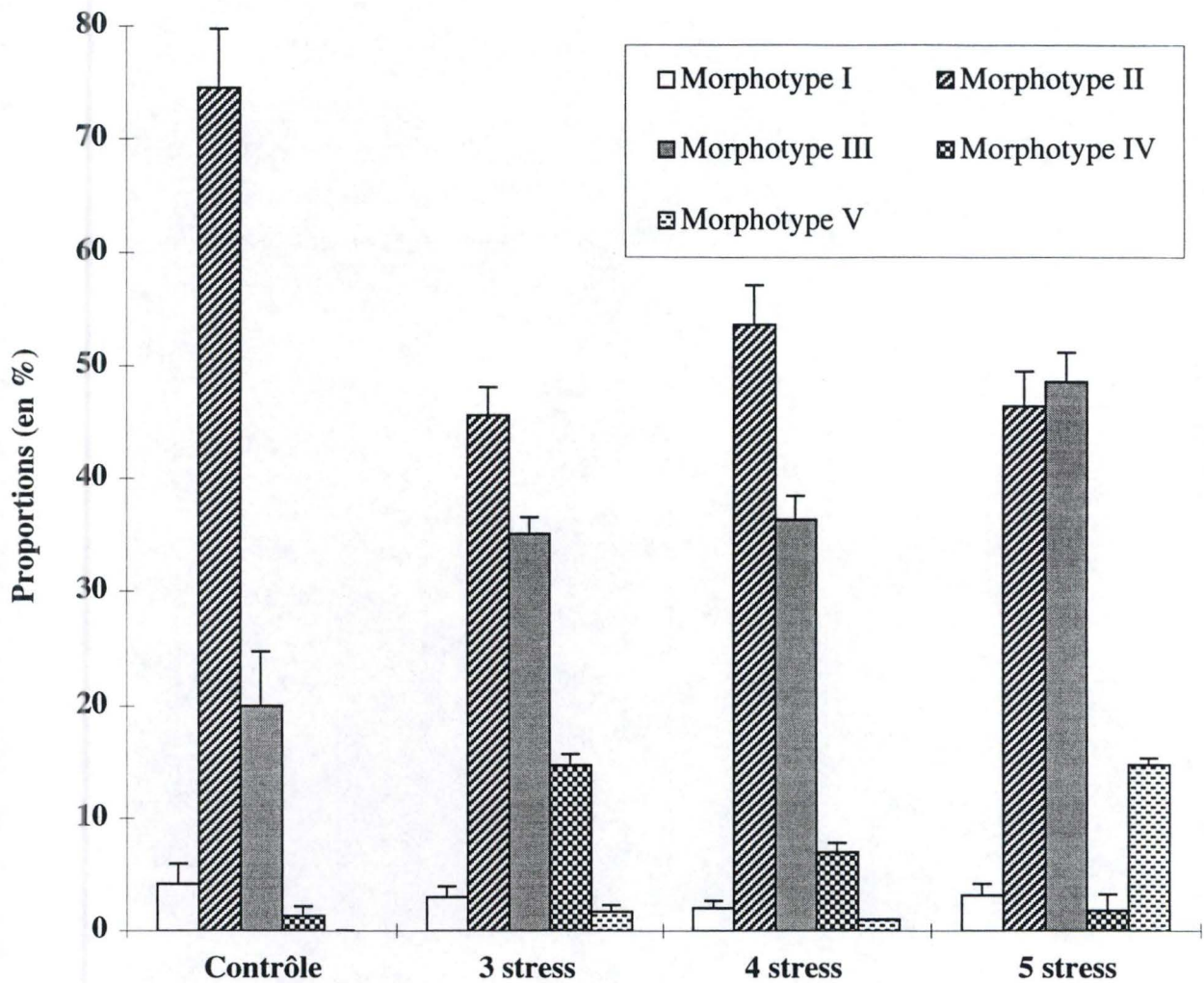


Figure 18. Analyse des proportions des différents morphotypes I à V présents dans des cultures de fibroblastes WI-38 ayant subi 3, 4, et 5 stress successifs de 1 heure au moyen t-BHP 50 μ M dilué dans du BME+10 % de sérum. Les stress sont espacés de 24 h. Les cultures contrôles ont été incubées dans du BME+10 % de sérum, en l'absence de t-BHP.

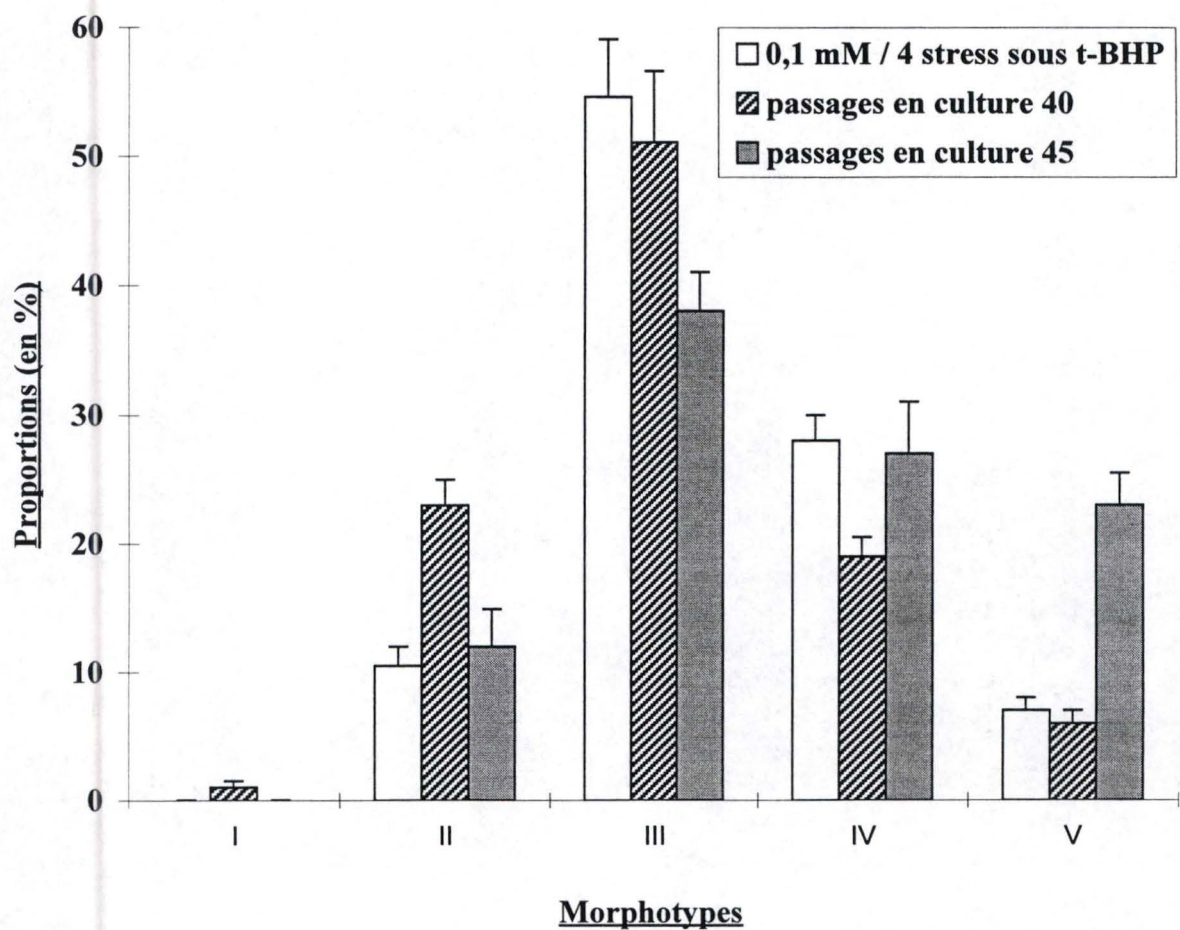


Figure 19. Comparaison des proportions des différents morphotypes (I à V) présents dans des cultures de fibroblastes WI-38 vieillies normalement (passages en culture 40 et 45, le passage 45 représentant 100% de la durée de vie *in vitro*) et ayant subi un vieillissement accéléré sous l'action de 4 stress successifs au moyen de t-BHP 0,1 mM dilué dans du BME+10% de sérum.

la moitié de la culture cellulaire et la proportion de PMF IV est 16 fois plus élevés par rapport aux cellules jeunes non stressées. Les profils morphotypiques des cellules vieilles normalement présentent quant à elles, une allure similaire à celle des cellules stressées. Les MF II constituent moins de 45 % de la culture, les MF III en constituent presque la moitié (46,5 %) tandis que les PMF IV y sont 6 fois plus abondants que dans les cultures jeunes non stressées et les PMF V y passent du simple au quadruple.

Comparées aux cultures contrôles, c'est-à-dire des cultures au même niveau de doublement de population mais non stressées, les cultures successivement stressées révèlent donc, une accumulation des morphotypes âgés tandis que les morphotypes jeunes diminuent sensiblement. Les données de la figure 17, provenant des stress successifs au t-BHP appliqués pendant une heure toutes les 48 h, démontrent que, à l'intérieur d'une même culture, la population varie et se diversifie en fonction du nombre de stress subis. En effet, après trois stress à 100 μ M, les MF I diminuent du tiers et disparaissent après 4 stress. Les proportions des MF II connaissent une chute remarquable, passant de près de 70 % à moins de 10 % après 4 stress, alors que les MF III sont de plus en plus nombreux, passant de 20 % dans le contrôle à près de 50 % après 4 stress. De même les PMF IV augmentent leurs proportions et les PMF V apparaissent. Les résultats obtenus après 3 stress montrent une situation intermédiaire par rapport aux résultats obtenus après 4 stress. On remarquera ainsi que les profils morphotypiques âgés augmentent en effectifs à chaque stress.

La figure 18 qui met en exergue d'autres données obtenues après des stress successifs au t-BHP à 50 μ M et appliqués pendant une heure de temps, décèle les mêmes conclusions. Nous avons surtout ici une diminution de MF II et une augmentation des pourcentages de MF III et PMF IV lorsque le nombre de stress augmente.

Cette évolution des cellules stressées est similaire à celle des cultures de cellules ayant déjà accompli 40 et 45 passages en culture. La figure 19 démontre ainsi que les cultures jeunes ayant subi des stress successifs présentent, au quatrième stress, un profil sénéscent. Plus de 50 % de cellules à profil morphotypique III sont en passe d'être post-mitotiques tandis que 35 % des cellules ont déjà arrêté leur division (PMF IV et PMF V). De même pour les cultures aux passages tardifs, les cellules en fin de phase prolifératives dépassent les 50 % dans les cultures au passage 40 et constituent plus de 30 % dans les cultures au passage 45. La figure 19 nous recompose en image ces données.

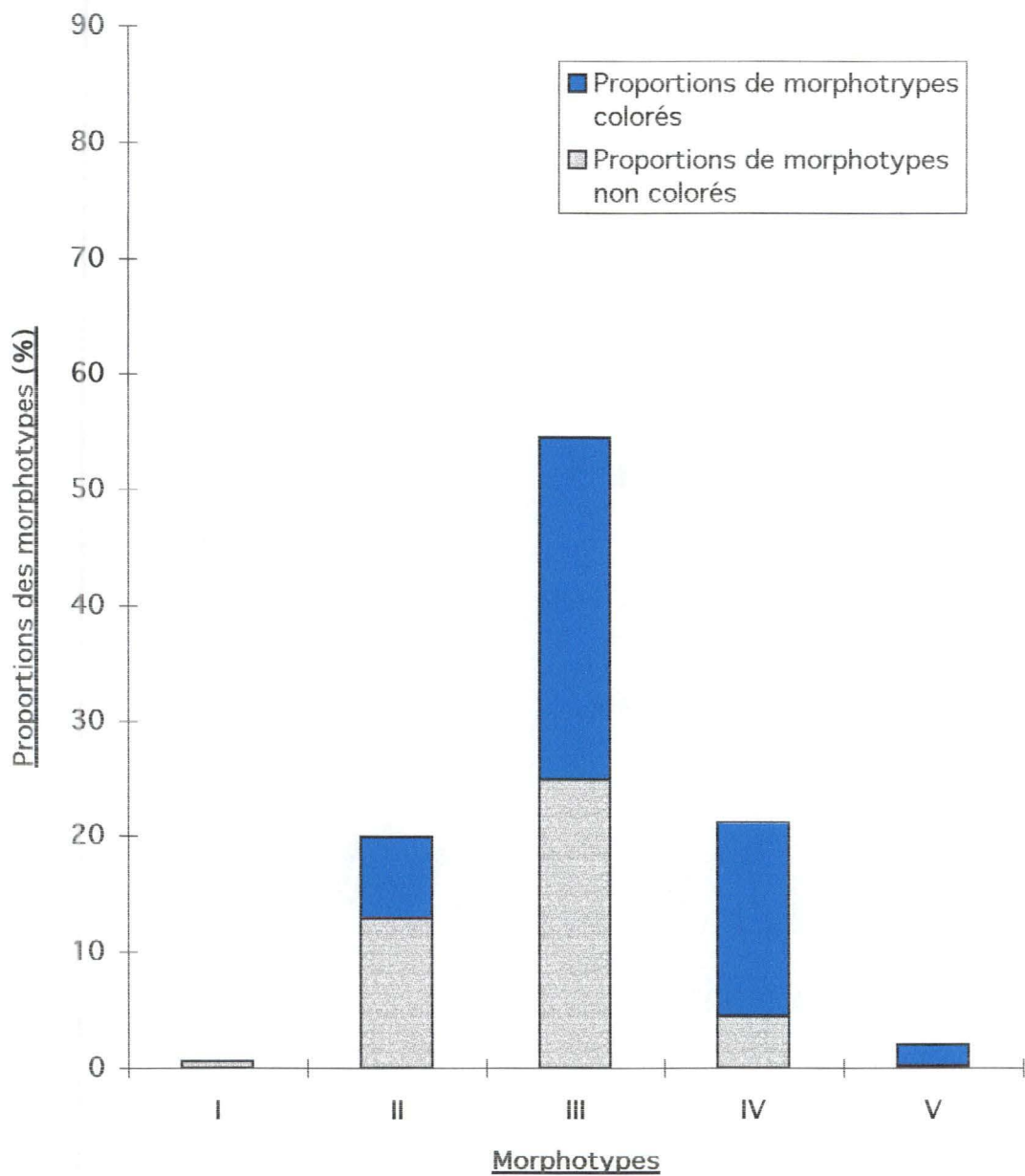


Figure 20. Proportions de morphotypes présentant ou non une activité β -galactosidase associée au vieillissement à pH 6 dans des cultures de cellules âgées (au passage 42). La partie supérieure des colonnes représente la proportion de chaque morphotype présentant l'activité β -galactosidase.

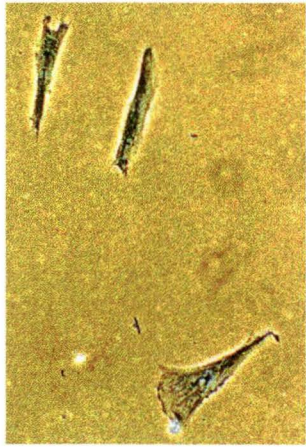


Figure 21a

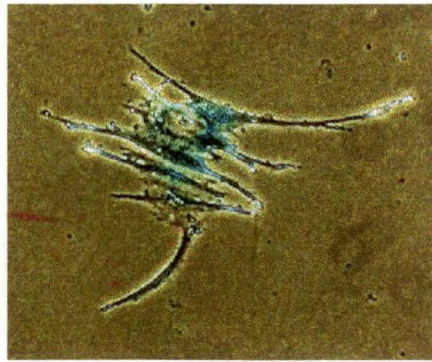


Figure 21b

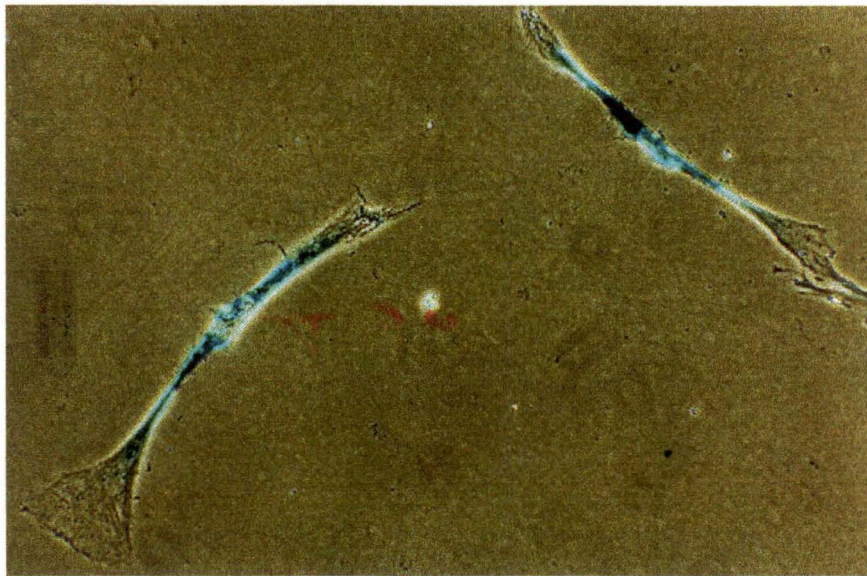


Figure 21c

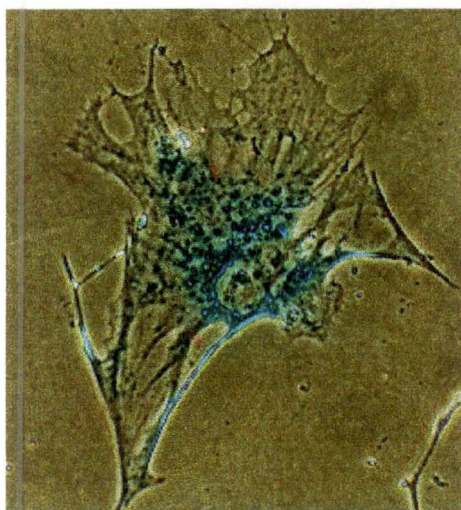


Figure 21d

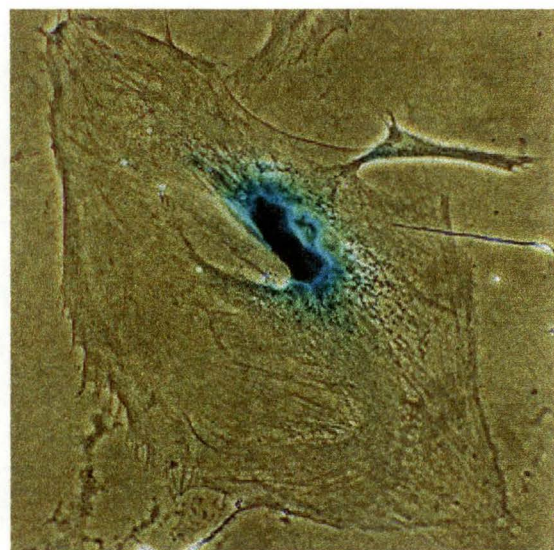


Figure 21e

Figure 21: absence d'activité β -gal dans les MFII (21a) et présence de cette activité dans les MFIII (21b), MFIV (21c), MFV (21d), MFVI (21e) (grossissement 400x).

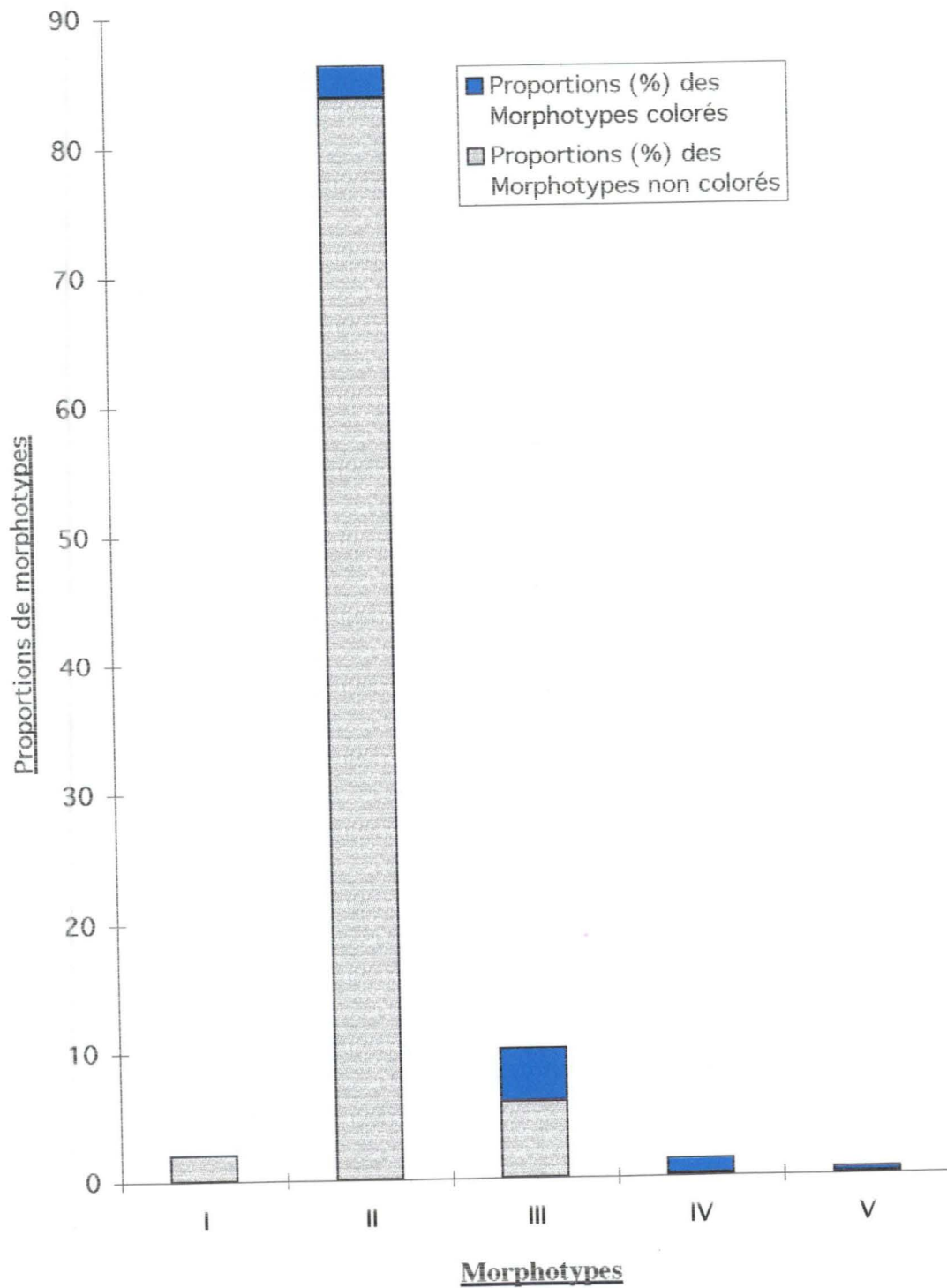


Figure 22. Proportions de morphotypes présentant ou non une activité β -galactosidase associée au vieillissement à pH 6, dans des cultures de cellules jeunes (au passage 28) non stressées. La partie supérieure des colonnes indique les proportions des morphotypes qui présentent l'activité β -galactosidase.

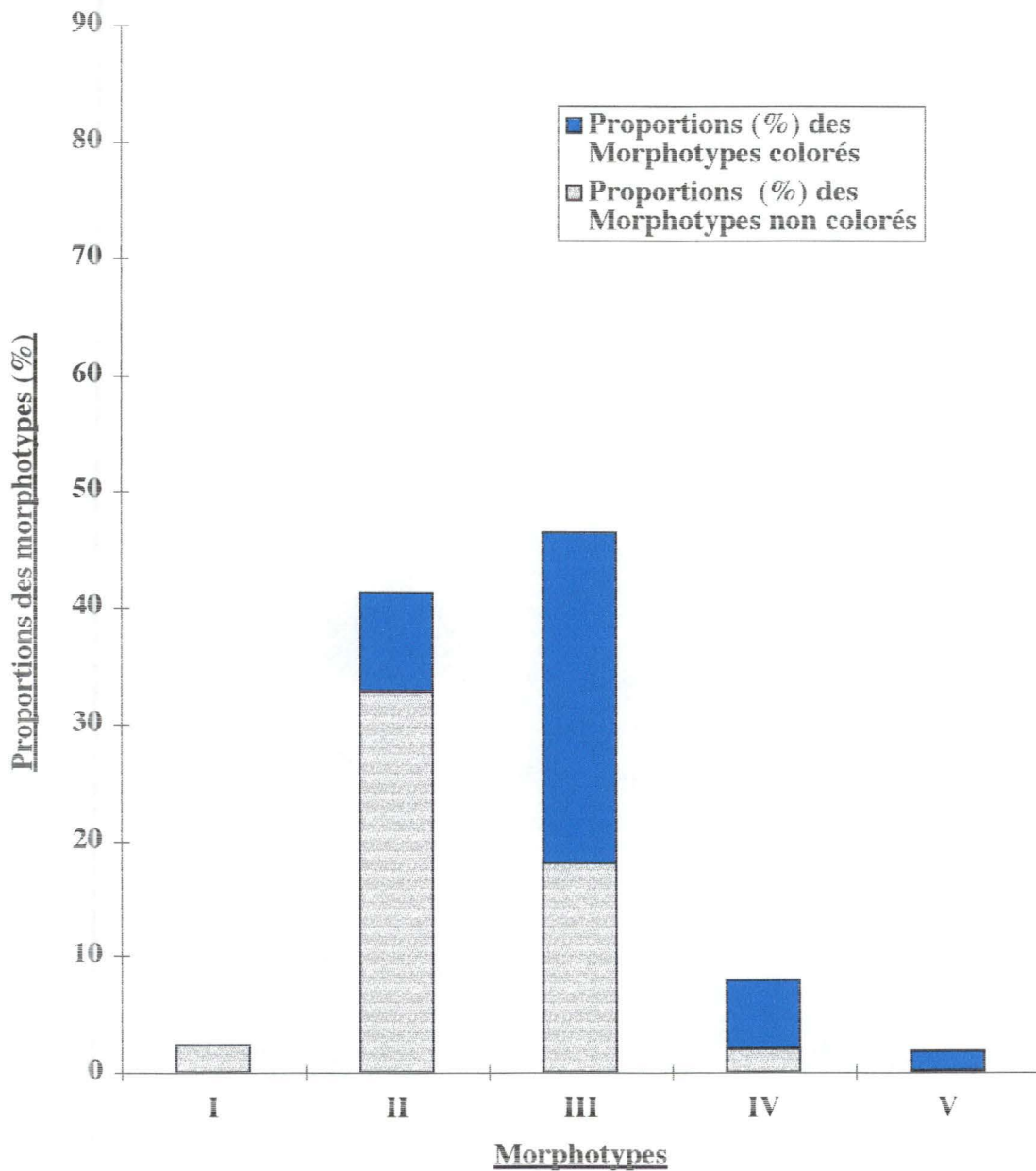


Figure 23. Proportions de morphotypes présentant ou non une activité β -galactosidase associée au vieillissement, à pH 6, dans des cultures de cellules jeunes (au passage 28) ayant subi 5 stress successifs au t-BHP 100 μ M. La partie supérieure des colonnes représente la proportion en pourcentage de chaque morphotype présentant une activité β -gal associée à la sénescence.

	Pourcentage de la durée de vie maximum <i>in vitro</i>	Pourcentage des fibroblastes présentant l'activité β -gal dans les différentes populations
Fibroblastes au passage en culture 28	62 %	11,9 %
Fibroblastes au passage en culture 30	67 %	14,6 %
Fibroblastes au passage en culture 35	77 %	28 %
Fibroblastes au passage en culture 42 (cellules présénescentes)	93 %	44,7 %
Fibroblastes au passage en culture 45 (cellules sénescentes)	100 %	81,8 %
Fibroblastes au passage en culture 28 ayant subi des stress successifs sous t-BHP 100 μ M	–	55,2 %
Fibroblastes transformés par le grand antigène T de SV-40.	–	< 1 %

Figure 24. Détection de l'activité β -gal associée au vieillissement (S-A- β -gal) en fonction du pourcentage de la durée de vie maximum *in vitro* que les fibroblastes ont atteint dans nos conditions de cultures : fibroblastes au passage en culture 28, 30, 35, 42, 45 et des fibroblastes transformés par le grand antigène T de SV 40.

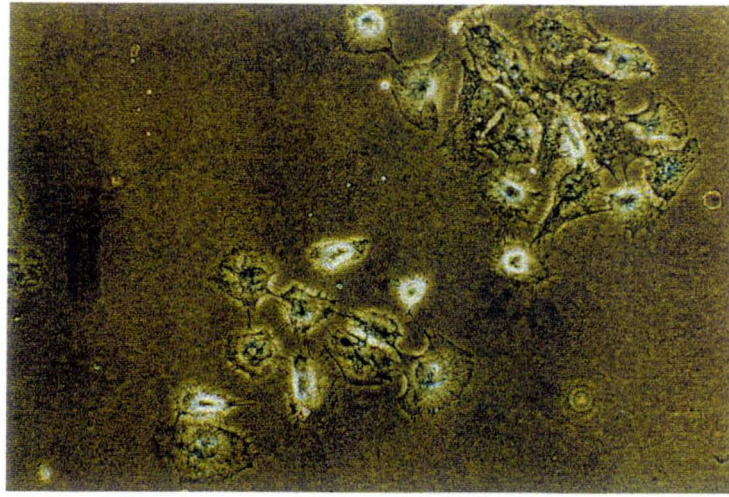


Figure 25a

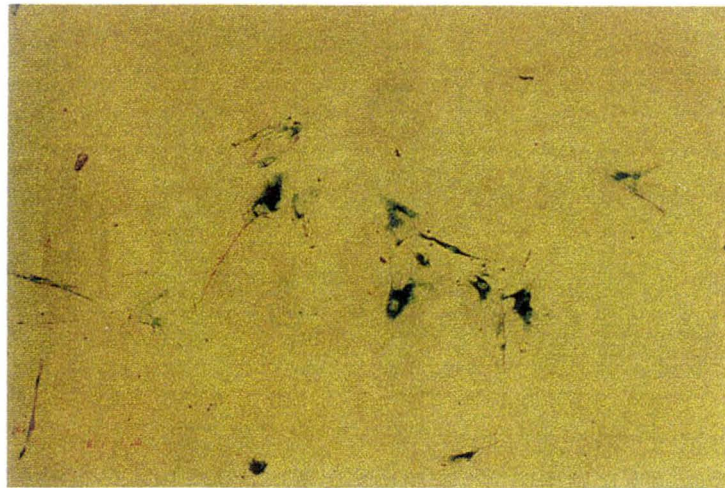


Figure 25b

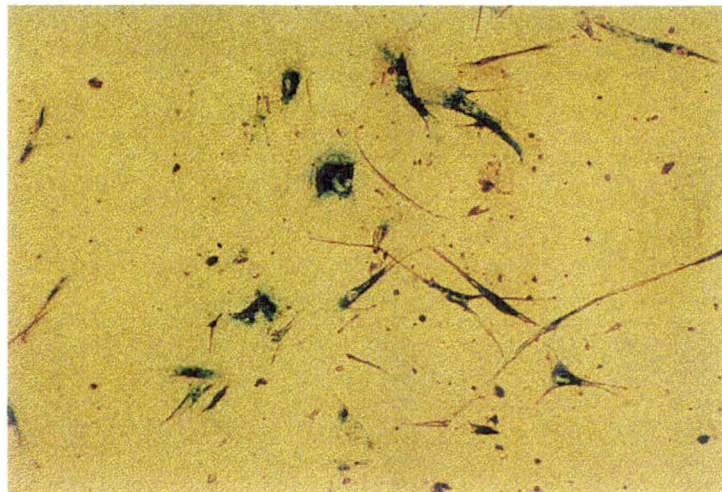


Figure 25c

Figure 25: absence d'activité β -gal dans des cultures de fibroblastes WI-38 transformés par SV-40 (25a ; grossissement 400X) et présence de cette activité dans des cultures de fibroblastes WI-38 normaux vieillis normalement (PD45) (25c ; grossissement 160X) ou ayant subi un vieillissement accéléré sous l'effet de stress successifs au t-BHP (25b ; grossissement 160X).

Pour la suite des expériences, la méthode retenue prévoyait, donc, 5 stress successifs au t-BHP appliqués pendant 1 h à des concentrations définies comme suit : du t-BHP est dilué dans du BME additionné de 10 % de sérum, en vue d'obtenir une concentration finale de 100 μ M, et deux stress sont espacés de 48 h. Ces conditions de stress, comme nous venons de le décrire, évitent les effets de mortalité cellulaire tout en assurant un vieillissement accéléré important des cultures de fibroblastes WI-38.

Pour mieux apprécier l'ampleur de cette sénescence induite, nous avons fait une étude comparative de l'évolution des cultures jeunes non stressées, jeunes ayant subi des stress successifs et des cultures vieilles en l'absence de stress. Au delà du comptage des morphotypes, nous avons cherché à détecter le pourcentage des cellules présentant, à pH 6, une activité de la β -galactosidase, un biomarqueur spécifique des cellules sénescents (S-A- β -gal), ainsi qu'estimer la synthèse cellulaire de l'ADN par la mesure d'incorporation de la thymidine tritiée.

3. Détection de l'activité S-A- β -gal

L'utilisation, dans la solution de coloration, de X-gal, un analogue du lactose, nous a permis de mettre en évidence une activité β -galactosidase associée à la sénescence cellulaire. Appliquée à une culture de fibroblaste WI-38, la coloration est d'autant plus vive que l'âge de la culture est avancée. En effet, le comptage des morphotypes à différents passages en culture montre que les proportions de cellules colorées et donc, S-A- β -gal positive, sont abondantes aux passages en culture 42 et 45.

Ainsi, comme le montre la figure 20, dans les cultures de cellules vieilles (passage en culture 42), 44,7 % des cellules de la culture expriment l'activité β -gal. Les MF I n'expriment pas cette activité alors que 20 % des MF II (figure 21a), 61 % des MF III (figure 21b), 75 % des PMF IV (figure 21c) et plus de 90 % des PMF V (figure 21d) et des PMF VI (figure 21e) sont β -gal positifs. La figure 22 qui reprend les données des cellules jeunes ne recèle qu'une faible proportion inférieure à 3 % de MF II exprimant l'activité β -gal, alors que des PMF IV et V l'expriment bel et bien à plus de 80 % . En ce qui concerne les cellules ayant subi 5 stress successifs au t-BHP (100 μ M) toutes les 48 h, on note généralement au sein du MF IV une augmentation du pourcentage des cellules montrant une activité β -gal que l'on retrouve également dans les cellules ayant subi un

vieillesse normale par rapport aux cellules jeunes (figure 23). D'après ces résultats des dommages peuvent s'accumuler dans les MF II, comme par exemple l'apparition précoce de l'activité S-A- β -gal, avant qu'ils ne passent aux morphotypes suivants. C'est peut-être l'accumulation de ces dommages qui sera responsable du passage aux morphotypes ultérieurs. Les figures 20, 22 et 23 nous montrent les proportions de cellules β -gal positives à l'intérieur de chaque morphotype dans les cultures cellulaires considérées.

Vue sous un autre angle, l'analyse reste d'aplomb. Le tableau de la figure 24 qui reprend les données des cultures cellulaires à différents passages en culture et dans diverses conditions, ainsi que les photographies de la figure 25, nous mettent sous les yeux un parallélisme entre l'accomplissement du pouvoir prolifératif et l'expression de l'activité β -gal. On remarque en effet que les cellules sénescents (passage en culture 45) qui ne se divisent plus, c'est-à-dire qui ont épuisé 100 % de leur potentiel de prolifération, constituent une culture dont les cellules sont à plus de 80 % β -gal positives (figure 25c). Au passage en culture 28, par contre, la culture a déjà accompli 62 % de son potentiel de prolifération mais ne contient qu'à peine 12 % de cellules β -gal positives. Plus intéressant encore, les cultures au passage 28 mais ayant subi des stress successifs affichent des proportions de cellules β -gal positives (55,2 %) supérieures aux 44,7 % des cultures vieilles ayant accompli 93 % de leur potentiel prolifératif (passage en culture 42) (figure 25b). Les cultures de fibroblastes WI-38 transformées par l'antigène T de SV 40, et donc qui recèlent un potentiel de prolifération continu présente moins de 1 % de cellules β -gal positives (figure 25a). Ce pourcentage correspondant aux cellules qui ont été décrochées du cycle cellulaire et qui sont devenues sénescents.

Ces diverses données reprises par différentes figures nous mettent devant une évidence flagrante. D'une part, il s'avère que l'activité β -gal est spécifique aux cellules sénescents et aux cellules ayant subi des stress successifs, et d'autre part, cette activité est une confirmation de l'apparition dans une culture des cellules, de la séquence des 7 morphotypes cellulaires décrite pour les fibroblastes WI-38 (Bayreuther et al., 1988), et qui constitue bien donc une gradation progressive vers des cellules plus âgées.

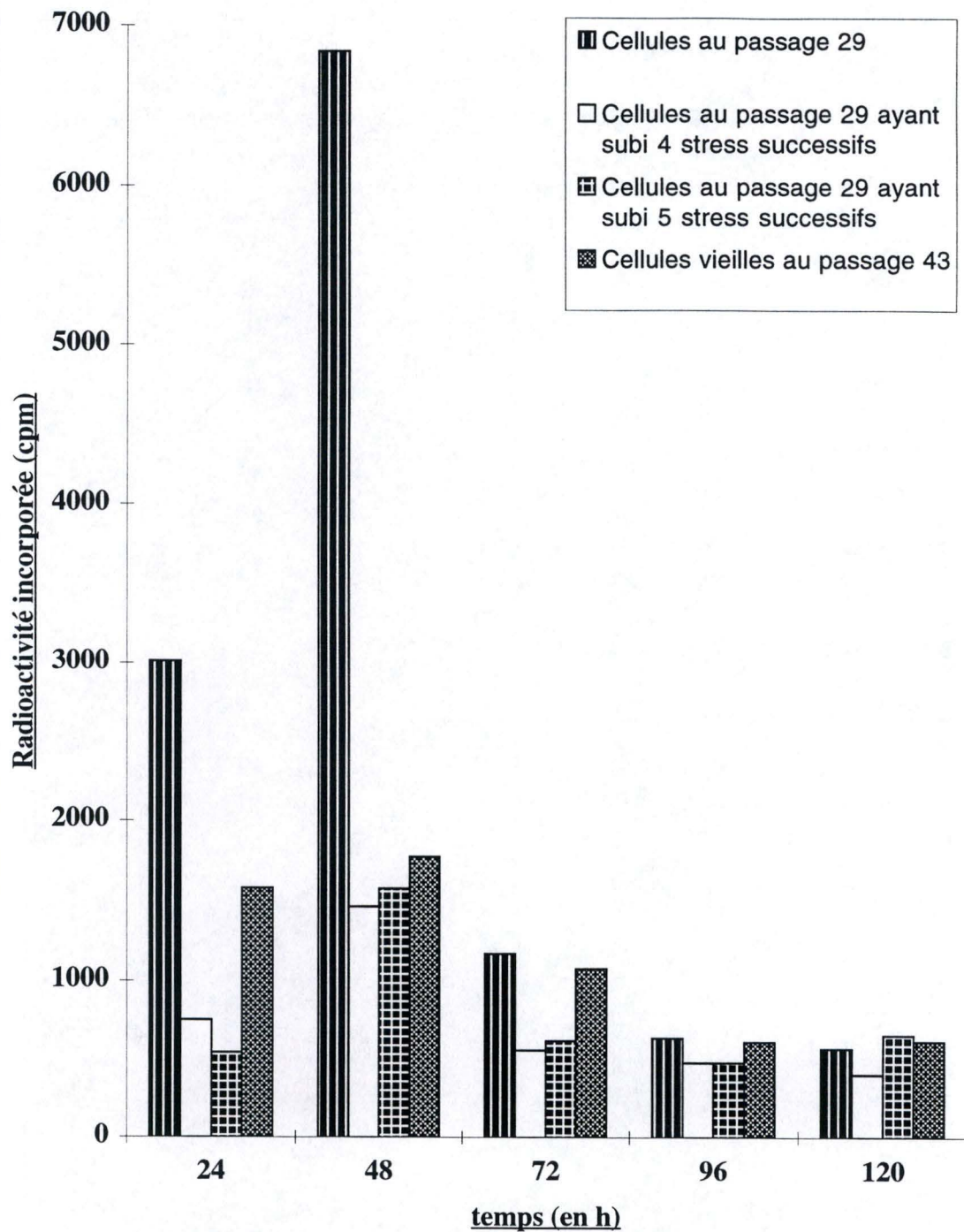


Figure 26. Incorporation de la thymidine tritiée dans des fibroblastes WI-38 jeunes, vieux et successivement stressés au t-BHP (100 μ M) après stimulation au sérum bovin. Des cellules stressées sont soumises à 5 stress successifs avec du t-BHP (100 μ M) dilué dans du BME + 10 % de sérum. Les cultures jeunes et vieilles sont incubées 5 fois dans du BME + 10 % de sérum. 48 h après le 5^{ème} stress, les cellules sont repiquées sans des boîtes multi-puits à une densité de 20.000 cellules /ml. Les cellules sont incubées toutes les 24 h et pendant 24 h avec de la thymidine tritiée.

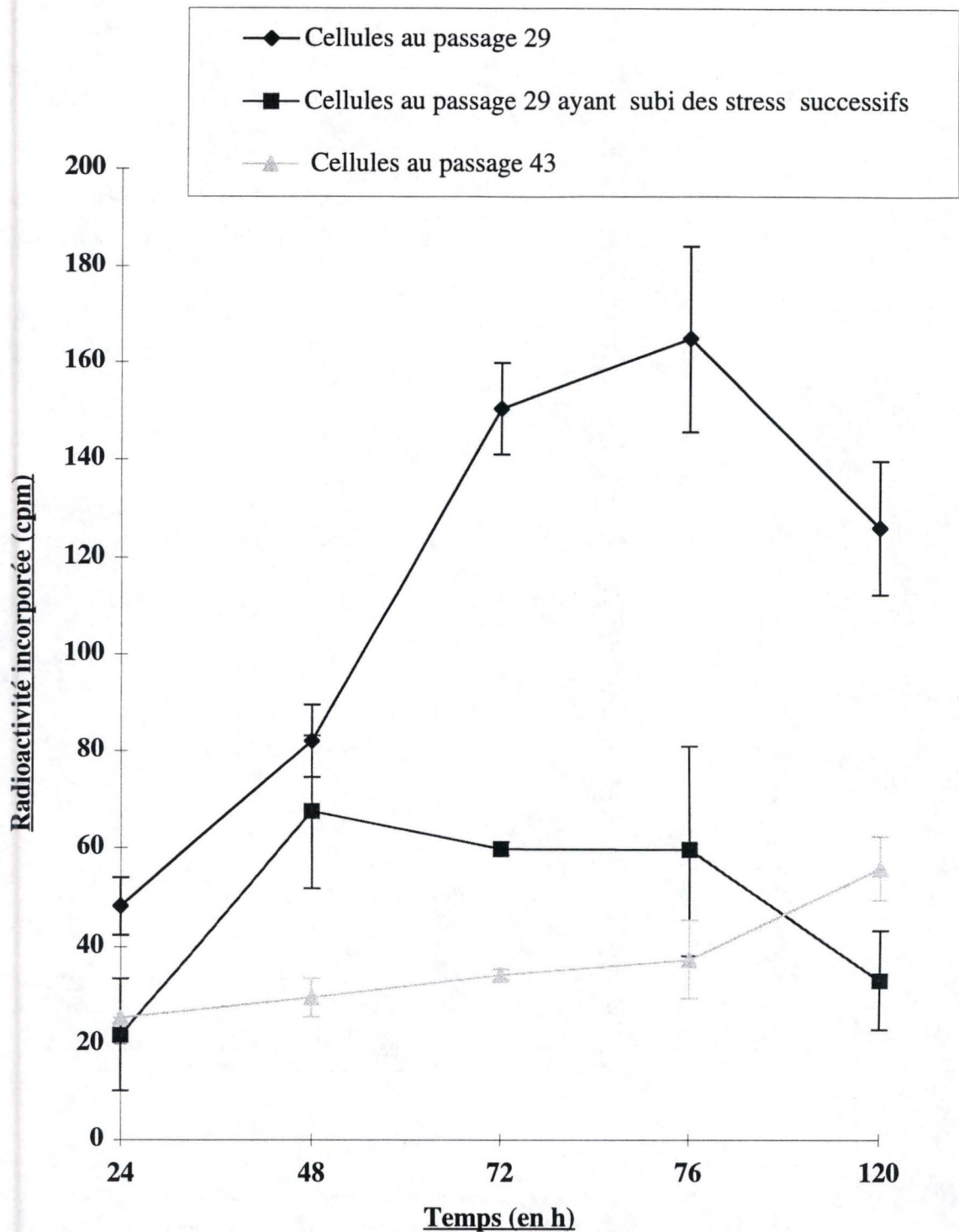


Figure 27. Incorporation de la thymidine tritiée dans des fibroblastes WI-38 jeunes, vieux et successivement stressés au t-BHP (100 μ M) après stimulation au sérum bovin. Des cellules stressées sont soumises à 5 stress successifs avec du t-BHP (100 μ M) dilué dans du BME + 10 % de sérum. Les cultures jeunes et vieilles sont incubées 5 fois dans du BME + 10 % de sérum. 48 h après le 5ème stress, les cellules sont repiquées sans des boîtes multi-puits à une densité de 20.000 cellules /ml. Les cellules sont incubées toutes les 24 h et pendant 3 h avec de la thymidine tritiée.

4. Mesure de la synthèse d'ADN par l'incorporation de thymidine tritiée

L'incorporation de thymidine tritiée est un test courant pour estimer la prolifération cellulaire. En incubant les cellules avec de la thymidine tritiée, celle-ci est incorporée dans l'ADN des cellules qui se divisent. Par contre, les cellules sénescents qui, par définition, ne réalisent plus de synthèse d'ADN, n'incorporent pas la thymidine tritiée diluée dans le milieu de culture.

Ce test de prolifération a été réalisé selon deux modalités différant dans la durée du temps d'incubation. D'une part, des cultures cellulaires, repiquées la veille dans des boîtes de culture multipuits, étaient incubées avec de la thymidine tritiée pendant 24h après 1, 2, 3, ... jours de culture (figure 26). Et d'autre part, le temps d'incubation était réduit à 3 h, après 1, 2, 3, ... jours en culture (figure 27). Lorsue l'on incube les cellules pendant 24 h avec de la thymidine tritiée, les résultats obtenus démontrent que les cellules contrôle, qui sont encore prolifératives, incorporent 24 h après le repiquage, 2 fois plus de thymidine tritiée (3011 cpm) que les cellules vieillies normalement (1578 cpm), 4 fois plus que les cellules ayant subi 4 stress successifs (750 cpm) et presque 6 fois plus que les cellules ayant subi 5 stress successifs (540 cpm) (figure 26). Au cours du temps, dans une même culture, la quantité de thymidine tritiée incorporée diminue, aussi bien pour les cellules contrôles que pour les cellules vieillies normalement ou sous stress. L'incubation des cellules pendant une durée de 3h avec de la thymidine tritiée, dénote aussi les mêmes conclusions. De par la quantité de cpm affichée (48,14 cpm), les cellules jeunes non stressées présentent, 24 h après le repiquage, une activité redoublée de synthèse par rapport aux cellules sénescents au passage 43 (25,33 cpm) et aux cellules jeunes ayant été successivement stressées (21,8 cpm), (figure 27).

On remarquera, en outre, que les courbes d'évolution de la synthèse d'ADN dans les cultures cellulaires vieilles et stressées dénotent bien une sénescence établie. En effet, les courbes des cultures jeunes non stressées indiquent une prolifération continue jusqu'à ce que, à confluence dans le puits, la synthèse la synthèse d'ADN décline. Par contre, les courbes correspondant aux cultures vieilles et celles soumises à des stress successifs restent stationnaires (figure 26 et 27).

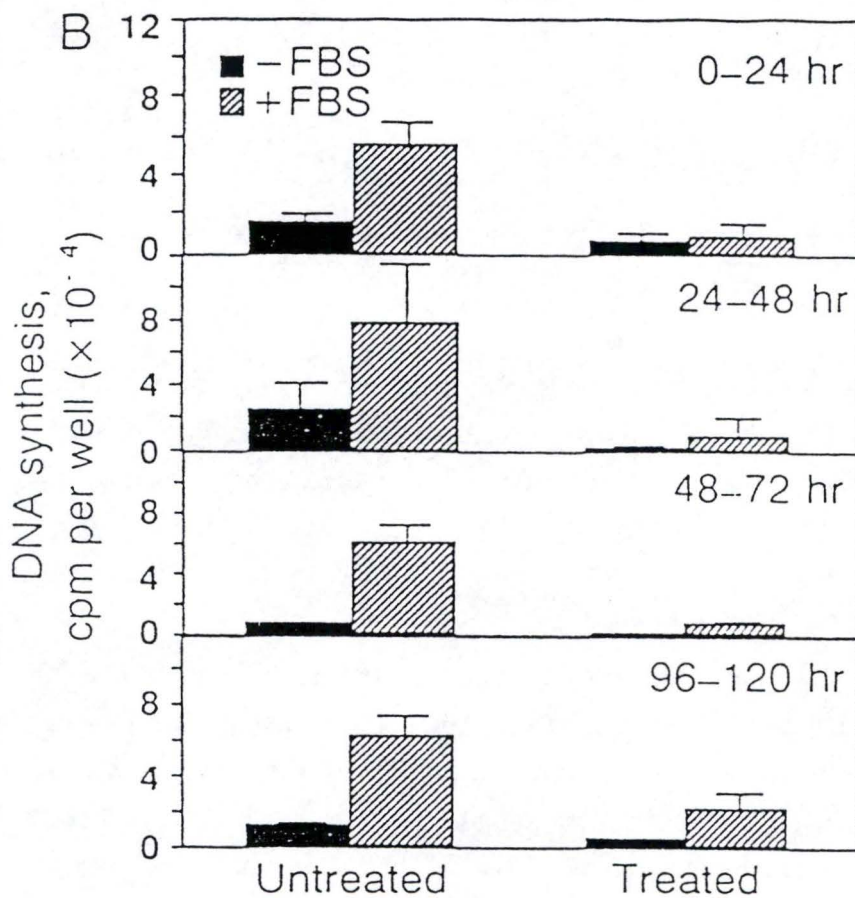


Figure 29. Capacité des fibroblastes F 65 stressés au H_2O_2 ($200 \mu M$) à incorporer la thymidine tritiée dans l'ADN après stimulation avec des facteurs de croissance ou du sérum.

Untreated : cellules contrôles

Treated : cellules stressées au H_2O_2

- FBS : sans stimulation au sérum foetal bovin

+ FBS après stimulation au sérum foetal bovin

(d'après Chen et Ames, 1994).

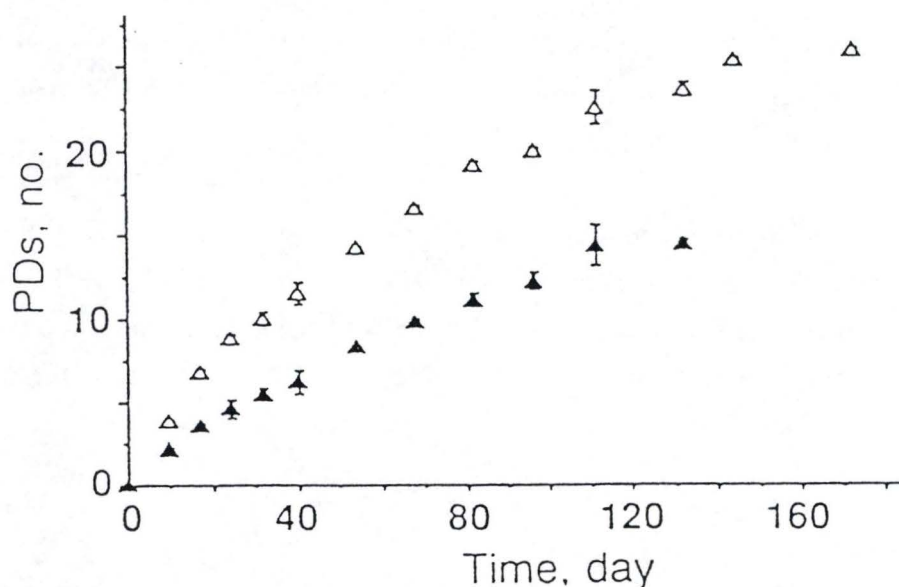


Figure 28. Courbes de croissance des fibroblastes F 65 ayant subi un stress au H_2O_2 ($200 \mu M$) ou cultivées en l'absence de stress. Les populations stressées accomplissent un nombre réduit de doublement de population par rapport aux cultures contrôles. PDs n°= nombre de doublement de population (d'après Chen et Ames, 1994).

D'autres études ont abouti à des résultats similaires. Ainsi, Chen et Ames (1994) démontrent que les stress au peroxyde d'hydrogène induisent la sénescence chez la souche de cellules diploïdes F 65. La plupart des cellules traitées avec une concentration de H_2O_2 inférieure à 300 μM ne semblent pas affectées en terme de viabilité cellulaire. Mais si l'on s'inscrit dans la durée, le traitement des mêmes cellules avec 200 μM de H_2O_2 inhibe, 2 h après le stress, la réponse cellulaire au sérum ou au PDGF (Platelet Derived Growth Factor) et, 4 jours après, on observe que cette inhibition est irréversible. La figure 28 montre que le traitement des cellules au peroxyde d'hydrogène induit la sénescence en limitant les niveaux de doublement de population des cellules F65. Les mêmes auteurs ont aussi montré que les cellules dans ces conditions de stress, incorporent moins de thymidine tritiée que les cellules n'ayant pas subi de stress (figure 29).

Von Zglinicki et al. (1995) montrent enfin, l'apparition d'une sénescence induite dans des cultures de fibroblastes WI-38 soumises à une hyperoxie (atmosphère contenant 40 % d'oxygène), alors que les mêmes cellules cultivées sous des atmosphères pauvres en oxygène (2 % par exemple) voient leur durée de vie proliférative significativement prolongée.

En conclusion, divers travaux suggèrent fortement, à l'heure actuelle, que des cultures de fibroblastes soumises à des stress radicalaires perdent au bout de quelques jours et de manière irréversible toute capacité de synthèse d'ADN et donc de prolifération. Cet état de sénescence induite s'accompagne d'une modification de la morphologie des cellules : les cellules sous stress acquièrent une morphologie typique de cellules âgées, de la même manière que nous l'avons observé à travers le modèle des morphotypes cellulaires.

5. Détection de pRb et p21 par "western-blotting"

Les inhibiteurs de croissance sur lesquels nous avons focalisé notre étude n'apparaissent qu'à certains moments du cycle et à des niveaux différents de phosphorylation. Ainsi, p21 est surexprimé en phase quiescente alors que pRb est omniprésent dans le cycle mais diversement phosphorylé. Cette protéine du rétinoblastome (pRb) est constitutivement sous-phosphorylé en phase quiescente et hyperphosphorylé en phase S.

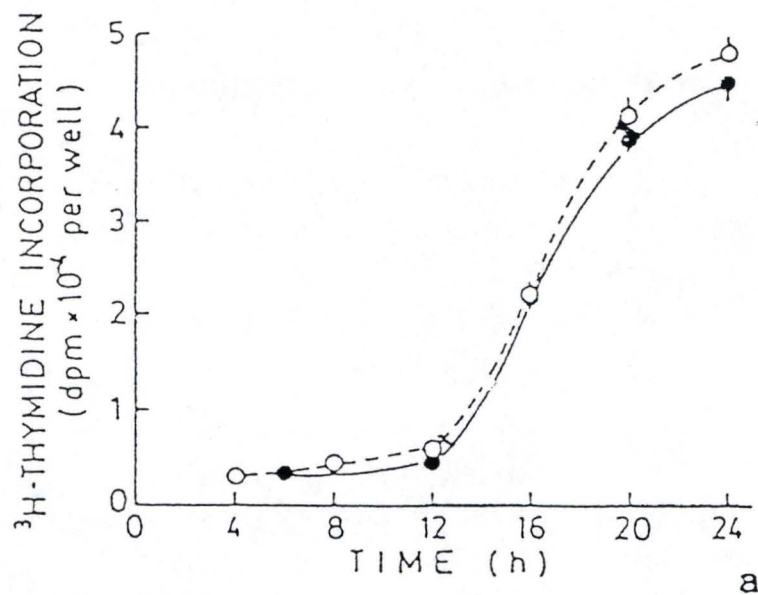


Figure 30. Effet du temps sur l'incorporation de thymidine tritiée dans des fibroblastes IMR-90 (cercles ouverts) et des fibroblastes WI-38 (cercles noirs). Stimulés par du sérum, on observe un temps d'induction optimal de la réponse cellulaire entre la 16 h et la 20 h (d'après Takuwa et al., 1993).

De manière à obtenir un maximum de cellules tantôt en quiescence, tantôt en pleine phase proliférative, une double démarche était requise : d'une part, priver les cellules d'apport nutritif pendant 48 h et d'autre part, restimuler une partie des cellules pendant 20 h avec du sérum bovin foetal. La privation permettant de ramener les cellules en phase G0, et la stimulation permettant d'obtenir, entre la 16ème et la 21ème heure selon le type de cellule, une réponse cellulaire optimale de prolifération (Takuwa et al., 1993). Au cours de la privation et de la stimulation, le respect des temps impartis est de rigueur. Comme le démontrent Takuwa et al. (1993), si la stimulation perdure au delà de la 21ème heure, la prolifération décline (figure 30). Ce déclin proviendrait du fait que des phosphatases non encore déterminées viendraient déphosphoryler pRb (Chen et al., 1989). Cette action enzymatique permettant à pRb de pouvoir se lier de nouveau aux facteurs de transcription E2F, prévenant, sa liaison aux éléments *cis* des groupes des gènes responsables de la synthèse de la machinerie impliquée dans la réplication. A ce moment, les cellules quittent la phase S et entrent dans la phase G2 (figure 11).

5.1. L'extraction

Deux types de tampons de lyse ont été essayés. Le premier tiré du protocole du laboratoire de J. Campisi du Lawrence Berkeley Laboratory (Californie, USA) est moins riche en inhibiteurs de protéases et phosphatases tandis que le second tiré du protocole présente une composition du tampon riche en anti-protéases et anti-phosphatases. En tenant compte de la nature des protéines recherchées, nous avons privilégié la présence d'inhibiteurs de protéases telles que l'aprotinine et la leupeptine ainsi que d'inhibiteurs des phosphatases.

5.2. Electrophorèse sur gel dénaturant

La SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) est une technique courante de séparation des protéines. Sa sensibilité est une fonction de la concentration de polyacrylamide qui détermine la taille des mailles du réseau tridimensionnel constitué par le gel. Cette concentration est ajustée suivant le poids moléculaire des protéines à séparer. Un gel plus concentré (12 %) servira à séparer les protéines de faible poids moléculaire comme

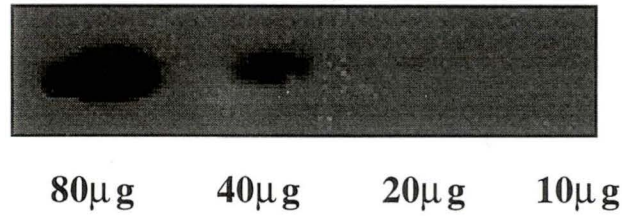


Figure 31a.

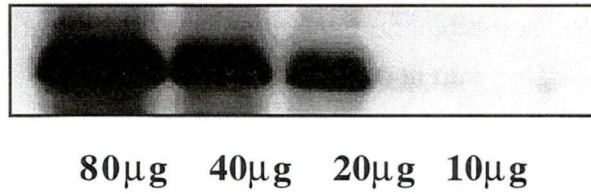


Figure 31b.

Figure 31. Détection par anticorps de p21 (figure 31a) et pRb (figure 31b).
Différentes quantités de protéines (De gauche à droite: 80 μg, 40 μg, 20 μg, 10 μg) ont été déposées dans les puits du gel afin de réaliser une estimation de la sensibilité de la méthode.

p21 (21 Kda), et le gel moins concentré (7,5 %) sera utilisé à la séparation des protéines de haut poids moléculaire, comme pRb (110 Kda).

Les quantités chargées dans les puits doivent être les mêmes pour permettre une migration homogène. Aussi, une mise au point s'imposait-elle. Comme le montre la figure 31, des quatre chargements réalisés (10 µg, 20 µg, 40 µg et 80 µg), les spots ne sont visibles qu'à partir d'un chargement de 20 µg pour pRb (figure 31b) et de 40 µg pour p21 (figure 31a). Dans les expériences réalisées, 30 µg de protéines par puits ont été chargés.

Différents échantillons des extraits des cellules jeunes non stressées, des cellules jeunes ayant subi des stress successifs ainsi que des cellules vieillies normalement ont été chargés en vue de détecter l'expression de p21, pRb. A chaque fois, deux cas de figure sont pris en compte : le cas des cellules stimulées pendant 20 h et celles qui ont été privées pendant 48 h.

5.3. "l'immunoblotting"

5.3.1. Mise au point

Après le transfert des protéines sur une membrane nitrocellulose effectué durant la nuit, la coloration au rougeponceau et l'apparition des pistes nettes révèle que le transfert s'est bien déroulé. Le résultat des opérations qui s'ensuivent sont fonction de la délicatesse avec laquelle la membrane est traitée. Celle-ci est saturée à l'aide d'une solution de lait écrémé lyophilisé dont nous avons essayé plusieurs concentrations : 0,3 %; 0,5 %; 2 % et 5 %. Nous nous sommes tenus à la concentration de 5 % qui donnait un meilleur résultat et qui est communément utilisé par le laboratoire de Campisi.

Des conditions de saturation de la membrane dépendent, en effet, la fixation des anticorps primaires monoclonaux aux protéines recherchées et la reconnaissance des anticorps primaires par les anticorps secondaires polyclonaux. Dans le but de toujours favoriser cette reconnaissance les conditions de lavage de la membrane décrites dans le kit d'Amersham ont été modifiées (cfr. matériels et méthodes).

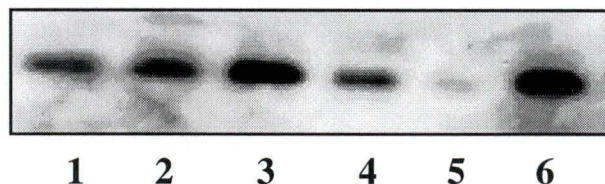


Figure 32. Détection de p21 dans des cultures de fibroblastes WI-38:

- 1: cellules âgées privées de sérum pendant 48 heures.
- 2: cellules âgées stimulées pendant 20 h dans du BME+10% de sérum.
- 3: cellules jeunes ayant subi 5 stress successifs au moyen de t-BHP et privées de sérum pendant 48 heures.
- 4: cellules jeunes ayant subi 5 stress successifs au moyen de t-BHP et stimulées pendant 20 h dans du BME+10% de sérum.
- 5: cellules jeunes stimulées pendant 20 h dans du BME+10% de sérum.
- 6: cellules jeunes privées de sérum pendant 48 heures.

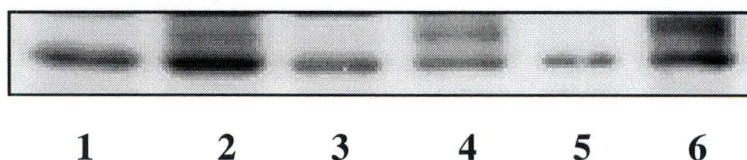


Figure 33. Détection de pRb dans des cultures de fibroblastes WI-38:

- 1: cellules âgées privées de sérum pendant 48 heures.
- 2: cellules âgées stimulées pendant 20 h dans du BME+10% de sérum.
- 3: cellules jeunes ayant subi 5 stress successifs au moyen de t-BHP et privées de sérum pendant 48 heures.
- 4: cellules jeunes ayant subi 5 stress successifs au moyen de t-BHP et stimulées pendant 20 h dans du BME+10% de sérum.
- 5: cellules jeunes privées de sérum pendant 48 heures.
- 6: cellules jeunes stimulées pendant 20 h dans du BME+10% de sérum.

	Cellules stressées quiescentes	Cellules stressées stimulées	cellules âgées quiescentes	cellules âgées stimulées	cellules jeunes quiescentes	cellules jeunes stimulées
pRB hyperphosphorylé (en I.O.D)		0,550		0,468		4,09
pRB hypophosphorylé (en I.O.D)	1,173	2,219	0,753	0,711	0,782	2,57
Ratio		0,25		0,66		1,59

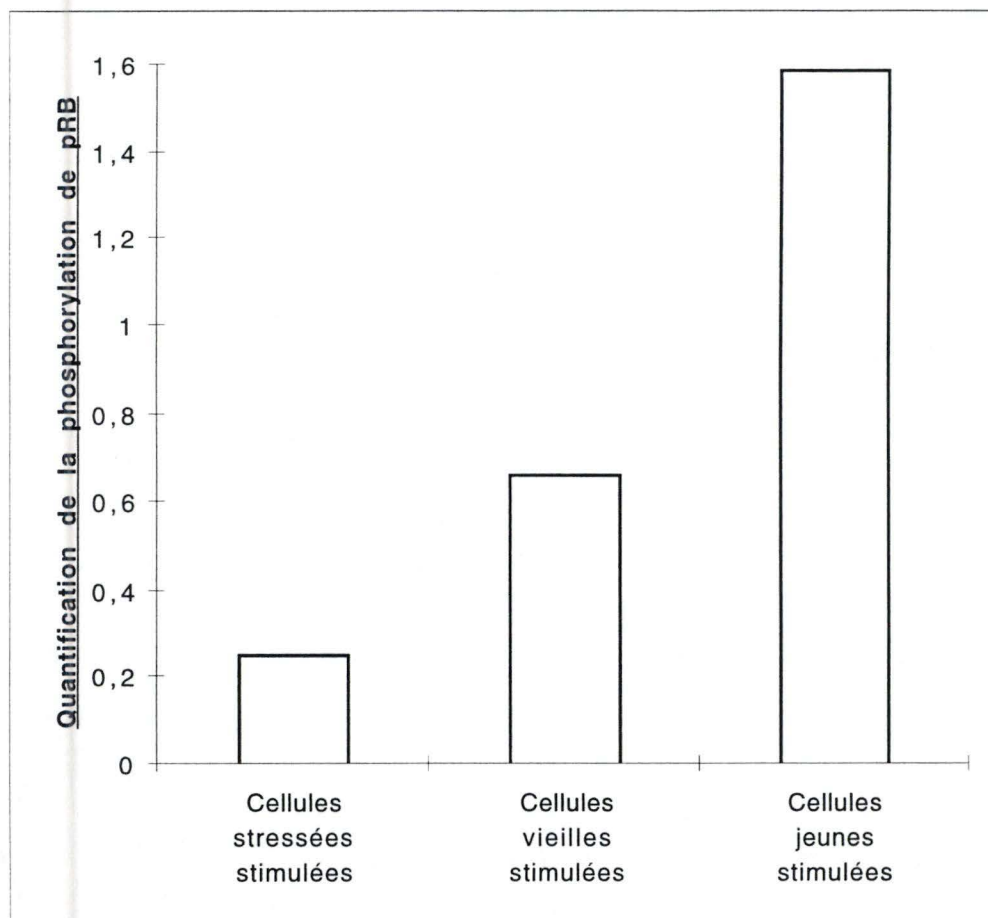


Figure 34 : données montrant les rapports de phosphorylation des cellules sénescents, stressées et non stressées.

5.3.2. Résultats

Les révélations des autoradiographies effectuées montrent, à la figure 31, des résultats probants pour p21 (figure 31a) et pRb (figure 31b). Sur les autoradiographies présentées sur les figures 32 et 33, on peut se rendre compte de l'expression différentielle de p21 (figure 32) et la phosphorylation différentielle de pRb (figure 33). Ainsi, toutes les cellules stimulées qu'elles soient vieilles, jeunes ou ayant subi des stress successifs, expriment-elles des bandes correspondant aux diverses formes de phosphorylation de pRb. Les données que recèle le tableau de la figure 34 présentent les quantifications par densitométrie des bandes de gel marquées par l'anticorps reconnaissant pRb ainsi que les rapports exprimant le niveau de phosphorylation chez toutes les cellules stimulées. En effet, comme on peut le remarquer sur le graphique de la même figure, le niveau de phosphorylation des cellules jeunes en réponse à la stimulation sérique est 2 fois plus élevés dans les cellules vieilles et 6 fois plus élevé que les cellules ayant été stressées. Par contre, les cellules qui ont été privées n'affichent qu'une bande correspondante à la forme non phosphorylée de pRb.

La présence de plusieurs formes de phosphorylation sur SDS-PAGE suggère qu'il existe plusieurs sites de phosphorylation. Ludlow et al. (1989) stipulent de fait que pRB peut présenter plus d'une dizaine de sites de phosphorylation sur ses sérines et ses thréonines. Les expériences de Chen et al. (1989) ont, par ailleurs, montré que les formes phosphorylées de pRB n'avaient qu'un temps de demi-vie limitée (30 à 35 minutes) alors que celui de la forme non phosphorylée de pRB est de 4 à 6h. Cependant, la fréquence de phosphorylation des différents sites n'est pas encore bien élucidée.

Dans le cas de p21, l'autoradiographie présentée sur la figure 32 révèlent que cette protéine est surexprimée chez les cellules non stimulées vieillies normalement ou ayant été successivement stressées. Chez les cellules jeunes, par contre, p21 n'apparaît que chez les cellules qui ont été privées de sérum pendant 48h, et donc en quiescence (figure 32). Il est intéressant de noter, enfin, que cette protéine n'apparaît point dans les cellules stimulées, qu'elles soient vieilles ou qu'elles aient été stimulées.

Ces résultats font bien écho à ceux des équipes de Campisi, Chen et Ames qui montrent, de leur côté, une surexpression de p21 et une hypophosphorylation constitutive de pRb dans les cellules en processus de vieillissement.

Conclusion et perspectives.

Depuis les études pionnières de Hayflick et Moorehead (1961) qui établissent la limite du potentiel prolifératif des cellules d'eucaryotes, plusieurs travaux confirment aujourd'hui que le vieillissement est intrinsèque à la vie cellulaire. Ce phénomène, loin d'être un artéfact de la vie se révèle être un processus à gradations successives par lequel les cellules amorcent de façon irréversible leur arrêt de croissance et entament leur dégénérescence. Nous avons établi que la théorisation cellulaire ou moléculaire d'un processus aussi complexe devait s'inscrire dans une approche globale, tel que le modèle thermodynamique des systèmes ouverts qui permet de penser les divers événements intervenant au niveau cellulaire et épicyllulaire comme des fluctuations susceptibles d'imprimer dans la cellule un avenir imprévisible.

Ainsi, le modèle des morphotypes qui met en évidence l'apparition continue des différents morphotypes tel que décrits par Bayreuther (1988) dans diverses sous culture de différentes souches cellulaires (WI-38, F65,...), serait en plein accord avec les prévisions du modèle thermodynamique.

Notre étude s'est évertuée à montrer que des stress successifs au tert-butylhydroperoxyde (t-BHP) sur des cultures à grande échelle de fibroblastes de poumons humains WI-38 accélèrent leur vieillissement. Le comptage des proportions de morphotypes a révélé une nette similarité entre les pourcentages en morphotypes des cellules ayant subi des stress successifs et ceux des cellules vieillies normalement. Ces résultats obtenus à partir des des morphotypes ont été confirmés par le test de prolifération évaluant l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN et la détection de l'activité S-A- β -gal à pH 6.

Il ressort ainsi de ces résultats que lorsqu'on administre des stress subléthaux successifs à des fibroblastes issus de cultures à un faible nombre de passage en culture, on obtient une population de cellules dont un très grand nombre connaissent un arrêt irréversible de leur prolifération. Nous pouvons, dès lors affirmer que les cellules ayant été successivement stressées et celles ayant subi un vieillissement normal sont similaires. Nous obtenons, en effet, des cellules qui n'incorporent plus la thymidine et qui sont des morphotypes âgés.

Notre étude basée surtout sur les effets à long terme des stress successifs, par exemple l'arrêt des mitoses, diffère bien entendu des études sur les effets à court terme d'un stress, à savoir, par exemple, un arrêt momentané des mitoses.

Au niveau de l'activité β -galactosidase à pH 6, associée au vieillissement cellulaire (S-A-gal), nous obtenons aussi un parallélisme frappant entre les cellules vieilles normalement et celles dont le vieillissement a été accéléré par des stress successifs. À ce niveau, une question se pose. La S-A- β -gal a-t-elle un rapport avec l'arrêt irréversible de la croissance cellulaire ou est-elle un genre de marqueur de l'accumulation des dommages intracellulaires qui dénote une perte d'enzymes β -galactosidase à partir des lysosomes ? Ou bien dénoterait-elle une diminution des capacités cellulaires dont la production d'énergie par unité de temps qui fait qu'une partie de l'enzyme n'arrive plus aux lysosomes ? Si toutes ces interrogations sont encore loin d'être élucidées, il reste que l'activité β -galactosidase est présente aussi bien dans les cellules vieilles normalement que dans les cellules ayant été successivement stressées. Néanmoins, la cause de cette activité β -gal pourrait être différente selon que les cellules sont vieilles ou ont été successivement stressées.

Si les cellules vieilles ou ayant subi des stress successifs connaissent un arrêt irréversible de leur prolifération, les mécanismes conduisant à cet arrêt irréversible, sont-ils semblables ou diamétralement opposés ?

Pour approcher cette question, nous avons voulu comparer les mécanismes moléculaires conduisant à cet arrêt irréversible de croissance. Deux des mécanismes connus pour arrêter la prolifération lors de la sénescence cellulaire sont, d'une part la surexpression de p21, et d'autre part, la diminution du niveau de phosphorylation de pRb.

Nous avons mis en évidence, à l'instar des équipes de Campisi, Chen et Ames, une hypophosphorylation constitutive de pRb dans les cellules vieilles, dans les cellules jeunes ayant subi des stress successifs et dans les cellules jeunes en quiescence. En mettant en évidence les niveaux de phosphorylation de pRb, nous avons aussi montré que, les diverses formes de phosphorylation de pRb étaient fonction de l'âge des cultures cellulaires. Les cellules jeunes non stressées présentant plus de formes phosphorylées de pRb que les cellules vieilles ou ayant subi des stress successifs. Par ailleurs, la surexpression de p21 par les cellules vieilles, stressées et non stressées ainsi que des cellules jeunes ayant été privées pendant 48h, est une évidence.

Mais alors, les causes de phosphorylation de pRb sont-elles semblables dans le vieillissement normal et dans le vieillissement accéléré par des stress successifs ? Plusieurs pistes de recherches peuvent être envisagées. Lors de la transition G1/S, bloquée dans les cellules sénescents, on sait que les cyclines D (D1, D2 et D3) formant des com-

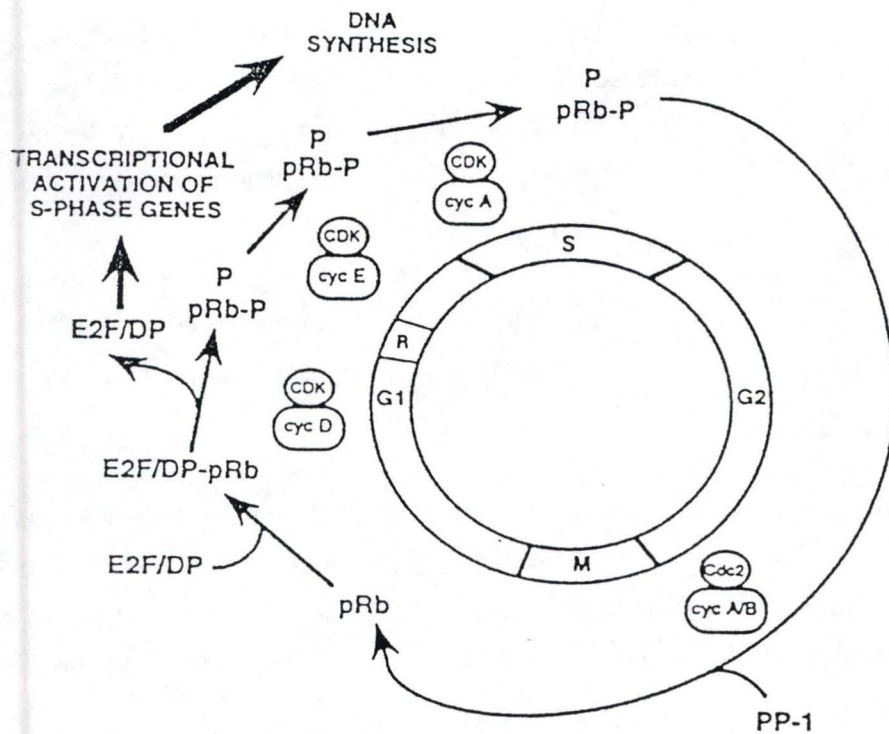


Figure 35. Représentation schématique des complexes cyclines cdk's qui régulent le déroulement du cycle cellulaire. Le schéma montre également l'intervention de pRb dans le cycle cellulaire et son interaction avec les facteurs de transcription E2F. E2F représente les facteurs de transcription E2F-1, E2F-2 et E2F-3, DP représente DP-1 ou DP-2, qui sont des protéines ayant la capacité de former des hétérodimères avec les membres de la famille E2F. PP-1 est la phosphoprotéine phosphatase de type 1 qui lie pRb et participe très probablement à sa déphosphorylation. La libération du complexe E2F/DP est le résultat de la phosphorylation (P) de pRb. Cet événement a pour conséquence l'activation de la transcription de gènes essentiels de la phase S du cycle cellulaire.

plexes avec des cyclin dependent kinases (kinases dépendantes des kinases) cdk 4 ou cdk6, sont les agents responsables de la phosphorylation de pRb. On sait aussi que p16 est capable de réguler l'activité de ces complexes en inhibant l'activité cdk4 et cdk6. En outre, les cyclines E et A peuvent aussi phosphoryler pRb en s'associant à cdk2 (Taya, 1997) (figure 35, d'après Grana et al., 1995). Qu'en est-il dans le cas des cellules ayant subi des stress successifs ? Comment les rôles respectifs des niveaux d'expression, de phosphorylation, ou/et d'activité de ces kinases et de ces cyclines s'agencent-ils ?

Concernant p21, cette protéine appartient à une famille d'inhibiteurs de kinases dépendantes de cyclines comptant p21, p27 et p57. Ces protéines partagent une région amino-terminale conservée qui est importante dans l'interaction avec les complexes cyclines-cdk's et leurs inhibitions. Cette famille d'inhibiteur est capable d'inhiber tous les complexes cycline-cdk's liés à la phase G1 du cycle cellulaire. D'autre part, la région carboxy-terminale de p21 lui confère une activité inhibitrice sur la réplication de l'ADN car elle lui permet de former un complexe stable avec un facteur protéique lié à l'activité de l'ADN polymérase δ (DNA polymérase δ progressivity factor). p21 est induite notamment par les dommages de l'ADN, et par une activation transcriptionnelle directement déclenchée par p53 (pour une revue Lees, 1995). On peut se demander si les mécanismes conduisant à la surexpression de p21 sont semblables sur les cellules âgées ou les cellules jeunes ayant subi des stress successifs. Ces cellules ont-elles en commun un niveau élevé de dommage de l'ADN ? Ces dommages conduisent-ils à l'activation de kinases liées aux dommages de l'ADN ? Les kinases de réponses au stress (dont les stress-activated kinases appelés aussi Jun-kinases (exemple : p54), qui font partie de la famille des Map-kinases (mitogen-activated protein kinases) sont-elles activées dans les cellules ayant subi des stress successifs, et en amont, les Jun-kinase kinases (JKK) et les Jun-kinase kinase kinases (JKKK), etc,

Si notre étude semble cerner de près la problématique du vieillissement des cellules, l'ampleur de la tâche n'est qu'à peine effleurée. En effet, si le vieillissement est immédiatement observable dans les cultures ayant subi des stress successifs, les connaissances dont on dispose de l'approche moléculaire du phénomène sont encore diffuses. La complexité des interactions générées par des événements intra- et épi-cellulaires est loin d'être démêlée. L'effet pléiotrope des molécules protéiques ou géniques aujourd'hui découvertes ne simplifie guère la tâche. Le champ d'investigation de la gérontologie moléculaire est ainsi plus que jamais ouvert à l'expression différentielle des gènes associés au processus de sénescence cellulaire. Il est, en effet, possible que les gènes surexprimés spécifiquement chez les cellules ayant subi des stress successifs soient liés au développe-

ment d'états cellulaires pathologiques et que ces gènes soient la conséquence directe de l'exposition aux stress.

Dans ce cas de figure, développer des techniques nouvelles de biologie moléculaire telles que l'hybridation soustractive, le "differential display", devaient permettre de mieux explorer l'environnement génique du processus de vieillissement. De par leur sensibilité, ces techniques permettent, sur base de leur ARN messenger, d'isoler des gènes peu transcrits des cellules ayant vieillis normalement et des cellules stressées. L'identification de ces gènes ouvrirait une bonne percée dans la compréhension des diverses régulations et des cascades transductionnelles conduisant à la phosphorylation des protéines impliquées dans la sénescence cellulaire. Ainsi, pourra-t-on relever ce grand défi qui demeure à l'horizon : *"pouvoir réduire le vieillissement à une maladie curable et la mort à une lointaine et soudaine échéance, ainsi la santé assimilée au silence de nos organes nous serait assurée jusqu'à notre disparition matérielle"*. (Cl. Jasmin)

Bibliographie

- Afshari, C.A., Vojta, P.J., Annab, B., Lois A., Futreal, A., Willard, T.Br., Barrett, J.C., Investigation of the role of G1/S cell cycle mediators in cellular senescence., *Exp.Cell.Res.*, 1993, 209, 231-237.
- Allsopp, R.C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W., Harley, C.B., Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 89, 10114-10118.
- Balin, A.K., Goodman, D.B.P., rasmussen, H., Cristofalo, V.J., The effect of oxygen and vitamin E on the lifespan of human diploid cells *in vitro* . *J. Cell Biol.*, 1997, 74, 58-67.
- Bayreuther, K., Rodemann, H.P., Francz, P.I., Maier, K., Differentiation of fibroblast stem cells. *J. Cell. Sci.*, 1988b, Suppl. 10, 115-130.
- Bayreuther, K., Rodemann, H.P., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M., Francz, P.I., Human skin fibroblasts *in vitro* differentiate along a terminal cell lineage. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, 1988a, 85, 5112-5116.
- Benezra, R., Davis, R.L., Lockshon, D., Turner, D.L., Weintraub, H., The protein Id : a negative regulator of Helix loop Helix DNA binding proteins. *Cell*, 61, 49-59.
- Berzney, R., Coffey, D.S., Nuclear protein matrix : association with newly synthesised DNA, *Science*, 1975, 189, 291-293.
- Boulanger, P. A., Blair, G.E., Expression and interactions of human adenovirus oncoproteins. *Biochem. J.*, 1991, 275, 281-299.
- Campisi, J., Dimri, G., Hara, E., Control of replicative senescence. *Handbook of the Biology of aging*. 4th edition, Academic Press Inc., 1996.
- Chang, Z.F., Chen, K.Y., Regulation of ornithine decarboxylase and other cell cycle-dependent genes during senescence of IMR 90 human fiboblasts. *J. Biol. Chem.*, 1988, 266, 11431-11435.
- Chen , P-L., Scully, P., Shew, J-Y., Wang, J. Y.J., Lee, W-H., Phosphorylation of re tinoblastoma gene product is modulated during cell cycle and cellular differentiation. *Cell*, 1989, 58, 1193-1198.

- Chen, Q., Ames, B.N., Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 4130-4134.
- Cohen, D.R., Curran, T., The structure and function of the fos protooncogene. *Critical Review in Oncogenesis*, 1989, 1, 65-88.
- Counter, C.M., Avillon, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B., Bacchetti, S., Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cell which express telomerase activity. *EMBO J.*, 1992, 11, 1921-1929.
- Cristofalo, V.J., Pignolo, R.J, Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture, *Physiol. Rev.*, 1993, 73, 617-638.
- Cutler, R.G., Recent progress in testing the longevity determinant and disdifferentiation hypothesis of aging. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 1991, 12,75-98.
- Derventzi, A., Gonos, E., Rattan, S.I.S., Ageing and Cancer: a struggle of tendencies, in : *Molecular gerontology*, edited by Rattan and Toussaint, Plenum Press, New York, 1996, 15-23.
- Dimri, G.P., Campisi, J., Altered profile of transcription factor binding activities in senescent human fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, 1994, 212, 132-140.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Meleen, A., Scott, G., Roskelley, C., Medranos, E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M., Campisi, J., A biomarker that identifies senescent human cells in culture and aging skin in vivo, *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 9363-9367.
- Dulic, V., Drullinger, L.F., Lees, E., Reed, S.I., Stein, G.H., Altered regulation of G1 cyclins in senescent human diploid fibroblasts : Accumulation of inactive cyclin E-cdk and cyclin D-cdk complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 11038-11043.
- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K., W., Vogelstein, B., WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppressor gene. *Cell*, 1993, 75, 817-825.

- Farnham, P.J., Slansky, J.E., Kollmar, R., The role of E2F in mammalian cell cycle. *Biochem. Biophys. Acta*, 1993, 1155, 125-131.
- Goldstein, S., Aging *in vitro* : growth of cultures cells from Galapagos tortoise. *Exp. Cell Res.*, 1974, 83, 297-302.
- Goldstein, S., Replicative senescence : The human fibroblast comes of age. *Science*, 1990, 249, 1129-1133.
- Gonos, E., Burns, J. S., Mazars, R. G., Kobrna, A., Riley, W., Barnett, S.C., Zafarana, G., Ludwig, R. L., Ikram, Z., Powell, A.J., Jat, P.S., Rat embryo fibroblasts immortalized with Simian Virus 40 Large T antigene undergo senescence upon its inactivation. *Mol. Cell. Biol.*, 1996, 5127-5138.
- Gormann, S.D., Cristofalo, V.J., Reinitiation of cellular DNA synthesis in BrdU-selected non dividing senescent WI-38 cells by SV 40 infection. *J. Cell. Physiol.*, 1985, 125, 122-126.
- Grana, X., Reddy, E.P., Cell cycle in mammalian cells : role of cyclins, cyclins dependent kinases, growth suppressor genes and cyclin-dependent kinases inhibitors. *Oncogene*, 1995, 11, 211-299.
- Hara, E., Yamaguchi, T., Nojima, H., Ide, T., Campisi, J., Okayama, H., Oda, K., Id related genes encoding helix loop helix protein are required for G1 progression and are repressed in senescent human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 2139-2145.
- Harley, C.B., Futchter, A.B., Greider, C.W., Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 1990, 345, 458-460.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S., The serial cultivation of human diploid cell stains, *Exp. Cell. Res.*, 1961, 25, 585-621.
- Hedner, K., Högstedt, A.M., Kolning, Mark-Vendel, E., Strömbek, B., Mitelmann, F., Sister chromatid exchanges and structural chromosome aberrations, in relation to age and sex, *Hum. Genet.*, 1982, 62, 305-309.
- Hollstein, M., Sidransk, Y.D., Vogelstein, B., Harris, C.C., p53 mutation in human *Cancer Science*, 1991, 253, 49-53.

- Junqueira, C., L., Carneiro, J., *Histologie*, Piccin, Italie, 1987, p.533.
- Kanungo, M.S., *Biochemistry of aging*, New York, USA, Academic Press, 1980.
- Kappus, H., *Lipid peroxydation : Mechanisms, Analysis, Enzymology and Biology relevance*, In : Helmut Sies, *Oxidative stress*, Academic Press, 1985, 273-310.
- Kim, N.W., Platyszek, M., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L.C., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., Shay, J.W., Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994, 266, 2011-2015.
- Levy, M.Z., Allsopp, R.C., Futcher, A.B., Greider, C.W., Harley, C.B., Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Chem.*, 1992, 225, 951-960.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Darnell, J., *Molecular Cell Biology*, 3d Ed., Scientific American. Books, New York, 1995, p.1344.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Faar, A.L., Randall, R.J., Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 1957, 27, 10805-10808.
- Ludlow, J.W., DeCaprio, J.A., Huang, C-M., Lee, W-H., Paucha, E., Livingston, D.M., SV 40 large T antigene binds preferentially to an underphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family. *Cell*, 1989, 56, 57-65.
- Lumpkin, C.K., Knepper, J.E., Butel, J.S., Smith, J.R., Pereira-Smith, O.M., Mitogenic effects of the protooncogene and oncogene forms of c-H-ras DNA in human diploid fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, 1986, 6, 2990-2993.
- Macieira-Coelho, A., Chromatin reorganisation during senescence of proliferating cells, *Mutation Res.*, 1991, 256, 81-104.
- Matsumura, T., Zerrudo, Z., Hayflick, L., Senescent human diploid cells in cultures : survival, DNA synthesis and morphology. *J. gerontol.*, 1979, 34, 328-334.

- McCormick, A., Campisi, J., Cellular aging and senescence. *Current opinion in cellular biology*, 1991, 3, 230-234.
- Michiels, C., Toussaint, O., Remacle, J., Comparative study of oxygen toxicity in human fibroblasts and endothelial cells. *J Cell Physiol.*, 1990, 144, 295-302.
- Nevins, J., E2F : a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science*, 1992, 258, 1300-1303.
- Orgel, L. E., The maintenance of accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1963, 67, 517-521.
- Orgel, L.E., Ageing of clones of mammalian cells. *Nature*, 1973, 243, 441-445.
- Packer, L., Feuhr, K., Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature*, 1977, 267, 423-425.
- Pereira-Smith, O.M., Smith, J.R., Evidence for the recessive nature of cellular immortality, *Science*, 1983, 221, 964-967.
- Prigogine, I., Stengers, I., *Entre le temps et l'éternité*, Fayard, 1988, p. 223.
- Prigogine, I., Stengers, I., *La Nouvelle Alliance, Métamorphose de la science*, Gallimard, 1979, p. 30
- Remacle, J., Lambert, D., Raes, M., Pigeolet, E., Michiels, C., Toussaint, O., Importance of various antioxydant enzymes for cell stability. Confrontation between theoretical and experimental data. *Biochem. J.*, 1992, 286, 41-46.
- Remacle, J., Raes, M., toussaint, O., Renard, P., Rao, G., Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function. *Mutation Res.*, 1995, 316, 103-122.
- Rittling, S.R., Brooks, K.M., Cristofalo, V.J., Baserga, R., Expression of cell cycle dependent genes in young and senescent WI-38 fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 3316-3320.

- Rodemann, H.P., Bayreuther, K., Dittmann, F., Albiez, M., Francz, P.I.,
Selective enrichment and biochemical characterisation of seven fibroblasts
cell types in vitro. *Exp. Cell Res.*, 1989, 180, 84-93.
- Rohme, D., Evidence for relationship between longevity of mammalian species and
lifespans of normal fibroblasts in vitro and erythrocytes in vivo. *Proc. Natl.
Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 5009-5013.
- Ryan, Q.C., Goonwardene, I.M., Murasko, D.M., Extension lifespan of human T
lymphocytes by transfection by SV 40 large T antigen. *Exp. Cell Res.*, 1992,
199, 387-391.
- Ryan, Q.C., Goonwardene, I.M., Murasko, D.M., Extension of lifespan of human T
lymphocytes by transfection with SV-40 large T antigen. *Exp. Cell Res.*, 1992,
199, 387-391.
- Seshadri, T., Campisi, J., C-fos repression and an altered genetic program in senescent
human diploid fibroblasts. *Science*, 1990, 247, 205-209.
- Shay, J.W., Pereira-Smith, O.M., Wright, W.E., A role for both pRb and p53 in the
regulation of human cellular senescence. *Exp. Cell Res.*, 1991, 196, 33-39.
- Shay, J.W., Wright, W.E., Brasiskyte, D., Van Der hagen, B.A., E6 of human
papillomavirus type 16 can overcome the M1 stage of immortalization in human
mammary epithelial cells but not in human fibroblasts. *Oncogene*, 1993, 8,
1407-1413.
- Shay, J.W., Wright, W.E., Quantification of the frequency of immortalization of normal
human diploid fibroblasts by SV 40 large T antigen. *Exp. Cell Res.*, 1989, 184,
109-118.
- Strehler, B.L., Genetic instability as the primary cause of human aging. *Exp.
Gerontol.*, 1986, 21, 283-319.
- Sun, X.H., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Baltimore, D., Id proteins, Id1 and Id2
selectively inhibit DNA binding by one class of helix loop helix proteins. *Mol.
Cell. Biol.*, 1991, 13, 7874-7880.

- Takuwa, N., Zhou, W., Mamorou, K., Takuwa, Y., Ca²⁺-dependent stimulation of retinoblastoma gene product phosphorylation and p34cdc 2 kinase activation in serum-stimulated human fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 138-145.
- Toussaint, O., Approche globale du vieillissement cellulaire à partir de la théorie des systèmes ouverts. Dissertation doctorale, FUNDP, Namur, 1992, p. 187.
- Toussaint, O., Houbion, A., Remacle, J., 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.*, 1992, 65, 65-83.
- Toussaint, O., Houbion, A., Remacle, J., Effects of modulations of the energetic metabolism on the mortality of cultured cells. *Biochem. Biophys. Acta*, 1994, 1186, 209-220.
- Toussaint, O., Michiels, C., Raes, M., Remacle, J., Cellular aging and the importance of the energetic factors. *Exp. Gerontol.*, 30, 1-22, 1995.
- Toussaint, O., Raes, M., Remacle, J., 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.*, 1991, 61, 45-64.
- Toussaint, O., Remacle, J., Revue critique des théories du vieillissement cellulaire. Du concept de Hayflick au concept du seuil critique d'accumulation d'erreurs, *Pathol. Biol.*, 1994, 4, 313-321.
- Tsuji, Y., Ide, T., Ishibani, S., Correlation between the presence of T antigen and the reinitiation of host DNA synthesis in senescent human diploid fibroblasts after SV 40 infection. *Exp. Cell Res.*, 1983, 144, 165-169.
- Von Zglinicki, T., Sarentzki, G., Döcke, W., Lotze, C., Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts : a model for senescence. *Exp. Cell Res.*, 1995, 220, 186-193.
- Weinberg, R.A., Tumor suppressor genes. *Science*, 1991, 254, 1138-1146.
- Wheather, P.R., Burkitt, H.G., Daniels, G.V., *Histologie fonctionnelle*, 2ème Edition, McGraaw-Hill, Paris, 1987, p.351.