



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Analyse fonctionnelle de gènes impliqués dans la réponse de fibroblastes murins à des stress cytotoxiques

Dedessus le Moutier, Jérémie

Award date:
2003

[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

**Analyse fonctionnelle de gènes impliqués dans la réponse de fibroblastes
murins à des stress cytotoxiques**

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

Jérémie Dedessus le Moutier
Juin 2003

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.724418 - Téléfax: + 32(0)81.72 4135
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Analyse fonctionnelle de gènes impliqués dans la résistance de fibroblastes murins face à des stress cytotoxiques

Dedessus le Moutier Jérémie

Résumé

Notre laboratoire a identifié des gènes, comme ceux codant pour la chaîne légère de la ferritine (FTL), l' α -synucléine (α -SYN) et la protéine adaptatrice p66 SHC, dont le niveau d'expression est modifié lors de la sénescence répllicative (SR) et de la sénescence prématurément induite par des stress subcytotoxiques (SIPS) sur des fibroblastes humains. L'analyse fonctionnelle de ces gènes, en ce qui concerne leur rôle dans la SR et la SIPS, est un processus qui demande beaucoup de temps lorsque l'on teste le rôle de chaque gène l'un après l'autre. De plus, ce type d'analyse demande une modification stable du niveau d'expression de chaque gène étudié, qui dans notre cas nécessite des étapes de transfections et de sélection longues, ce qui épuise rapidement le potentiel prolifératif cellulaire. Pour accélérer ce processus, tout en le gardant compatible avec nos modèles expérimentaux, nous avons implémenté la technologie de clonage Gateway et d'intégration du gène d'intérêt par recombinaison site-spécifique au sein de la lignée hôte. La lignée de fibroblastes humains compatible avec le système Flp-In étant en construction au laboratoire, nous avons travaillé avec des fibroblastes murins NIH3T3 Flp-In dans lesquels nous avons transfectés les ADN complémentaire de FTL, l' α -SYN et de p66 SHC. Après avoir testé l'augmentation de la quantité de ces protéines humaines dans les cellules murines, nous avons testé les effets de la surexpression de ces protéines sur la survie cellulaire après exposition à des stress cytotoxiques sous *tert*-butylhydroperoxyde, H₂O₂, éthanol et UVB. Nous avons mis en évidence des effets protecteurs de la transfection de p66 SHC contre le *t*-BHP, de FTL contre les UVB et de l' α -SYN contre les quatre types de stress. Lorsque des fibroblastes humains Flp-In seront générés (travail en cours), nous pourrons tester les effets de la surexpression de ces gènes sur l'apparition des caractéristiques de la SIPS.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2003

Promoteur: O. Toussaint

Directeur : M. Salmon

Il est à présent et déjà l'heure de remercier toutes les personnes qui ont collaborer de près ou de loin à ce mémoire ainsi que celles et ceux dont le soutien moral et affectif m'a été très précieux.

Je tiens tout d'abord à remercier M^{me} Martine Raes, directrice du laboratoire de biologie cellulaire, de m'avoir accueilli au sein de son unité de recherche et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à l'accomplissement de ce projet. J'adresse aussi mes remerciements au membre du jury pour leur lecture attentive ainsi que pour l'évaluation de mon travail.

Je tiens maintenant à remercier mon promoteur, Olivier Toussaint, pour m'avoir fait confiance depuis le début et m'avoir intégré scientifiquement et socialement dans son équipe. Olivier, ce petit mot pour t'exprimer ma reconnaissance pour tes corrections assidues, tes petits mots d'encouragement toujours au bon moment ainsi que pour ta bonne humeur et ton humour maintenant devenus pour moi « légendaires ». Maintenant que je suis un pro pour les transbordements de chaise à fauteuil, je pense être prêt pour les quatres ans à venir (euh..... ?).

Je tiens ensuite à exprimer mes plus vifs remerciements à Michel Salmon, mon directeur de mémoire. Michel, ces quelques lignes ne me suffiront pas pour te dire à quel point je te suis reconnaissant. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi sans jamais t'énerver (du moins sur moi ! *sic*) et surtout de m'avoir fait découvrir que la recherche est un jeu passionnant quand on sait se poser pour réfléchir. Merci de m'avoir soutenu et guider dans cette aventure (courte certe) qu'est le mémoire. Tes connaissances et ta capacité à résoudre nos problèmes m'ont beaucoup appris !

Je tiens également à remercier toutes les personnes du labo qui me sont venues en aide : Sophie pour ton aide au jour le jour (du style c'est où ce réactif STP ?) ainsi que pour ta collaboration à mes manips ; Mélanie pour sa précieuse aide lors des manips de feu prévues par Michel le fou ; Friedel pour ton dévouement, ta maîtrise de Powerpoint ainsi que ton aide précieuse lors de la rédaction, et toute l'équipe des GRAS (Olivier, Michel, Florence, Thierry, Stéphanie, François et les autres) pour son accueil, son ambiance et ses conseils avisés.

D'un point de vue plus personnel, je remercie mes ami(e)s et plus spécialement la bande du cercle BIO (ils se reconnaîtront) pour leur soutien et les divertissements toujours bien venus après une journée de manips. Je tiens aussi à remercier Blandine pour son soutien et son aide dans les moments de doute.

Enfin, j'espère remercier ma famille (ndlr les Dedessus le Moutier's) pour leur soutien indéfectible, tant financier que moral, au long de ces cinq années passées à Namur. Même dans les moments difficiles (et il y en a eus !!!) vous avez toujours été là. MERCI !!!!!!!!!!!!!!!

Peu l'aurait parié mais j'y suis arrivé..... Et ça ne fait que commencer !.....(à suivre)

Table des matières

Introduction	6
I) Sénescence réplivative (SR)	7
Historique.....	7
Découverte de la sénescence réplivative <i>in vivo</i>	7
Sénescence réplivative, vieillissement et longévité.....	7
Relation entre stress et vieillissement.....	8
Introduction.....	8
Effet des stress sur la cellule.....	8
Sénescence induite prématurément par les stress (SIPS)	9
Caractéristiques communes à la SR et à la SIPS.....	10
Morphotypes.....	10
Activité S.A β -gal.....	10
Apparition de délétions dans l'ADN mitochondrial.....	11
Raccourcissement des télomères.....	11
Le cycle cellulaire.....	13
II) Étude protéomique et transcriptomique des fibroblastes humains WI-38 en SIPS et en SR	14
III) Mise en place d'outils moléculaire pour l'analyse fonctionnelle des gènes impliqués dans la résistance aux stress et à la SIPS	16
La technologie de clonage Gateway.....	16
Transfections de lignées Flp-In et intégration ciblée du transgène par recombinaison site-spécifique.....	18
IV) Développement d'un modèle de SIPS en lignée WI-38 immortalisée par la télomérase	19
But du travail.....	21
Matériel et méthodes	23
Culture de bactéries.....	24
Souches bactériennes.....	24
Milieux de culture.....	24
Méthode.....	24
Transformation bactérienne.....	24
Méthode.....	24
Technique de clonage à l'aide du système Gateway.....	25
Construction du vecteur d'entrée.....	25
Matériel.....	25
Méthode.....	25
Construction du vecteur de destination.....	25
Matériel.....	25
Méthode.....	25
Minipréparation d'ADN plasmidique.....	26
Matériel.....	25
Méthode.....	25

Maxipréparation d'ADN plasmidique.....	26
Matériel.....	27
Méthode.....	27
Restrictions enzymatiques.....	28
Electrophorèse sur gel d'agarose.....	28
Matériel.....	28
Méthode.....	29
Le séquençage.....	29
Techniques de culture cellulaire.....	29
Matériel.....	29
Méthode.....	30
Repiquage des cellules murines NIH3T3 Flp-In.....	30
Décongélation et mise en culture des cellules.....	30
Transfection des cellules NIH3T3.....	30
Matériel.....	30
Méthode.....	30
Extraction protéique.....	31
Matériel.....	31
Méthode.....	31
Western Blot.....	31
Matériel.....	32
Méthode.....	32
Immunofluorescence.....	33
Matériel.....	33
Méthode.....	33
Stress cytotoxiques sur les cellules murines NIH3T3 Flp-In.....	34
Matériel.....	34
Méthode.....	34
Test de viabilité cellulaire au MTT.....	34
Matériel.....	34
Méthode.....	34
Résultats.....	35
Clonage par la technologie Gateway.....	36
Transfection des fibroblastes murins NIH3T3 Flp-In et analyse de la surexpression.....	37
Analyse des effets de la surexpression sur la résistance aux stress cytotoxiques au <i>t</i> -BHP, à l'H ₂ O ₂ , aux UVB et à l'éthanol.....	38
Étude du mécanisme de protection contre les stress conféré par la surexpression de l' α -sunucléine.....	42
Discussion, Perspectives et Conclusion.....	43
Bibliographie.....	49

Liste des abréviations et des unités

°C	Degré Celsius
μ	Micro- (10 ⁻⁶)
A	Adénine
A	Ampère
aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNm	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
AOP 2	Antioxydant Protein 2 (PRX VI)
Apo J	Apolipoprotéine J
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
c	Centi- (10 ⁻²)
C	Cytosine
CDK	Kinase dépendante des cytokines
CMV	Cytomégalovirus
Da	Dalton
DCP	Doublement Cumulatif de Population
DCS	<i>Donor Calf Serum</i>
DHG	<i>Dulbecco High Glucose</i>
DO	Densité Optique
DTT	Dithiotréitol
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
EtOH	Ethanol
FDH	Fibroblastes Diploïdes Humains
FRT	Flp Recognition Target
g	Gramme
G	Guanine
g	Unité de gravité
G418	Généticine
Gel 2D	Gel d'électrophorèse bidimensionnelle
GPx	Glutathion Peroxydase
h	Heure
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HBS	Hepes Buffer Saline
HSP 27	Heat Shock Protein 27
IGF2	Insuline-like Growth Factor 2
IHF	Integration Host factor
Int	Intégrase
JIP1/IB1	<i>JNK-Interacting Protein/Islet Brain</i>
kb	kilobases
l	Litre
LB	Milieu de culture L-BROTH
m	Mètre
m	Milli- (10 ⁻³)
M	Molaire

MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MDM 2	Mouse Double Minute 2
MEM	Minimal Eagle's Medium
MF	Morphotype mitotique
min	Minute
mol	Mole
MOPS	Acide 3-(<i>N</i> -morpholino)-propanesulfonique
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium
n	Nano- (10^{-9})
p	Pico- (10^{-12})
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potentiel hydrogène
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PMF	Morphotype post-mitotique
PRX VI	Peroxyredoxine VI
PVDF	Polyvinyl difluoride
Rb	Rétinoblastome
RL	Radicaux libres
RNAse	Ribonuclease
rpm	Tours par minute
S.A βgal	β-galactosidase associée à la sénescence
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sec	Seconde
SIPS	Sénescence Induite Prématurément par les Stress
SR	Sénescence répllicative
T	Thymine
T25	Boîte de culture de 25 cm ²
T75	Boîte de culture de 75 cm ²
TBE	Tampon Tris-Borate EDTA
<i>t</i> -BHP	<i>Tert</i> -Butylhydroperoxide
TBS	Tris Buffer Saline
TBS-T	Tris Buffer Saline – Tween
TE	Tris-EDTA
TGF-β1	Transforming Growth Factor β1
U	Unité enzymatique
UV	Ultraviolet
V	Volt
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
Xis	Excisionase

Introduction

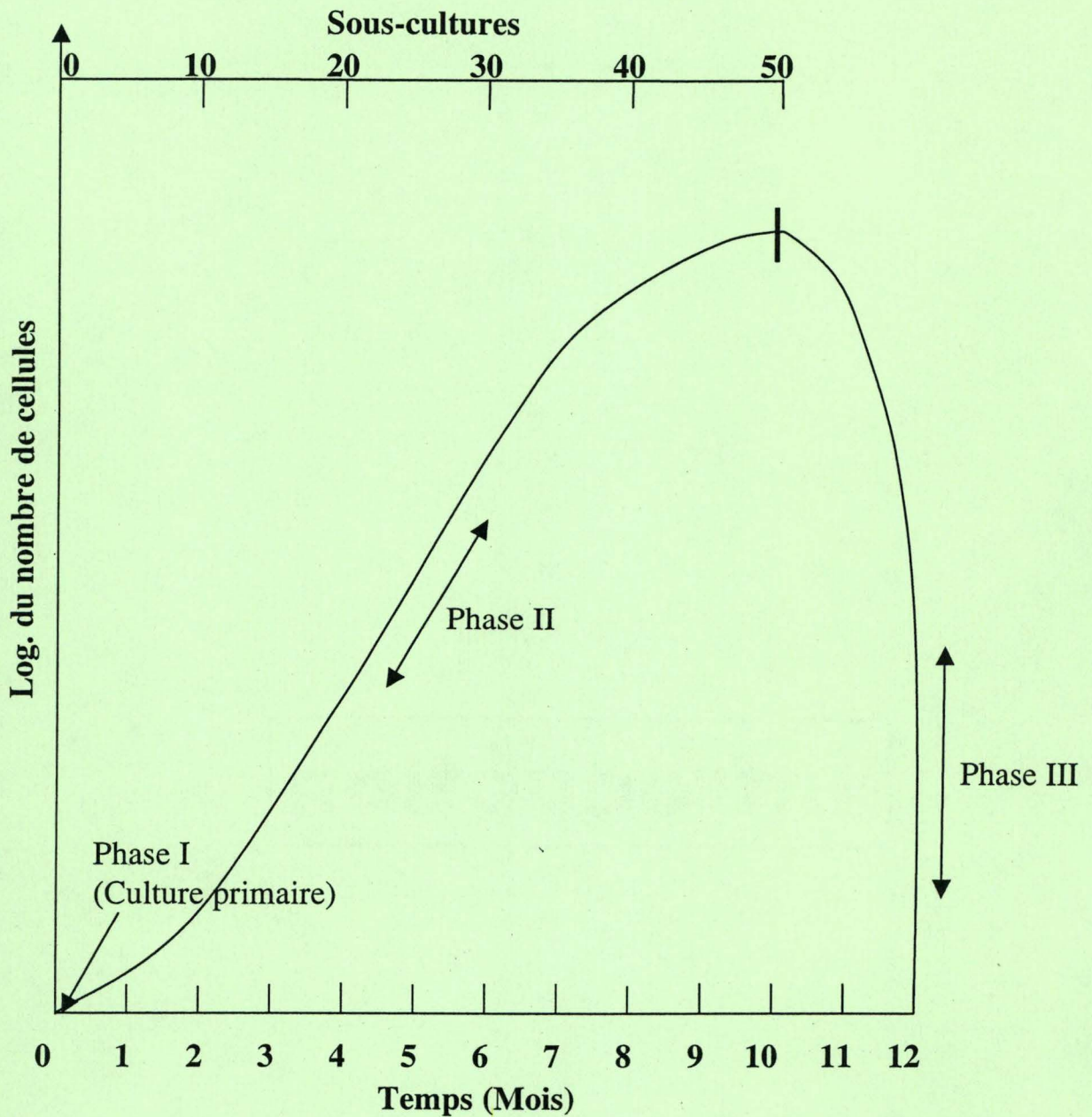


Figure A.I.1 : Diagramme montrant les trois phases successives de la vie d'une culture de fibroblastes normaux (Hayflick, 1977). La phase I se caractérise par la mise en culture d'un explant et l'établissement d'une culture primaire. La phase II débute dès le premier repiquage et se caractérise par un taux de croissance exponentiel. Un ralentissement du rythme de croissance survient ensuite, suivi par un arrêt définitif des divisions cellulaires. Cet état, appelé sénescence répliquative, se termine, après une période plus ou moins longue, par la mort des cellules (Phase III).

I) Sénescence réplivative

Historique

Découverte de la sénescence réplivative *in vivo*.

En 1961, Hayflick et Moorhead montrèrent qu'une population de fibroblastes diploïdes de poumon fœtal humain en culture avait une capacité limitée de divisions d'environ 50 DCPs (doublements cumulatifs de population). Au-delà de cette limite, les cellules arrêtaient de se diviser irréversiblement. C'est la sénescence des cellules réplivatives (Hayflick *et al* , 1961). Ce phénomène est aussi nommé la limite de Hayflick ou sénescence réplivative. De plus, ces auteurs mirent en évidence que l'évolution d'une culture cellulaire se déroulait en trois phases caractéristiques. La première phase correspond à la mise en culture des cellules d'un explant de tissu frais originel. Lors de la seconde phase faisant suite au premier repiquage, la croissance des cellules est exponentielle. Le ralentissement progressif de la vitesse de croissance des cultures jusqu'à un arrêt irréversible des mitoses caractérise la troisième phase que représente la sénescence réplivative. Les cellules sénescents peuvent être maintenues en culture pendant plusieurs mois car elles conservent un métabolisme actif. S'ensuit enfin la mort cellulaire par nécrose (**Figure A.I.1**).

Plus tard, on a montré que ce modèle de vieillissement *in vitro* ne s'appliquait pas seulement aux fibroblastes diploïdes humains mais aussi à d'autres types cellulaires normaux dotés de capacité prolifératives chez l'adulte tels que les mélanocytes, les cellules endothéliales, etc.; et ce pour différentes espèces de vertébrés depuis les amphibiens jusqu'aux mammifères.

Sénescence réplivative, vieillissement et longévité.

La sénescence des cellules prolifératives observée *in vitro* a été mise en parallèle avec le vieillissement cellulaire *in vivo*.

Parmi les nombreux arguments en faveur de cette relation *in vitro/in vivo*, parlons tout d'abord de la durée de vie proliférative des fibroblastes en terme de DCPs, celle-ci étant inversement proportionnelle à l'âge du donneur. Autrement dit, le nombre de passages en culture maximum réalisés par des fibroblastes provenant d'un individu jeune sera plus élevé que celui de cellules du même type provenant d'un individu âgé (**Figure A.I.2**). Il en découle que les cellules de donneurs âgés entreront plus vite en sénescence que celles d'un donneur jeune, et donc que leur potentiel prolifératif s'amenuise également *in vivo* (Martin *et al.*, 1970).

D'un autre côté, les cellules provenant d'espèces de mammifères à longue durée de vie effectueront un plus grand nombre de passages en culture que celles provenant d'animaux à durée de vie plus brève. Autrement dit, la durée de vie proliférative d'une cellule est directement proportionnelle à la durée de vie maximale de l'animal dont elle est issue (Hayflick *et al.*, 1977) (**Figure A.I.3**). En outre, les cellules issues d'un individu atteint du syndrome de Werner, syndrome de vieillissement accéléré, affichent une durée de vie réplivative anormalement réduite *in vitro* (20 DCPs maximum). Une délétion est à la base de ce syndrome. Celle-ci a lieu dans le gène codant pour une protéine appartenant à la famille

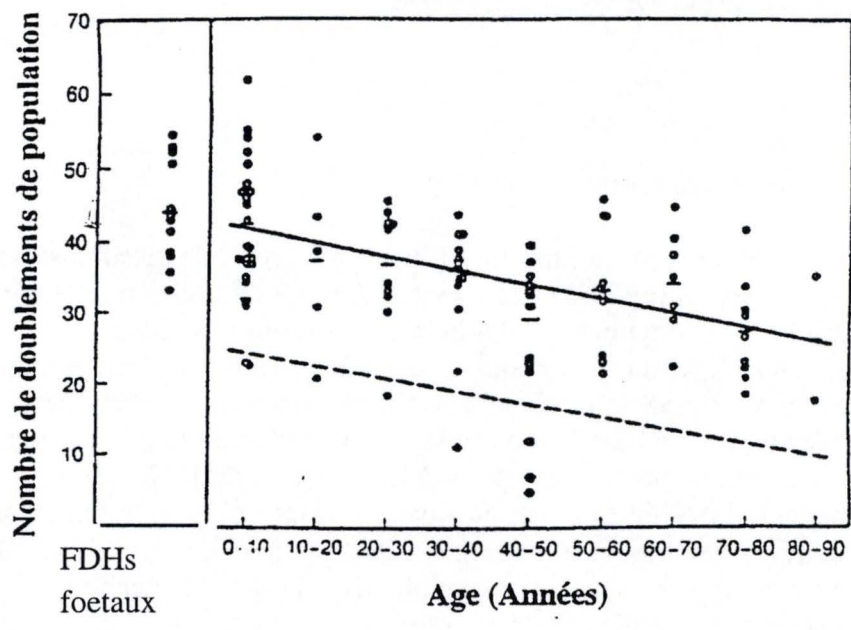


Figure A.I.2: Relation entre l'âge du donneur et le nombre de doublements de population effectués *in vitro*, pour les fibroblastes humains (Pour une revue: Cristofalo *et al.*, 1994).

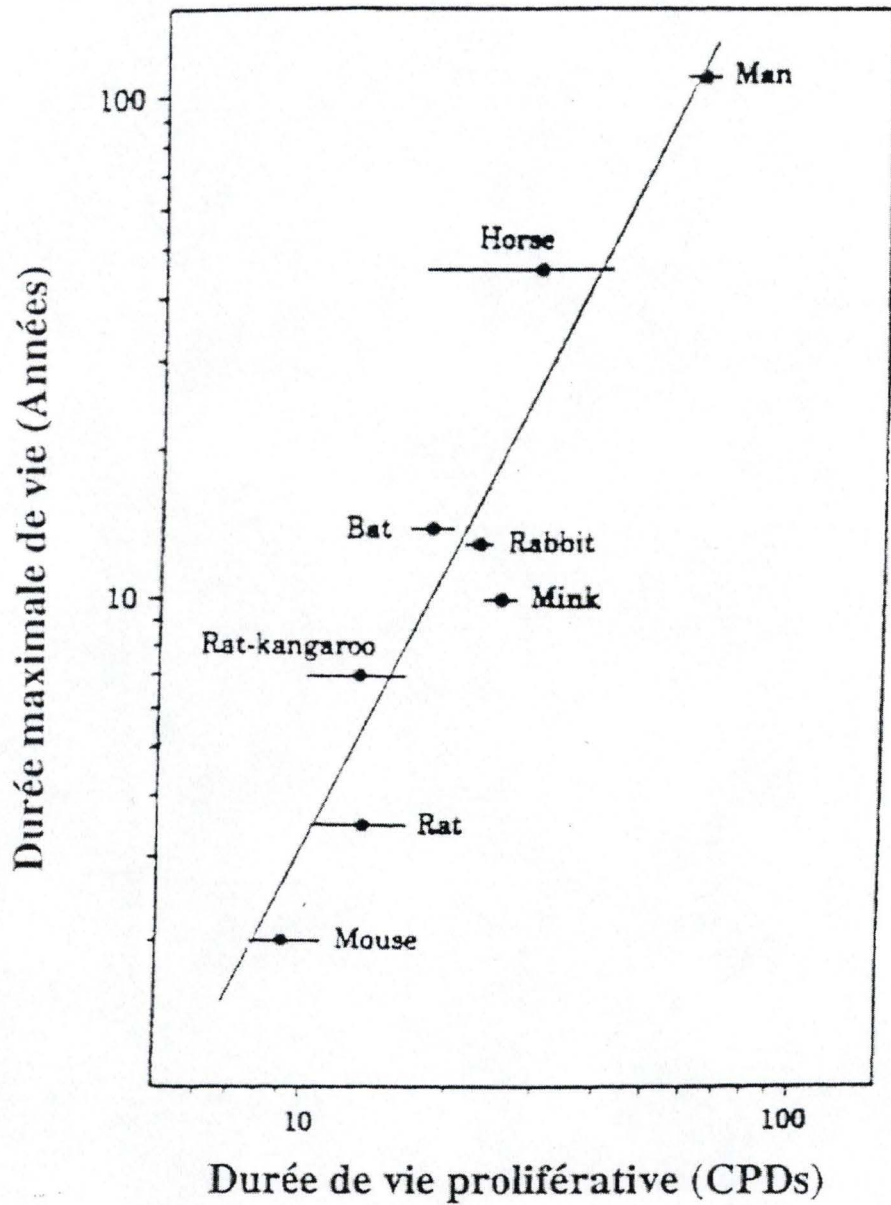


Figure A.I.3 : Relation entre la durée de vie proliférative des fibroblastes et la durée de vie maximale de l'espèce, pour huit espèces de mammifères (Pour une revue: Cristofalo *et al.*, 1994).

des hélicases. Cette hélicase possède deux domaines : un domaine endonucléase et un domaine hélicase. Si l'activité nucléase vient à être mutée, il en résultera une moins bonne maintenance des parties télomériques à laquelle vient s'ajouter une moins bonne réplication et réparation de l'ADN.

Relation entre stress et vieillissement

Introduction

Un stress peut être défini comme toute perturbation potentiellement défavorable d'un facteur environnemental auquel un système vivant est exposé. Les cellules sont exposées, au cours de leur existence, à une multitude de stress extrêmement diversifiés tels que des stress oxydatifs, mécaniques, thermiques, osmotiques, etc. Celles-ci font face de manière plus ou moins efficace en inhibant ou en activant certaines voies de transduction du signal conduisant à des remaniements d'activités métaboliques et/ou dans l'expression des gènes. Ce processus faisant suite à un stress est appelé la réponse au stress. On distingue en général la réponse cellulaire immédiate ou à court terme impliquant l'activation de voies de transduction du signal qui détermine le devenir de la cellule en terme d'arrêt de prolifération, survie, apoptose ou nécrose. Si la cellule survit au stress initial, elle peut mettre en place des remaniements du niveau d'expression de divers gènes. Ceux-ci peuvent être transitoires, laissant éventuellement la place à d'autres, définitifs cette fois, et devenant alors de véritables marqueurs de la réponse à long terme au stress. Ce type de biomarqueurs a été baptisé « cicatrice moléculaire » (Brack *et al.*, 2000).

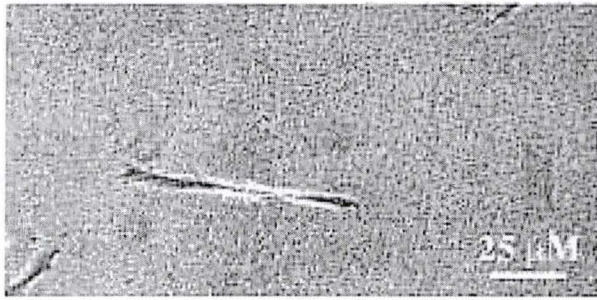
Effet des stress sur la cellule

Des conditions de vie sans stress n'existent pas. Par exemple, l'oxygène tissulaire ou en culture de cellules est source de stress oxydatif constant. Il y a aussi des fluctuations de pH, de température, de salinité, de substrat, etc... La cellule répare sans cesse les dégâts occasionnés en utilisant ses systèmes de défense ou de réparation présents de façon constitutive à un niveau de base.

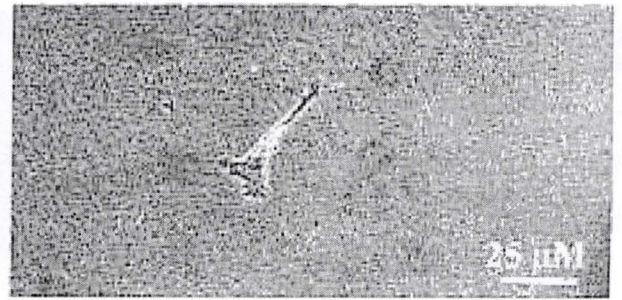
Cependant, il est possible, lorsque les réparations de dommages réversibles n'ont pas lieu assez rapidement ou n'ont pas lieu en totalité, que certaines altérations deviennent irréversibles et finissent par s'accumuler. Par exemple, une base de l'ADN modifiée par les radicaux libres peut entraîner une mutation lors de la duplication ultérieure de l'ADN. Toutefois, des mécanismes compensatoires peuvent se mettre en place, favorisant ainsi une meilleure résistance face à un stress ultérieur. En anglais, on parle alors d' « *hormesis* ».

Des situations de stress peuvent être plus défavorables pour la cellule, par exemple lors de stress chroniques ou répétés à intervalles courts. De telles situations tout à fait anormales telles qu'une intoxication, une inflammation, une exposition à des doses importantes de radioactivité ou de rayonnements UV, peuvent entraîner le débordement des mécanismes de réponse aux stress et on peut alors observer une accumulation de dommages. Ces conditions peuvent mener soit à la sénescence prématurée induite par les stress (SIPS, voir point suivant), soit au déclenchement de l'apoptose (Pour une revue Toussaint *et al.*, 2002), et ce en fonction du type cellulaire et de l'intensité du stress.

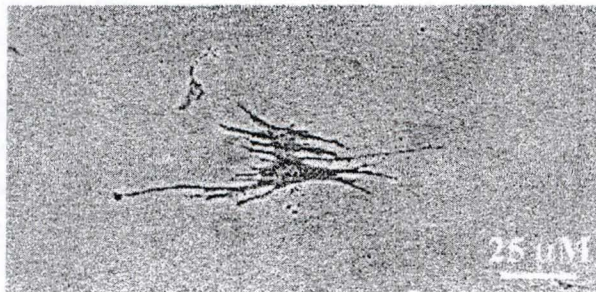
MF I



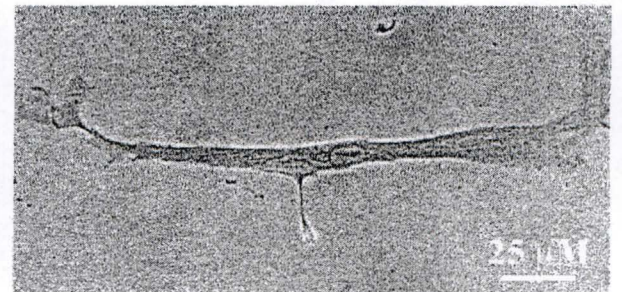
MF II



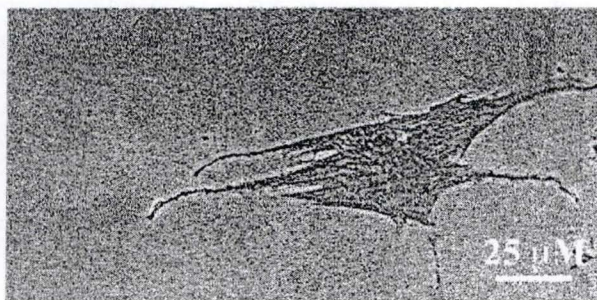
MF III



PMF IV



PMF V



PMF VI

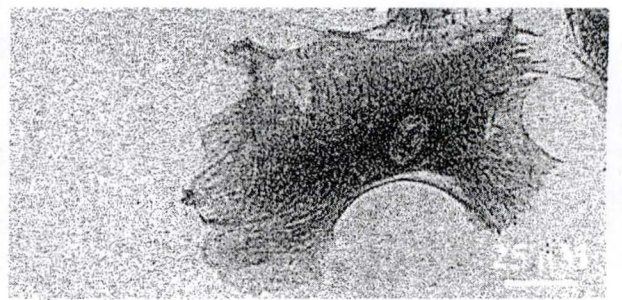


Figure A.I.4 : Représentation des différents morphotypes observés dans les cultures de fibroblastes humains WI-38. Les fibroblastes humains évoluent au cours de leur vieillissement à travers une séquence de 7 morphotypes. Les trois premiers sont des morphotypes mitotiques (MF I, MF II, MF III) et les 4 suivants sont des morphotypes post-mitotiques (PMF IV, PMF V, PMF VI, PMF VII). Le morphotype PMF VII représente les cellules nécrotiques ; il est rarement observé en culture.

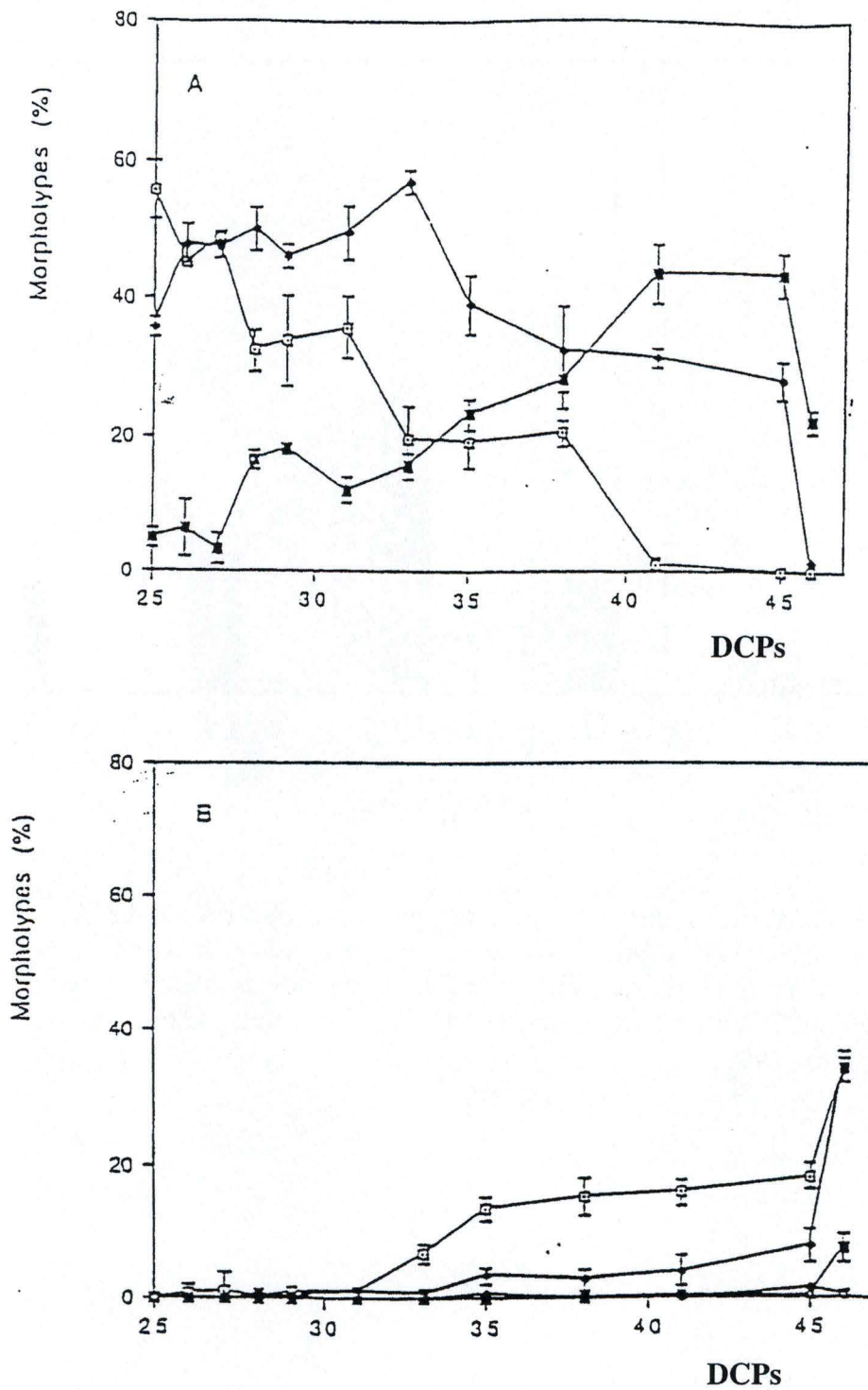


Figure A.I.5: (a) Proportions de fibroblastes mitotiques WI-38 en fonction du nombre de doublements cumulatifs de population (DCP), MFI (carré blanc), MFII (losange noir) et MFIII (carré noir).

(b) Proportions des fibroblastes post-mitotiques WI-38 en fonction du nombre de doublements cumulatifs de population (DCP), PMFIV (carré blanc), PMFV (losange noir) et PMFVI (carré noir) (Toussaint *et al.*, 1992).

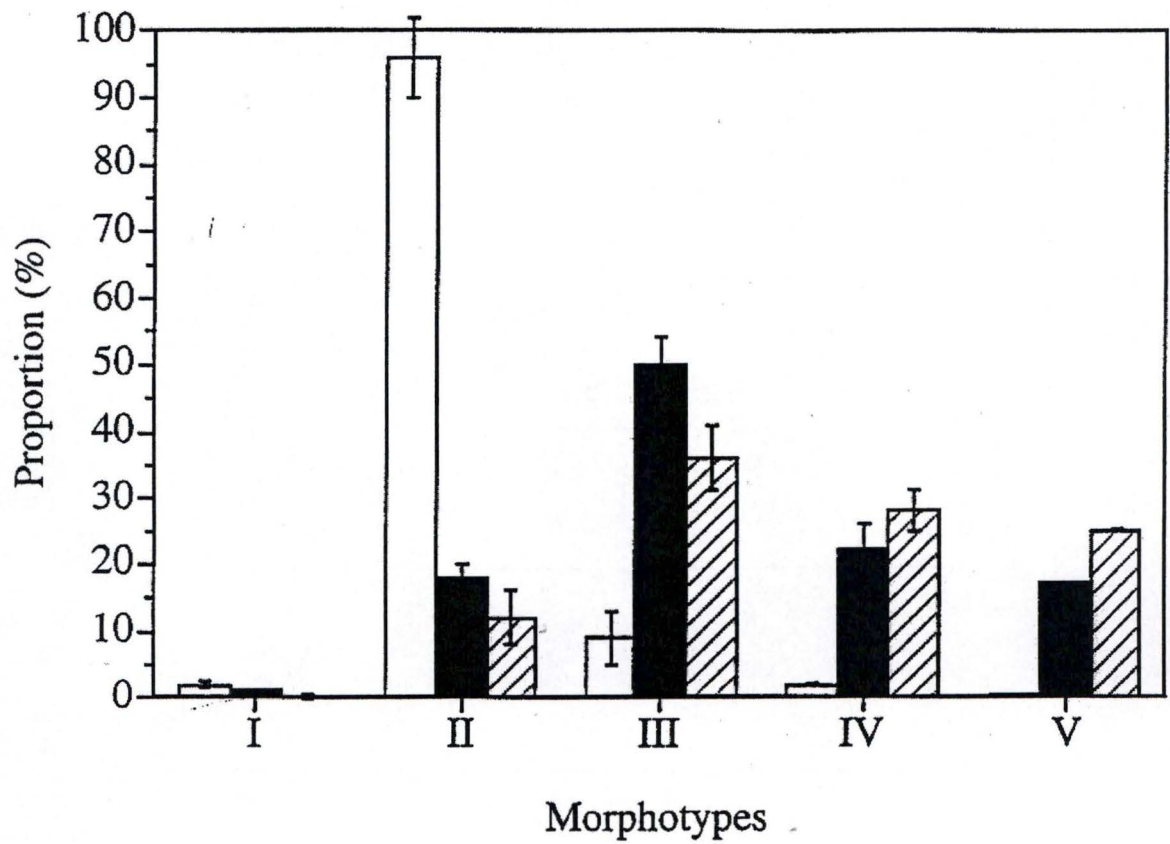


Figure A.I.6 : Proportions des différents morphotypes observés dans des cultures de fibroblastes WI-38 jeunes (27 DCP) représentés par les colonnes blanches, âgés (43 DCP) représentés par les colonnes noires, et de fibroblastes jeunes deux jours après avoir subi 5 stress successifs de 1h en présence de *t*-BHP 100 μ M, illustrés par les colonnes hachurées (Toussaint, O. *et al.*, 1998).

Enfin, dans des conditions de stress extrêmes, les lésions sont tellement nombreuses que la cellule n'est plus capable de réagir par l'activation de voies de transduction du signal et meurt par nécrose.

Les UVB génèrent des taux suffisant d' H_2O_2 intracellulaire sources de radicaux hydroxyles ($^{\circ}OH$) via la réaction de Fenton catalysée par les ions ferreux. Les ions ferriques produit par cette réaction sont continuellement réduits par l'anion superoxyde. Celui-ci est généré non seulement dans le métabolisme oxydatif normal mais aussi quand des molécules comme le NADH au NADPH absorbent des radiations UV. Un autre intermédiaire important est l'oxygène singulet, lequel est généré par l'interaction des UV avec des molécules endogènes photosensibles comme les flavines et les porphyrines. Enfin, les UV peuvent induire des dommages à l'ADN (cassures de brins et de protéines de liaison), ou des modifications aux protéines incluant et aux enzymes. L'éthanol a quant à lui pour effet de fluidifier les membranes et de perturber les flux ioniques (Mantle *et al.*, 1999). De part sa courte chaîne aliphatique, il pénètre la bicouche lipidique et la rend plus fluide en perturbant l'organisation des phospholipides et acides gras qui la composent (Sanchez-Amate *et al.*, 1995). Le *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP) est une molécule amphiphile qui pénètre aisément dans les cellules. Des radicaux peroxydes sont générés dans le cytosol par l'interaction du *t*-BHP avec des métaux de transition comme les ions Cu^{2+} et Fe^{2+} , par un mécanisme similaire à la réaction de Fenton (Suzuki *et al.*, 1988). Les ions Cu^{2+} et Fe^{2+} initient ainsi la peroxydation lipidique (Yuan *et al.*, 1991).

Sénescence induite prématurément par les stress (SIPS)

De nombreux types cellulaires prolifératifs (fibroblastes humains de poumon et de peau, mélanocytes humains, cellules endothéliales, etc.) soumis à des stress de niveau subcytotoxiques avec des ultraviolets (UV), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP), l'éthanol entrent en sénescence prématurée ou SIPS. Celle-ci peut être considéré comme une réponse à long terme des cellules prolifératives face à des stress subcytotoxiques. Les cellules en SIPS partagent de nombreux traits communs avec les cellules sénescents.

D'un point de vue expérimental, les stress oxydatifs sont probablement les inducteurs de SIPS les plus fréquemment utilisés. Deux types de protocoles de stress oxydatifs ont été développés. Dans le premier type, les fibroblastes diploïdes humains (FDHs) subissent un stress léger chronique. Par exemple, on peut exposer les cellules à une hyperoxie prolongée sous 40 % d'oxygène pendant plusieurs semaines (von Zglinicki *et al.*, 1995). Dans le second type, on réalise des stress subcytotoxiques de courte durée, généralement de une à deux heures, répétés ou non. Par exemple, on peut exposer les cellules à des stress courts sous H_2O_2 , *t*-BHP ou éthanol. Il est très important de se situer dans des conditions de stress subcytotoxiques pour pouvoir observer les effets à long terme des stress. Dans ces conditions, la SIPS apparaît entre 48 et 72 heures après le(s) stress.

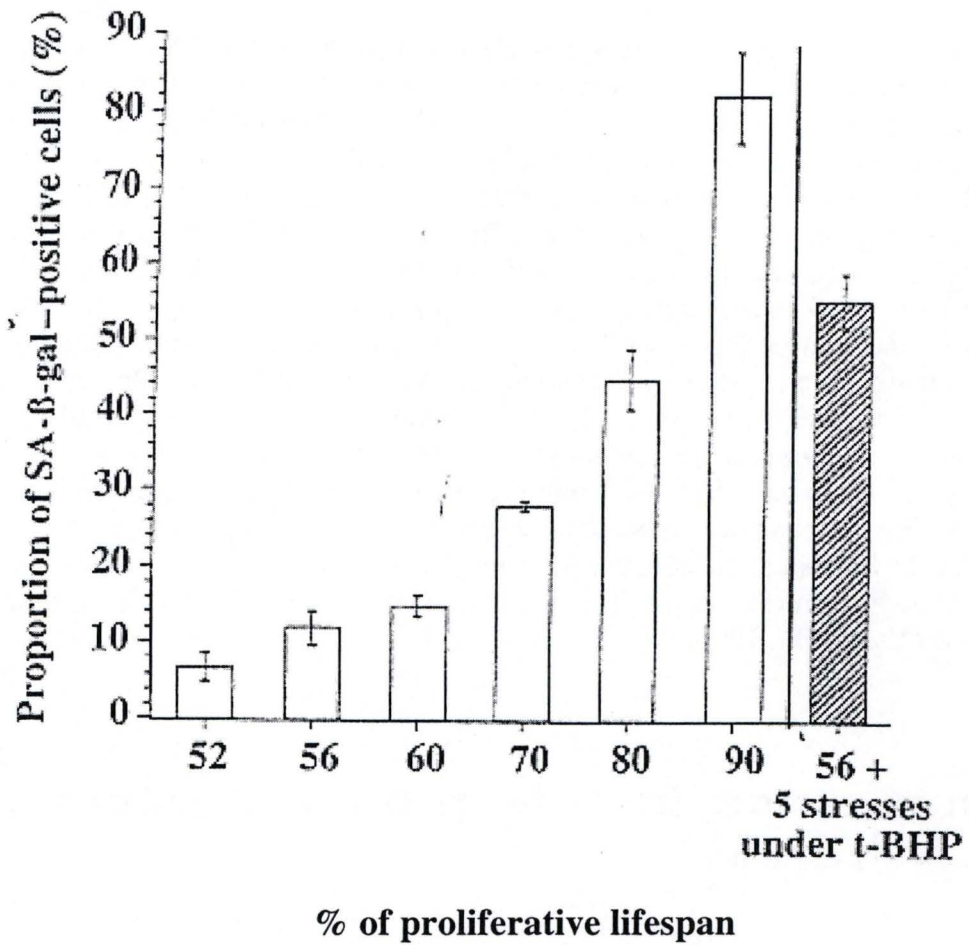


Figure A.I.7 : Effet de stress répétés au *t*-BHP sur la proportion de cellules positives pour l'activité S.A β-galactosidase. Données provenant de fibroblastes ayant atteint 52 à 90% de leur potentiel prolifératif (colonnes blanches) et de fibroblastes à 56% de leur potentiel prolifératif soumis à 5 stress d'1h sous 30 μM de *t*-BHP (colonne hachurée). Les valeurs représentées sont les proportions moyennes ± la déviation standard et ont été obtenues à partir de 4 expériences (Dumont, P. *et al.*, 2000).

La sénescence réplivative et la SIPS sont des processus apparentés présentant des divergences mais aussi des caractéristiques communes et mettent en jeu des mécanismes moléculaires communs.

Caractéristiques communes à la sénescence réplivative et à la SIPS

Les morphotypes

Au cours des passages en culture sériés et lors du vieillissement *in vivo*, les FDHs passent par sept étapes morphologiquement et biochimiquement distinctes, appelées morphotypes (Bayreuther *et al*, 1988). Plusieurs critères nous permettent de différencier ces morphotypes : la taille des cellules, leur forme ainsi que le rapport des surfaces du noyau et du cytoplasme. On peut distinguer trois groupes :

- 1°) Les morphotypes mitotiques (MFI, II, III) dont la caractéristique principale est la petite taille. On les retrouve surtout dans des cultures dites jeunes c'est-à-dire ayant un faible nombre de passages en culture. On parle de morphotypes jeunes.
- 2°) Les morphotypes post-mitotiques (PMFIV, V, VI) caractérisés par un étalement progressif de leur morphologie. On les retrouve essentiellement dans des cultures dites âgées c'est-à-dire ayant un nombre élevé de passages en culture. Ces cellules ne sont plus capables de se diviser car elles ont atteint leur nombre maximum de divisions. Cependant, elles peuvent encore rester viables sur une durée allant de plusieurs semaines à plusieurs mois pour certains types cellulaires. On parle de morphotypes âgés (**Figure A.I.4**).
- 3°) Le morphotype nécrotique (PMFVII), quand à lui, est très rarement observé, ceci étant dû à sa durée de « vie » très réduite. Ce morphotype représente la dégénérescence du PMFVI.

L'âge de la culture influence directement la proportion des différents morphotypes, ceux-ci étant exprimés en DCPs. Plus le nombre de DCPs augmente, plus la proportion des morphotypes post-mitotiques augmente aux dépens des morphotypes jeunes (**Figure A.I.5**). Ces caractéristiques morphologiques ont permis l'analyse de l'effet des stress subcytotoxiques sur des modèles cellulaires *in vitro*. A partir de cela, il fut montré par exemple qu'une culture de FDHs jeunes, ayant subi un stress avec une concentration subcytotoxique de *t*-BHP, voyait sa population de morphotypes jeunes fortement diminuée à 48 heures après le stress avec une nette augmentation des morphotypes âgés (**Figure A.I.6**). La durée et le nombre de stress ainsi que la concentration en molécules stressantes sont des facteurs essentiels dans l'évolution vers les morphotypes post-mitotiques (Toussaint *et al.*, 1992).

L'activité β -galactosidase associée à la sénescence (S.A β -gal)

Les cellules sénescents possèdent une activité β -galactosidase, que l'on abrégie par S.A β -gal pour « *Senescence Associated β -galactosidase* ». Cette activité est plus un marqueur d'arrêt de prolifération qu'un marqueur de sénescence proprement dite (Dumont *et al*, 2000).

Donneur	Age (années)	Sexe	Emplacement	Marquage SA β -Gal	
				Epiderme	Derme
Jeunes					
1	37	Féminin	Joue	+	-
2	38	Féminin	Epaule	-	-
3	37	Féminin	Nez	±	-
4	20	Féminin	Lèvre	-	-
5	39	Féminin	Lèvre	++	-
6	31	Masculin	Cuir chevelu	-	-
7	31	Féminin	Cuir chevelu	-	-
8	38	Masculin	Joue	±	-
9	33	Masculin	Nez	+	-
10	31	Masculin	Tempe	±	-
Vieux					
1	78	Féminin	Nez	+++	++
2	69	Masculin	Tempe	±	++
3	73	Féminin	Nez	++	++
4	76	Masculin	Bras	+++	+++
5	81	Féminin	Lèvre	+++	-
6	70	Féminin	Lèvre	+++	++
7	81	Masculin	Cou	+++	+++
8	73	Masculin	Tempe	+++	+++
9	75	Masculin	Cuir chevelu	++	+++
10	90	Masculin	Cuir chevelu	±	+++

Figure A.I.8: Marquages histochimiques mettant en évidence l'activité S.A β -gal réalisés sur des échantillons de peau de donneurs d'âges différents (Dimri *et al.*, 1995). Des sections (4 μ m) de peau des différents échantillons ont été marqués pour mettre en évidence l'activité S.A- β -gal et examinées au microscope optique. Au moins cinq coupes ont été examinées par donneur. Les donneurs ont été divisés en deux groupes d'âges : de 20 à 39 ans (jeunes) et de 69 à 90 ans (vieux). - : aucune cellule positive; ± : 1 cellule positive; + : 2 à 4 cellules positives; ++ : plusieurs cellules positives (derme) ou noyau de cellules positives (épiderme); +++ : cellules positives dans toutes les sections du derme, de nombreux noyaux de cellules positives dans l'épiderme.

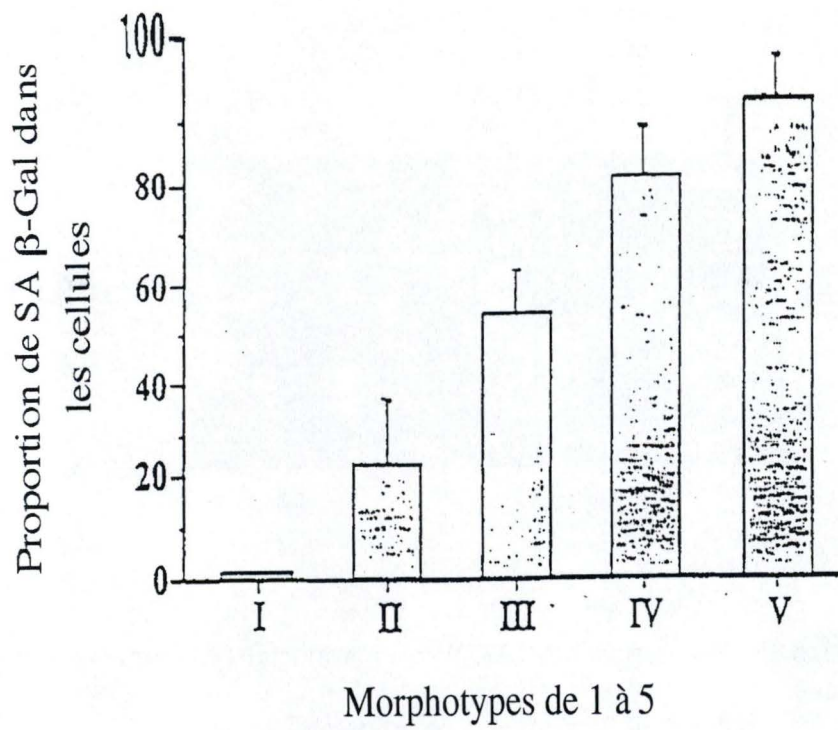


Figure A.I.9 : Proportions de fibroblastes WI-38 positifs pour l'activité S.A. β -gal pour les morphotypes de I à V (Toussaint, O. *et al.*, 2000b).

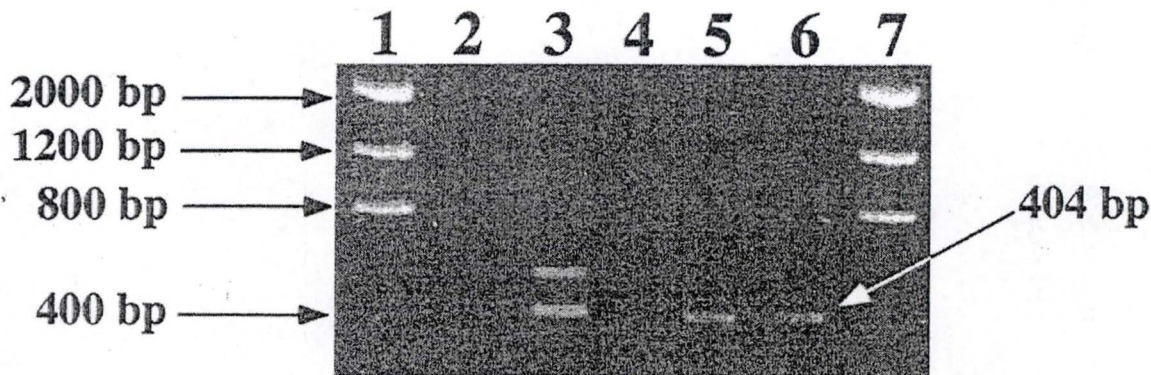


Figure A.I.10 : Détection de la délétion de l'ADN mitochondrial (ADNmt) commune de 4977 pb par PCR emboîtée.

- Puits 1 et 7 : représentent le marqueur de poids moléculaire.
- Puits 2 : ADNmt provenant de fibroblastes WI-38 à 55% de leur potentiel de prolifération.
- Puits 3 : ADNmt provenant de fibroblastes WI-38 à 55% de leur potentiel de prolifération et ayant subi 5 stress d'1h sous 30 μ M de *t*-BHP.
- Puits 4 : contrôle négatif (PCR réalisée sans ADN matrice).
- Puits 5 : ADNmt provenant de fibroblastes WI-38 à 95% de leur potentiel de prolifération.
- Puits 6 : ADNmt provenant de fibroblastes WI-38 à 95% de leur potentiel de prolifération. La présence de la délétion mitochondriale de 4977 pb donne un produit de 404 pb, indiqué par la flèche. Notons une seconde délétion apparaissant sur la piste 3 (Dumont, P. *et al.*, 2000).

Cependant, couplée avec la détection d'autres caractéristiques des cellules sénescents, la détection de la S.A. β -gal est utilisée pour la détection des cellules sénescents en culture.

Grâce au 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal), un substrat chromogène, on peut détecter l'enzyme par histochimie. En fait, ce substrat est clivé générant une molécule colorée, et résultant en une coloration bleue des cellules. Un facteur expérimental critique pour la détection de la S.A β -gal est le pH. En effet, que ce soit chez les cellules jeunes ou âgées, une activité β -galactosidase lysosomale normale est détectable à pH 4. Il faudra donc que la révélation de cette activité soit réalisée à pH 6. On suppose à l'heure actuelle que l'élargissement de la gamme de pH optimal serait dû à une augmentation de la taille des lysosomes dans les cellules sénescents, ce qui permettrait une plus grande accumulation de l'enzyme favorisant ainsi une détection de l'activité dans un gamme de pH plus étendue (Kurz *et al*, 2000).

La proportion de cellules positives pour l'activité S.A β -gal augmente au cours des passages en culture, atteignant plus de 80% de cellules positives chez les cellules sénescents.

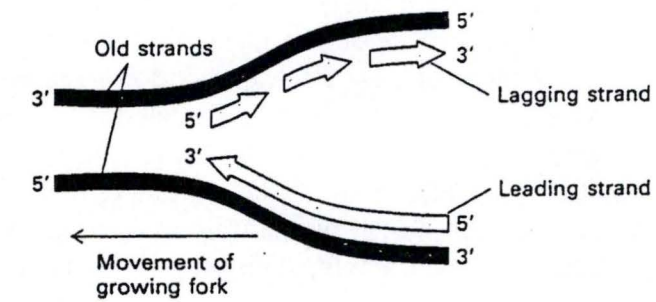
Une forte augmentation de la proportion de cellules positives pour l'activité S.A β -gal est également observée dans les cellules à 72 heures après cinq stress répétés au *t*-BHP. Celle-ci est comparable à celle observée aux environs de 85% de la durée de vie répliquative (Dumont *et al*, 2000) (**Figure A.I.7**). Une mise en évidence de l'activité S.A β -gal par des marquages histochimiques sur des échantillons de peau de donneurs humains d'âges différents montre une augmentation de la proportion de cellules présentant cette activité, parallèlement, à une augmentation de l'âge du donneur (Dimri *et al.*, 1995) (**Figure A.I.8**). Il existe de surcroît une corrélation entre les différents morphotypes et l'activité S.A β -gal. L'augmentation de l'activité est intimement liée à une transition vers des morphotypes correspondant à des cellules plus âgées (Toussaint *et al.*, 2000 b) (**Figure A.I.9**).

Apparition de délétions dans l'ADN mitochondrial

Les mitochondries disposent de leur propre génome, d'une longueur de 16,5 kb. Certains de leurs gènes codent pour des protéines mitochondriales indispensables à la production de l'ATP. Il est à noter que des délétions, ainsi que des mutations ponctuelles apparaissent dans le génome mitochondrial au cours du vieillissement. Dans les cellules sénescents et dans les cellules jeunes en SIPS suite à un stress subcytotoxique, on constate une délétion la plus commune, d'une taille de 4.977 pb (Dumont *et al.*, 2000) (**Figure A.I.10**). La fréquence de délétion dans l'ADN mitochondrial (ADNmt) est aussi plus élevée dans les échantillons de peau provenant de zones exposées au soleil que dans les échantillons provenant de zones non exposées. Il a été constaté que, dans les tissus très actifs, les délétions dans l'ADNmt s'accumulent avec pour conséquence une consommation accrue d'oxygène et une production plus importante de radicaux libres (Ozawa *et al.*, 1991).

Le raccourcissement des télomères

Les télomères constituent les extrémités des chromosomes. Ils se caractérisent par la répétition d'une séquence consensus (TTAGGG chez les mammifères) un très grand nombre



Lagging-strand synthesis

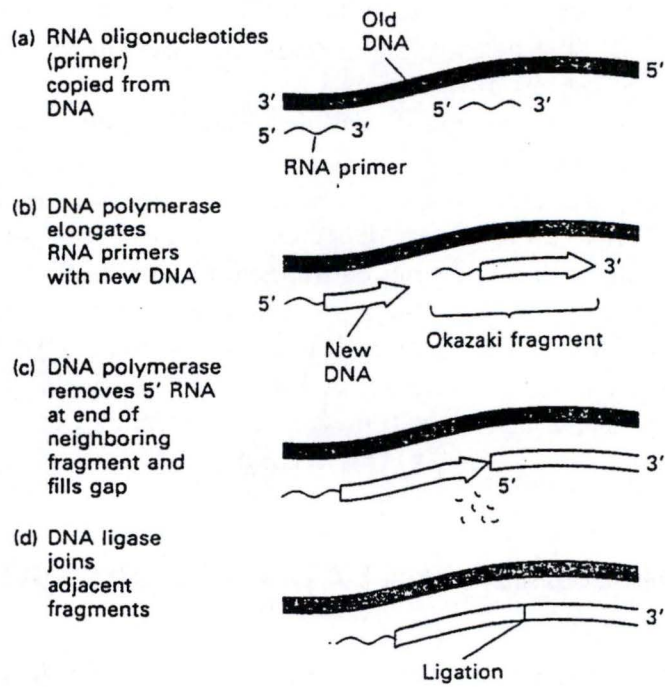


Figure A.I.11: Schéma de la réplication de l'ADN par l'ADN polymérase (Lodish *et al.*, 1995).

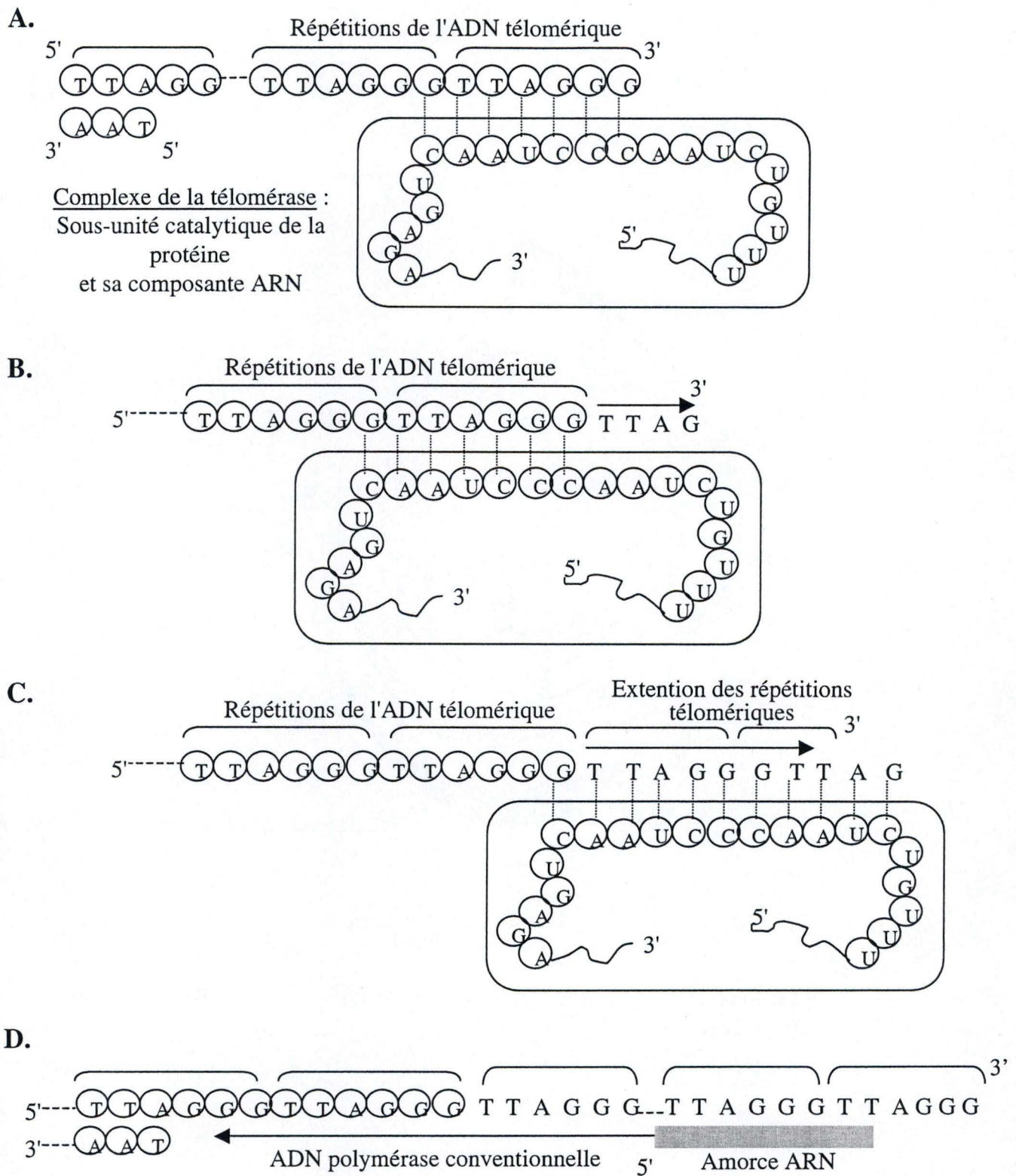


Figure A.I.12 : Modèle d'élongation des extrémités chromosomiques par la télomérase (D'après Urquidi *et al.*, 2000). (A) La télomérase s'hybride au télomère via l'extrémité 3' de son ARN au niveau de la structure simple-brin la plus distale. (B) La télomérase catalyse l'extension du brin télomérique riche en G sur toute la longueur de sa molécule d'ARN. (C) L'enzyme se déplace vers l'extrémité et catalyse une nouvelle élongation. Ce processus se répète plusieurs fois résultant en une élongation dans le sens 5' vers 3'. (D) Le brin complémentaire (riche en C) est synthétisé par extension d'une amorce ARN par une ADN polymérase conventionnelle.

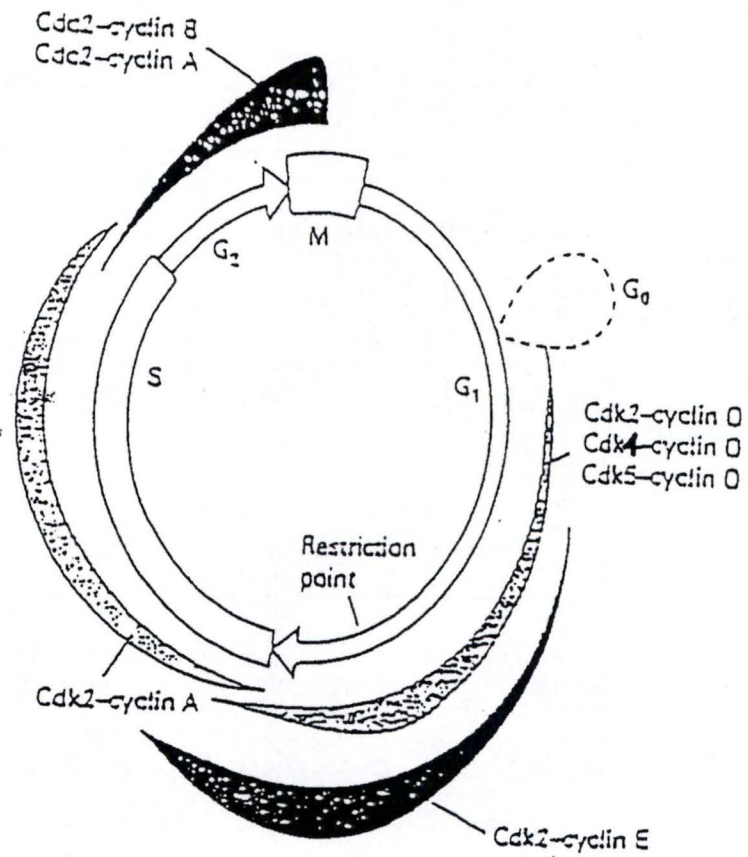


Figure A.I.13: Représentation schématique de l'intervention des différents complexes cycline / CDKs au cours du cycle cellulaire.

de fois (Meyne *et al.*, 1989). Ces répétitions forment une structure tridimensionnelle avec laquelle de nombreuses protéines interagissent ; on parle de télosome.

Les télomères sont essentiels pour la stabilité chromosomique. Ils empêchent la dégradation des extrémités chromosomiques, leur fusion, ainsi que la recombinaison d'éléments télomériques très courts, qui, après la mitose, aurait pour effet de générer des cassures simples ou doubles dans l'ADN, reconnues comme dommages.

Le modèle semi-conservatif de réplication de l'ADN et de la capacité de l'ADN polymérase de ne synthétiser que dans le sens 5' en 3' de l'ADN en présence d'une amorce d'ARN explique ce phénomène de raccourcissement, appelé « problème de réplication terminale ». En effet, durant la réplication de l'ADN, un des deux brins est répliqué de façon continue de 5' en 3', tandis que l'autre est synthétisé sous forme de fragments discontinus, appelés fragments d'Okazaki, nécessitant à chaque fois une nouvelle amorce. La synthèse étant terminée, toutes les amorces sont enlevées et les « trous » laissés sont comblés, sauf à l'extrémité 5'. Le brin discontinu est, de ce fait, plus court de quelques paires de bases que sa matrice: on obtient une extrémité 3' protrudante. C'est ce mécanisme qui serait à l'origine du raccourcissement télomérique (Hastie *et al.*, 1990) (**Figure A.I.11**).

Les télomères se raccourcissent à raison de 50 pb par division cellulaire (Harley *et al.*, 1990). Il est, à l'heure actuelle, indiscutable que ce raccourcissement au fil des passages en culture constitue un des mécanismes universels expliquant la limite de prolifération des cellules somatiques et l'entrée de ces cellules en sénescence répllicative (Harley *et al.*, 1990).

Les raccourcissements télomériques peuvent être perçus comme des dommages à l'ADN, ce qui entraînerait l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₁ par des mécanismes moléculaires qui seront détaillés au cours du paragraphe suivant.

Le raccourcissement télomérique a aussi été démontré *in vivo* : à la naissance, la longueur des télomères est de 10 à 15 kb chez les fibroblastes humains, puis elle diminue progressivement (Hastie *et al.*, 1990); (Allsopp *et al.*, 1992). Lorsque l'on examine des cellules de donneurs d'âges différents, on observe que plus l'âge augmente, plus les télomères sont courts. Le raccourcissement est d'environ 10-20 pb / an (Allsopp *et al.*, 1992).

Les fibroblastes en SIPS induite par le *t*-BHP ou l'H₂O₂ démontrent un raccourcissement modéré de leurs télomères (Dumont *et al.*, 2001).

Les cellules germinales ou immortelles (cellules cancéreuses) ne subissent pas ce phénomène de raccourcissement des télomères car elles possèdent une enzyme, la télomérase, capable d'ajouter des séquences TTAGGG à partir d'une matrice d'ARN apportée par l'enzyme (Greider *et al.*, 1996). La télomérase est une ribonucléoprotéine contenant un ARN d'environ 9 à 30 bp complémentaire de l'ADN télomérique (**Figure A.I.12**). Des expériences sur des fibroblastes humains normaux ont montré qu'il était possible de restaurer l'activité télomérase de ces cellules en les transfectant de manière stable avec un vecteur permettant l'expression de l'ADNc codant pour la sous-unité catalytique de l'enzyme. Dans ce cas, la durée de vie de ces cellules semble infinie, en tout cas à ce jour, la longueur des télomères des cellules à l'état jeune est maintenue (Bodnar *et al.*, 1998).

Régulation du cycle cellulaire

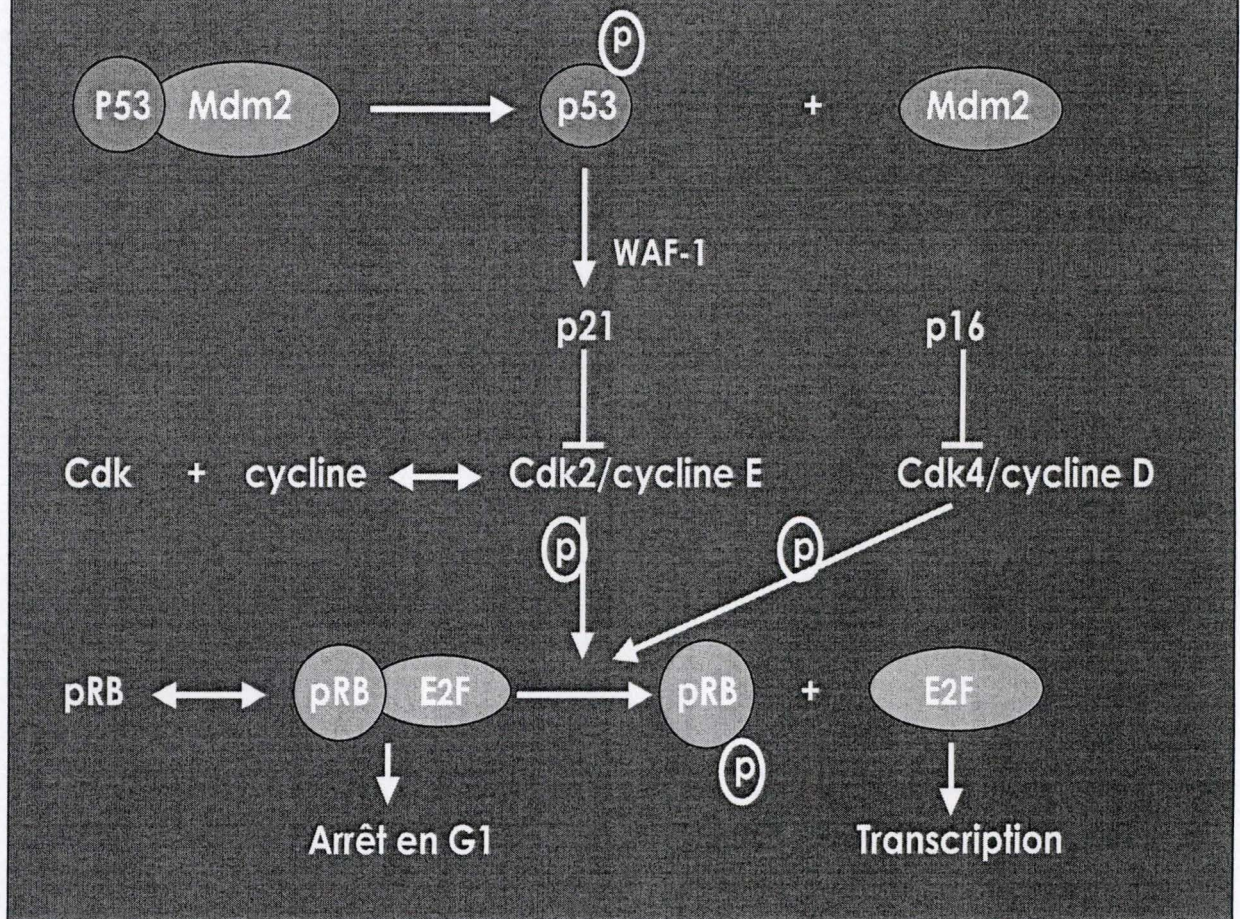


Figure A.I.14 : Transduction du signal aboutissant à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1

Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est composé de quatre étapes successives : G1, S, G2 et M. La progression du cycle est étroitement régulée par une série de protéines appartenant à la famille des sérine-thréonine kinases, les kinases dépendantes des cyclines (CDK) (**Figure A.I.13**). L'activation de ces kinases nécessite une association à une sous-unité régulatrice ou cycline. Différents complexes cycline-CDK sont exprimés et activés au cours des diverses phases du cycle.

A la fin de la phase G1 se trouve le point de restriction. Ce moment est déterminant dans la poursuite ou non du cycle jusqu'en phase S, où l'ADN va être dupliqué. Si ce point de non retour est franchi, la cellule ne répond plus aux signaux inhibiteurs et n'a pas besoin d'éléments stimulateurs pour rentrer en phase de division cellulaire (M).

Tout comme les cellules sénescents, les cellules en sénescence prématurée induite par les stress sont incapables d'entrer en phase S. Leur cycle est bloqué en phase G1 suite à différentes modifications qui apparaissent tout au long de cette étape. Suite à un stress avec H₂O₂ appliqué sur des FDHs IMR-90, la protéine p38 MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) est phosphorylée suite à l'activation et la phosphorylation de MKK6, une protéine activatrice de p38 MAPK. L'activation de cette famille de protéine est modulée par des facteurs de croissance ou des stress, et dépend du type cellulaire. Notons également que le TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor 1*) peut aussi être responsable de l'activation de la protéine p38 MAPK. Une fois la protéine p38 MAPK phosphorylée, elle pénètre dans le noyau où elle phosphoryle et active le facteur de transcription ATF2, le rendant actif (Hanafusa *et al.*, 1999). Celui-ci reconnaît le promoteur du gène codant pour le TGF- β 1, et augmente son niveau de transcription. Une deuxième vague d'activation de la protéine p38 MAPK par le TGF- β 1 via son récepteur, va induire l'apparition des caractéristiques de la SIPS telles que la morphologie sénescents, la S.A. β -gal ou encore la surexpression de certains gènes tels que l'apolipoprotéine J, l'ostéonectine, etc (Fripiat *et al.*, 2002 ; Dierick *et al.*, 2003).

En parallèle, les stress avec H₂O₂ provoquent des dommages à l'ADN avec comme conséquence l'activation de la protéine p53. Cette protéine joue à la fois le rôle de suppresseur de tumeur et un rôle de facteur de transcription. En conditions normales, MDM2 (Mouse Double Minute 2) dont la synthèse est induite en phase G1, se lie à p53 ce qui provoque son exportation vers le cytoplasme où il est dégradé par le protéasome (Ryan *et al.*, 2001). En condition de stress, MDM2 n'est plus induit et la forme libre de p53 se fixe sur le promoteur du gène codant pour p21^{waf1}, un inhibiteur de kinase dépendant des cyclines, et induit l'expression de p21^{waf1}. Cette dernière se lie aux complexes CDK2/cycline E, CDK4/cycline D et CDK8/cycline D, et inhibe leur activité kinasique. Il en résulte une hypophosphorylation du substrat du complexe CDK2/cycline E, c'est-à-dire la protéine Rb avec comme conséquence une inhibition du facteur de transcription E2F. Dès lors, l'induction des gènes impliqués dans la transition vers la phase S n'étant plus possible, la progression du cycle cellulaire est arrêtée en phase G1 (**Figure A.I.14**).

Spot #	Identification	DB #	MW	pI	Sen	t-BHP	EtOH	Function
N 101	pyruvate kinase M	P14618	58	7.6	1.5	1.7	1.4	energy
I 818	l-Cys peroxiredoxin	P30041	25	6.3	0.5	1.4	1.6	stress
I 709	14-3-3 protein tau	P27348	28	4.7		3.8	2.4	cycle
I 1086	14-3-3 protein tau	P27348	28	4.7		7.6	3.6	cycle
I 667	actin isoform (between 30 and 35 kDa)	P53493	42	5.3		1.7	2.5	struct.
I 684	HSP27	P04792	24	7.8	1.3			stress
N 472	electron transfert flavoprotein beta-subunit	P38117	28	8.2	1.5			energy
I 660	chloride intracellular channel protein 1	O00299	27	4.9	1.5			
I 734	BAG-family molecular chaperone regulator	O95816	24	6.2	1.6			stress
N 389	alpha-actinin isoform (around 20 kDa)	P12814	103	5.2	1.7			struct.
I 727	l-Cys peroxiredoxin	P30041	25	6.3	1.8			stress
N 628	lamin C	P02546	65	6.8	1.9			struct.
I 539	alcohol dehydrogenase	P14550	36	6.3	2.0			energy
I 815	creatin kinase BC	P12277	43	5.4	2.0			energy
I 500	creatin kinase BC	P12277	43	5.4	2.0			energy
N 208	alpha-enolase	P06733	47	7.4	2.0			energy
N 587	alpha-enolase	P06733	47	7.4	5.5			energy
I 626	annexin 1	P04083	39	6.6	0.5			
I 256	lamin C	P02546	65	6.8	0.6			struct.
I 342	glucose-6-phosphate-1-dehydrogenase	P11413	59	6.4	0.6			energy
I 412	actin	P53493	42	5.3	0.6			struct.
N 464	NADH-cytochrome B5 reductase	P00387	34	7.6	0.6			energy
N 623	calmodulin binding protein	O88482	67	11.3	0.6			
I 717	l-Cys peroxiredoxin	P30041	25	6.3			1.5	stress
N 102	pyruvate kinase M	P14618	58	7.6			1.5	energy
I 610	esterase D	P10768	31	7.0			1.4	energy
I 689	guanidinoacetate N methyltransferase	Q14353	26	5.7			1.3	
I 1025	HSP90	P08238	83	4.8			0.6	stress
I 913	HSP90	P08238	83	4.8			0.7	stress
I 46	glucosidase II precursor	Q14679	107	6.0			1.7	energy

Figure A.II.1: Tableau reprenant trente protéines dont le niveau d'expression varie en sénescence répliquative ou en SIPS (Dierick *et al.*, 2002)

II) Etude protéomique et transcriptomique des fibroblastes humains WI-38 en SIPS et en sénescence réplivative

Afin d'identifier sans *a priori* des gènes connaissant des changements du niveau d'expression lorsque les fibroblastes humains WI-38 sont soumis à des stress cytotoxiques répétés et acquièrent les caractéristiques de la cellule sénescence, une étude comparative de leur transcriptome a été entreprise au sein de notre laboratoire. Le profil d'expression des cellules WI-38 en SIPS induite par des stress répétés au *t*-BHP, à l'éthanol ou à l' H_2O_2 a ainsi été étudié et comparé au profil des cellules contrôles ou de cellules sénescences.

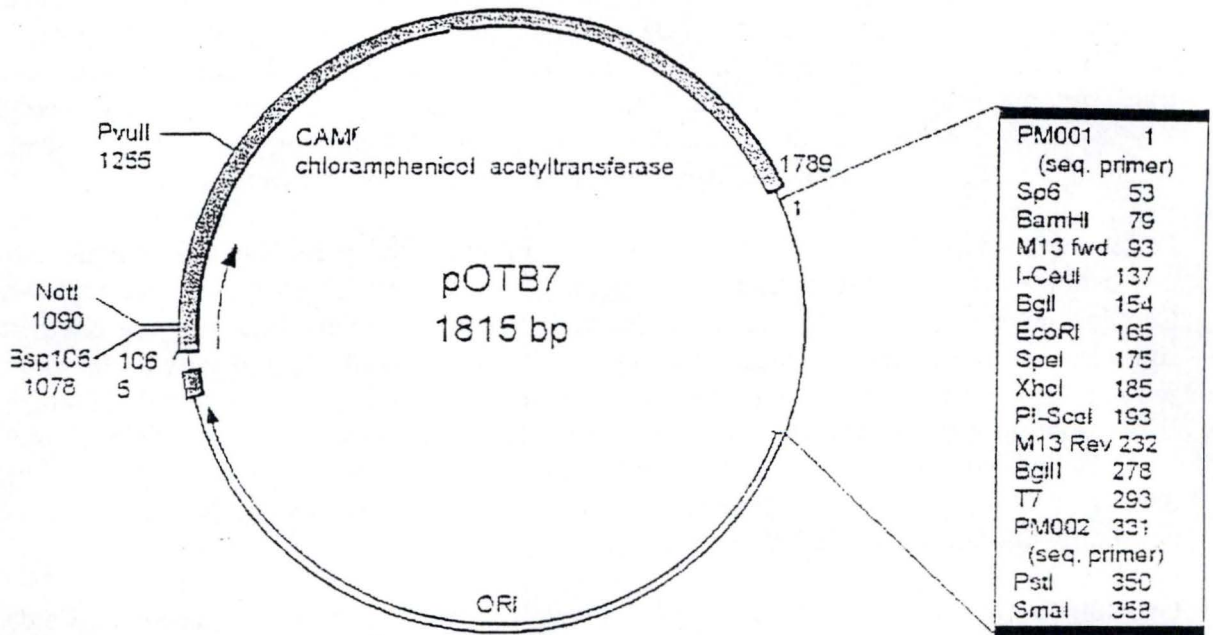
La technique du *differential display* a tout d'abord été privilégiée. Elle a permis de dresser une liste de gènes dont le niveau d'expression varie en SIPS ou en sénescence réplivative. Certains gènes sont particulièrement intéressants dans une problématique de vieillissement et sont par exemple impliqués dans la réponse à l'insuline (*insulin-like growth factor binding protein-3*, récepteur à l'IGF2) ou encore dans le stockage du fer (chaîne légère de la ferritine). Il faut toutefois rester prudent face à ces résultats, qui doivent maintenant faire l'objet de confirmation par RT-PCR semi-quantitative ou par l'utilisation d'un damier à ADNc à basse densité où sont représentés les gènes pour lesquels le *differential display* permet de suspecter une expression différentielle (travaux de T. Pascal).

Une autre approche a été réalisée en 2002, à savoir l'étude du profil d'expression à l'aide de damier à ADNc à basse densité où étaient représentés 400 gènes d'intérêt dans notre problématique. Cette étude nous a permis d'identifier environ 100 gènes surexprimés ou sous exprimés dans les cellules sénescences ou en SIPS (H_2O_2 , *t*-BHP) (non publié).

Parmi ces gènes, soulignons une forte répression des gènes codant pour la protéine adaptatrice p66 SHC impliquée dans la transduction de signaux mitogènes et l'apoptose induite par les stress, la c-Jun N-terminal kinase faisant partie de la famille des *mitogen activated protein kinase* (MAPK) et intervenant notamment dans la réponse aux stress, mais aussi une surexpression des gènes codant pour l' α -synucléine, dont le rôle dans des pathologies neurodégénératives est bien connu (Pour une revue, Manning-Bog *et al.*, 2003), pour le récepteur à l'IGF-1 ou encore des inhibiteurs du cycle cellulaire (par exemple : les CDKI, p16^{INK}, et p21^{Waf-1}).

Une étude du protéome de FDHs WI-38 en SIPS et en sénescence réplivative a également été réalisée au laboratoire (Dierick *et al.*, 2002). Cette approche permet d'identifier sans *a priori* des différences de quantité de protéines. La combinaison de la technique de séparation sur gel d'électrophorèse à deux dimensions et des techniques d'identification de protéines par spectrométrie de masse, nous a permis d'identifier trente protéines dont le niveau d'expression varie en SIPS ou en sénescence réplivative par rapport aux contrôles. Ces protéines sont impliquées dans différentes fonctions cellulaires telles que le métabolisme énergétique, les systèmes de défense, le maintien du potentiel d'oxydoréduction, la morphologie cellulaire ainsi que des voies de transduction du signal (Dierick *et al.*, 2002) (Figure A.II.1).

pOTB7 Vector



AttB1

ACTCGAAGGATCCACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGTAAAAACGACG
 AGTGCTTCCTAGGTGTTCAAACATGTTTTTTCGTCCGAACATTTTGCTGC

AttB2

TGAAATGGCACATGGTCATAGCTGTTTCCTGACCCAGCTTTCTTGTAACA
 ACTTTACCGTGTACCAGTATCGACAAAAGGACTGGGTTCGAAAGAACATGTT

AGTGGTAGATCTGC
 TCACCATCTAGACG

Figure III.1 a : Carte de restriction et du site multiple de clonage du vecteur pOTB7 (BDGP Resources, Berkeley, USA)

La pyruvate kinase, surexprimée en sénescence répliquative et en SIPS, est une enzyme clé de la glycolyse. Elle catalyse la synthèse de pyruvate à partir de phosphoénolpyruvate avec libération d'ATP. Une augmentation de la quantité de pyruvate kinase dans les cellules sénescences pourrait expliquer la plus forte activité glycolytique et la surproduction d'acide lactique observée dans ces cellules. Une plus forte activité glycolytique pourrait s'opposer, du moins partiellement, à la diminution des capacités de la cellule à régénérer l'ATP, suite aux dommages à l'ADNmt et aux membranes mitochondriales. Il a toutefois été montré au laboratoire que la surexpression de la pyruvate kinase ne permet pas de protéger des fibroblastes WI-38 immortalisés par l'antigène T du virus SV40 (WI-38 SV40) contre des stress de nature cytotoxiques au *t*-BHP, à l'H₂O₂ ou à l'éthanol (non publié).

La peroxyredoxine VI (PRX VI) est également surexprimée par les FDHs en SIPS induite par l'éthanol et le *t*-BHP. Elle est par contre sous-exprimée dans les cellules sénescences. La Prx VI, également appelée « *Antioxidant Protein-2* » (AOP-2) ou 1-cys peroxyredoxine, possède une activité glutathion peroxydase (GPx) qui lui permet de réduire l'H₂O₂ et les hydroperoxydes organiques en eau ou en alcool respectivement (Wood *et al.*, 2003). L'enzyme présente également une activité phospholipase A₂ (PLA₂) à pH acide (observé dans les lysosomes), ce qui lui permettrait de participer à la fois à la réparation et à l'élimination des phospholipides membranaires peroxydés. La surexpression par transfection stable du cDNA de la Prx VI sous le contrôle d'un promoteur CMV dans des fibroblastes WI-38 SV40 protège ces cellules contre des stress cytotoxiques au *t*-BHP et à l'H₂O₂ (Salmon *et al.*, en préparation). Il a également été démontré que l'activité PLA₂ n'est pas essentielle pour conférer une protection contre le *t*-BHP. Il semblerait même qu'à forte dose d'agent stressant, l'activité PLA₂ diminue l'effet protecteur conféré par la surexpression de l'enzyme. En effet, un mutant de la Prx VI ayant perdu son activité PLA₂ se montre plus efficace pour protéger les cellules que l'enzyme bifonctionnelle. Cet effet pourrait être dû à l'accumulation de produits de dégradation des lipides peroxydés entraînant la mise en route de mécanismes pro-apoptotiques. La surexpression de la Prx VI dans des fibroblastes WI-38 ne permet pas de conférer une protection contre l'apparition des caractéristiques de la SIPS (Salmon *et al.*, en préparation).

D'autres protéines ont montré des différences de niveau d'expression dans les fibroblastes WI-38 en SIPS ou en sénescence répliquative. Il s'agit par exemple de l'isoforme θ de la protéine 14.3.3, ou encore de la protéine chaperone *Heat Shock Protein 27* (Hsp27). Il est connu qu'une augmentation de l'expression de la protéine Hsp27 confère une meilleure résistance des cellules L929 suite à des stimulations au TNF α ou des stress avec l'H₂O₂, et ce par l'augmentation de la concentration intracellulaire de glutathion (Mehlen *et al.*, 1996). Il a aussi été montré que Hsp27 inhibe l'apoptose suite à des stress infligés à des cellules humaines U937 en empêchant le passage de cytochrome C de la mitochondrie vers le cytoplasme et en inhibant le clivage et l'activation de la procaspase 9 (Garrido *et al.*, 1999). En accord avec ces observations, nous avons montré que la surexpression de la protéine Hsp27 dans des cellules WI-38 SV40 protège les cellules contre un stress au *t*-BHP, mais pas à l'H₂O₂, à l'éthanol ou aux UVB. Aucune protection n'a par contre été observée en surexprimant la forme humaine de la protéine Hsp27 dans un modèle de fibroblastes murins NIH3T3.

Le projet dans lequel s'insère le présent travail s'inscrit dans la continuité de ces travaux et vise à étudier la signification fonctionnelle des variations d'expression de trois gènes d'intérêt,

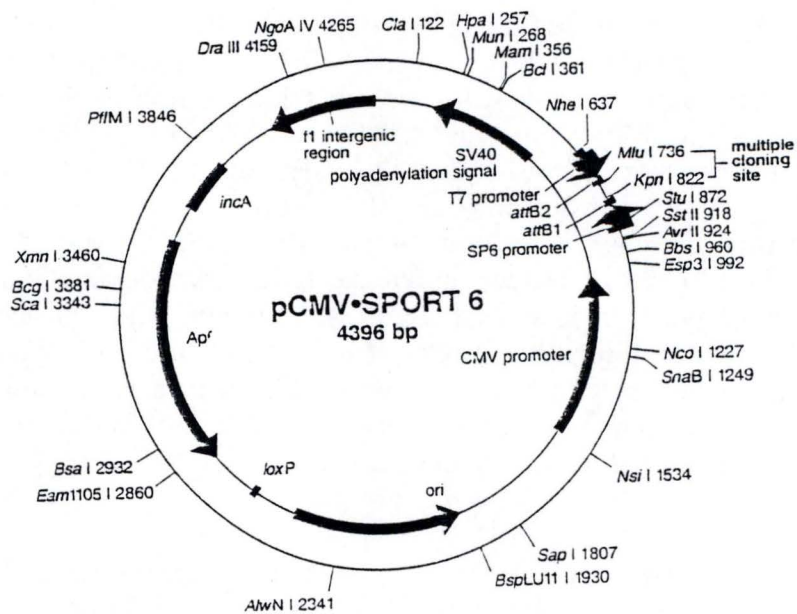


Figure III.1 b : Carte de restriction du vecteur de clonage pCMV/SPORT6 (Invitrogen, Carlsbad, USA)

à savoir la chaîne légère de ferritine, l' α -synucléine et la protéine adaptatrice p66 SHC, étudiés dans le cadre du projet européen « FUNCTIONAGE ».

III) Mise en place d'outils moléculaires pour l'analyse fonctionnelle des gènes impliqués dans la résistance aux stress et à la SIPS

Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre précédent, l'étude du transcriptome et du protéome des cellules en SIPS ou en sénescence répliquative a généré de nombreuses données sous forme de noms de gènes et de protéines montrant des variations du niveau d'expression.

Afin d'exploiter ces données, il est primordial d'établir des lignées stables surexprimant ou n'exprimant plus ces gènes, et d'analyser la réponse aux stress de ces cellules. Cela nous permettra de définir la raison pour laquelle l'expression de ces gènes varie en SIPS et de mettre en évidence des effets de protection face aux stress. Par la suite, les gènes conférant une résistance aux stress seront étudiés dans des organismes modèles (*S. cerevisiae*, *C. elegans*, souris) sur le plan de la longévité de ces organismes et de leur résistance aux stress.

La surexpression d'une liste conséquente de gènes suppose toutefois leur clonage moléculaire dans des vecteurs d'expression, la transfection de ceux-ci dans des lignées cellulaires et leur analyse fonctionnelle. Afin de rendre cette démarche possible, nous avons pris l'option de mettre en place des outils nous permettant de réaliser ces différentes étapes de façon rapide et efficace.

Notre démarche combine la technologie de clonage Gateway, la transfection de lignées cellulaires Flp-In et l'analyse fonctionnelle en terme de protection contre la SIPS des gènes d'intérêt dans une lignée de fibroblastes humains WI-38 immortalisés par l'expression stable de la sous-unité catalytique de la télomérase (h-TERT). Ces différents outils sont décrits ci-dessous, ainsi que leur intégration dans notre démarche expérimentale.

La technique de clonage Gateway

La technologie de clonage Gateway est basée sur le système d'intégration du phage lambda au sein du génome de la bactérie hôte. Une réaction de recombinaison site spécifique entre les sites AttP du phage et les sites AttB dans le génome bactérien permet l'insertion du bactériophage dans le chromosome de la bactérie hôte. Ces propriétés ont été mises à profit par la société Invitrogen pour développer la technologie Gateway qui permet le clonage de fragments d'ADN par recombinaison *in vitro*. L'ADN à cloner étant le plus souvent bordé par des sites AttB présents dans de nombreux vecteurs de clonage (pOTB7, pCMV/SPORT6, **Figure A.III.1**), une première réaction de recombinaison, appelée réaction BP, est réalisée afin de générer des sites de recombinaison AttL et de créer un clone d'entrée. Alternativement, des sites AttB peuvent être ajoutés de part et d'autre du fragment d'intérêt par PCR. Les sites AttL permettent le transfert du fragment d'intérêt par réaction LR dans

GATEWAY CLONING TECHNOLOGY

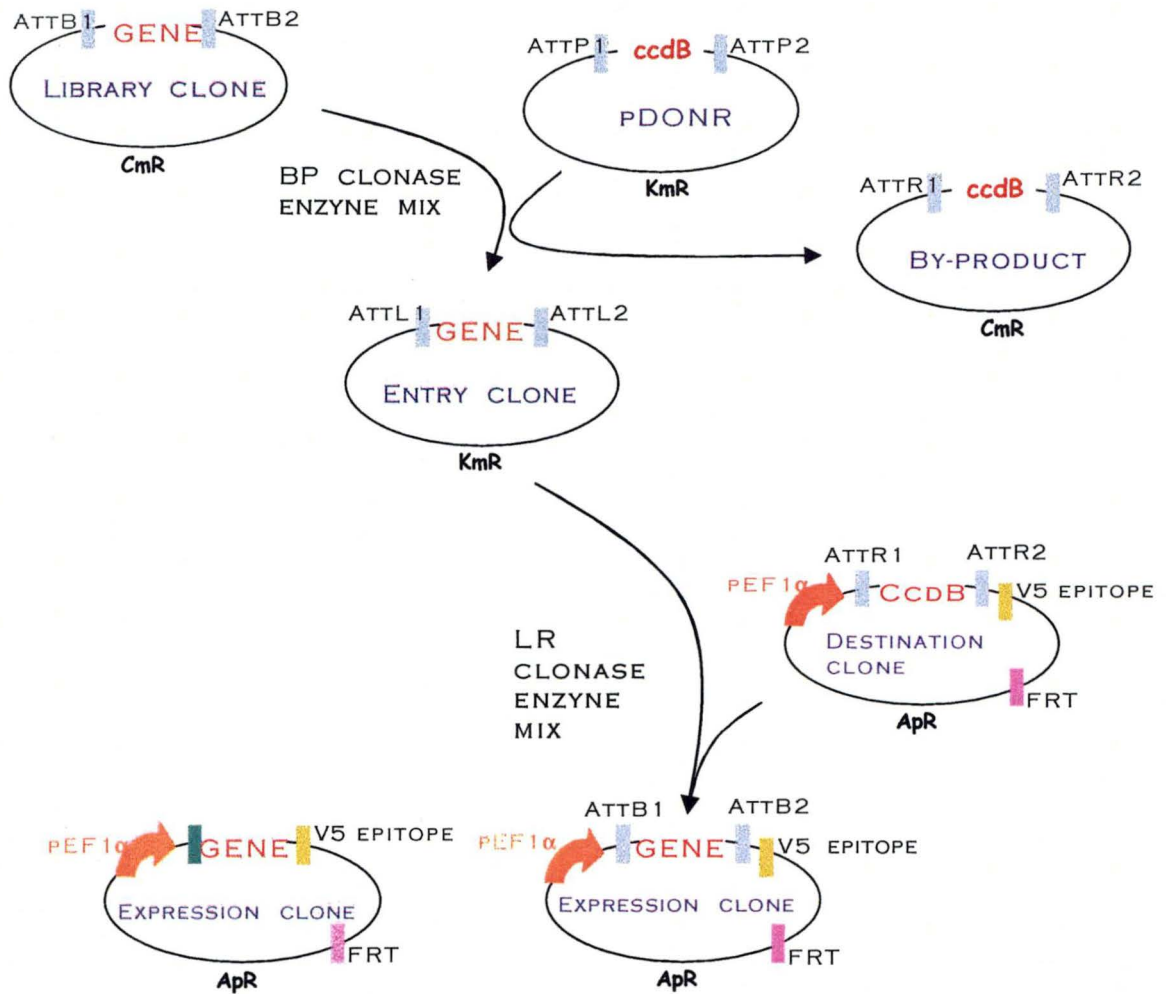


Figure A.III.2 : Schéma des réactions de recombinaison BP et LR effectuées pour construire respectivement un vecteur d'entrée et un plasmide d'expression par recombinaison *in vitro*

plusieurs types de vecteurs contenant les sites AttR et obtenir par exemple l'expression en lignées cellulaires, en cellules d'insectes, levures ou bactéries.

Les réactions BP et LR sont médiées par des enzymes spécifiques. Ainsi, pratiquement, la "BP clonase" médie la réaction de clonage BP et contient la protéine de recombinaison Int (Intégrase) et la protéine IHF (Integration Host factor). Les sites de recombinaison AttB (clone d'expression) et AttP (vecteur donneur) du phage λ ont été modifiés afin de leur conférer de nouvelles propriétés permettant le clonage non réversible de fragments d'ADN. Des mutations ont été réalisées dans les régions centrales des sites Att pour éliminer les codons stop et pour assurer la spécificité des réactions de recombinaison dans le but de maintenir l'orientation et de la phase lecture de la séquence d'intérêt.

La réaction de clonage BP consiste en fait en une simple réaction de recombinaison entre les sites AttB du vecteur initial bordant le fragment d'ADN à cloner et les sites AttP d'un vecteur appelé vecteur donneur, bordant le gène bactérien codant pour la protéine CcdB, un poison des complexes ADN-gyrase agissant à la manière des quinolones, et dont l'effet peut être neutralisé par la protéine antidote CcdA. Il résulte de la réaction BP un transfert de la séquence se trouvant entre les sites de recombinaison, générant ainsi un clone d'entrée contenant le fragment d'intérêt ainsi qu'un sous-produit contenant le gène *ccdB*. Ce produit réactionnel est ensuite transformé dans des bactéries *E. coli* CcdA⁻ (c'est-à-dire ne contenant pas le gène codant pour l'antidote CcdA). Une sélection à la kanamycine permet d'isoler les clones ayant intégré le plasmide d'entrée. Le sous-produit de réaction ne contient pas le gène de résistance à la kanamycine et possède le gène *ccdB*. Ce dernier provoque la mort des bactéries ayant intégré ce plasmide. La réaction de clonage BP permet donc un clonage rapide et directionnel du gène d'intérêt.

La réaction de clonage LR à partir de vecteurs de destination est quant à elle utilisée pour créer des vecteurs permettant l'expression dans des systèmes variés (plasmide d'expression). La "LR Clonase" catalysant la réaction LR contient des protéines de recombinaison du phage λ telles que Int, Xis (excisionase) et IHF (Integration Host Factor). Tout comme les sites AttB et AttP, les sites de recombinaison AttL et AttR ont également été modifiés pour les adapter aux exigences du système. Une fois la réaction de recombinaison *in vitro* effectuée, la transformation de bactéries CcdA⁻ est réalisée. Les vecteurs de destination possédant le gène de la β -lactamase, une sélection selon le même principe que pour la réaction de clonage BP est réalisée en présence d'ampicilline (**Figure A.III.2 et 3**).

Pour plus d'informations sur le système Gateway et sur les différents vecteurs disponibles, il est conseillé de se référer au manuel d'utilisation disponible à l'adresse suivante : www.invitrogen.com

Dans notre cas, les cDNA correspondants aux gènes d'intérêt que nous souhaitons surexprimer en lignée cellulaire eucaryote, proviennent du consortium IMAGE et sont disponibles auprès de sociétés commerciales (RZPD Resource Centre / Primary Database www.RZPD.de, ResGen Invitrogen Corporation www.resgen.com). Un code d'accès permet d'identifier les différents clones disponibles. Pour chaque cDNA d'intérêt, notre choix se porte en priorité sur des clones entièrement séquencés, insérés dans un vecteur de clonage de part et d'autre de sites de recombinaison AttB (pOTB7, pCMV-SPORT, etc). Le choix de ces vecteurs nous permet de construire des clones d'entrée par simple réaction de recombinaison BP. Les plasmides d'expression sont ensuite obtenus par recombinaison LR entre les vecteurs d'entrée et les vecteurs de destination (pcDNA/DEST 40, pEF5/FRT/V5-DEST).

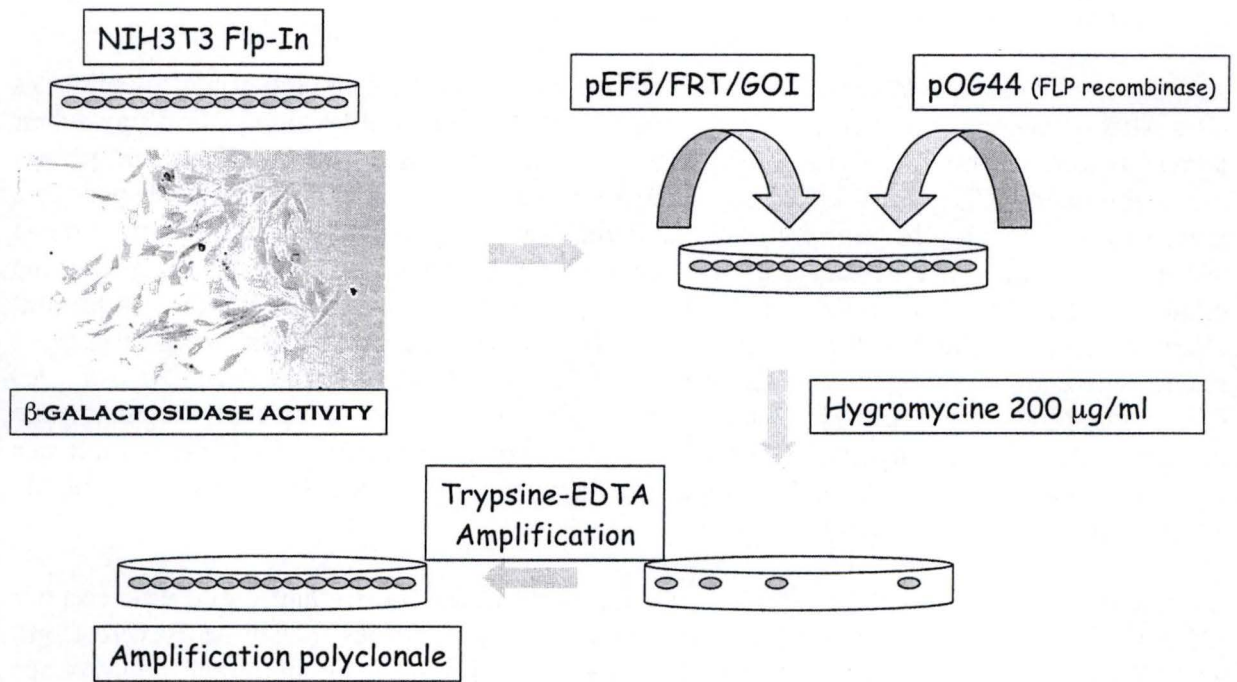


Figure A.III.3 : Protocole de transfection d'une lignée Flp-In par un plasmide d'expression

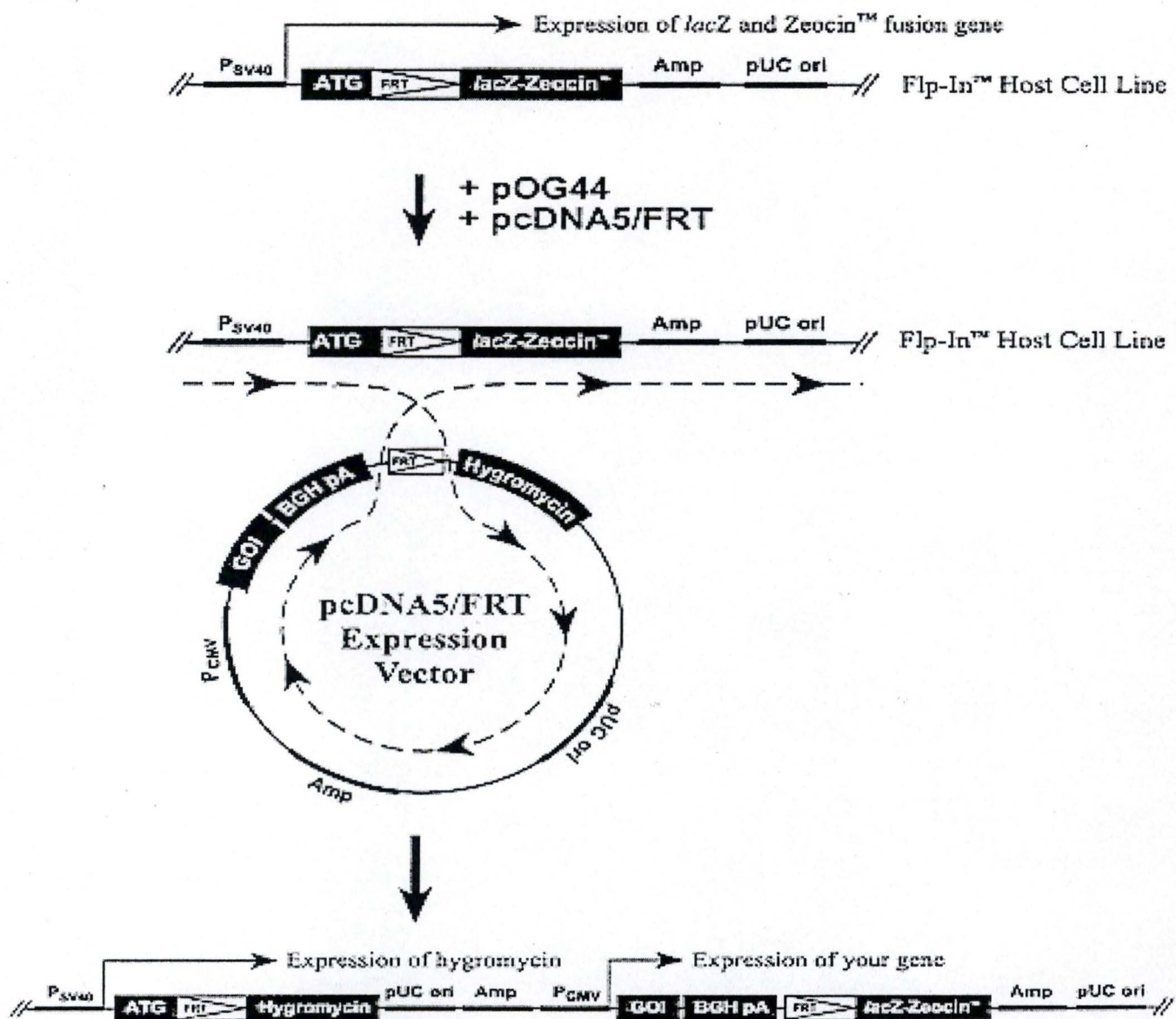


Figure A.III.4 : Intégration ciblée du vecteur d'expression au site FRT médiée par la FLP recombinase (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Transfections de lignées Flp-In et intégration ciblée du transgène par recombinaison site-spécifique.

Le système Flp-In élaboré et produit par la société Invitrogen permet l'intégration et l'expression du gène d'intérêt dans des cellules de mammifères à une localisation génomique spécifique. Le système Flp-In implique l'introduction d'un site FRT (*Flp Recombination Target*) dans le génome d'une lignée cellulaire. Des vecteurs d'expression contenant les gènes d'intérêt sont ensuite intégrés dans le génome via une réaction de recombinaison médiée par la Flp recombinase au site FRT.

Classiquement, l'obtention de cellules transfectées surexprimant un gène d'intérêt implique la transfection du plasmide d'expression, la sélection des cellules transfectées, ainsi que l'isolement et l'amplification de clones individuels. La majorité des vecteurs d'expression s'intègrent au sein du chromosome de la cellule hôte. Bien que les cellules transfectées expriment une résistance à l'agent sélectif, l'expression du gène d'intérêt peut varier considérablement. Dès lors, les clones doivent être isolés et testés séparément pour l'expression du gène d'intérêt afin d'identifier les clones surproducteurs et ainsi optimiser l'expression. Les étapes liées au clonage et à l'amplification cellulaire sont cependant lentes, laborieuses et peu compatibles avec la transfection en parallèle d'une liste significative de gènes.

Le système de transfection Flp-In permet l'intégration ciblée par recombinaison homologue médiée par la Flp recombinase du vecteur d'expression au sein d'un locus où un taux de transcription élevé est assuré. Toutes les cellules transfectées intègrent le vecteur d'expression au même endroit, si bien qu'il n'est pas nécessaire d'isoler et de caractériser des clones indépendants. Après l'étape de sélection, les cellules composant les différents clones résistants sont trypsinisées, rassemblées et testées pour l'expression du gène d'intérêt. On parle alors de sélection polyclonale. De cette façon les délais pour obtenir des cellules surproductrices sont raccourcis de plusieurs semaines. La technique permet dès lors la transfection simultanée de plusieurs gènes dans des cultures parallèles.

L'intégration ciblée du transgène par recombinaison implique cependant la création d'une lignée Flp-In, c'est-à-dire l'insertion préalable du site de recombinaison FRT (*Flp Recombination Target*) au sein d'un locus transcriptionnellement actif. Cette étape est réalisée par la transfection d'un plasmide contenant le site de recombinaison FRT et un gène hybride codant pour la β -galactosidase ainsi que pour la résistance à la zéocine (pFRT Lac-Zéo). Cette étape est réalisée de façon conventionnelle et des clones résistants sont isolés et testés séparément (**Figure A.III.3**).

La lignée Flp-In présentant la meilleure expression du gène hybride Lac-Zéo est ensuite utilisée pour la transfection des vecteurs d'expression contenant le cDNA d'intérêt et un site FRT. Pratiquement, les cellules sont cotransfectées par un vecteur assurant l'expression transitoire de la Flp recombinase (pOG44). Plusieurs lignées Flp-In sont disponibles auprès de la société Invitrogen (CHO Flp-In, CV-1 Flp-In, BHK Flp-In,....) (**Figure A.III.4**).

Pour évaluer l'effet de la surexpression des gènes d'intérêt sur la résistance aux stress cytotoxiques, nous avons choisi d'utiliser les cellules de fibroblastes embryonnaires murins NIH3T3 dont la version Flp-In nous a été fournie par Invitrogen.

IV) Développement d'un modèle de SIPS en lignée WI-38 immortalisée par la télomérase

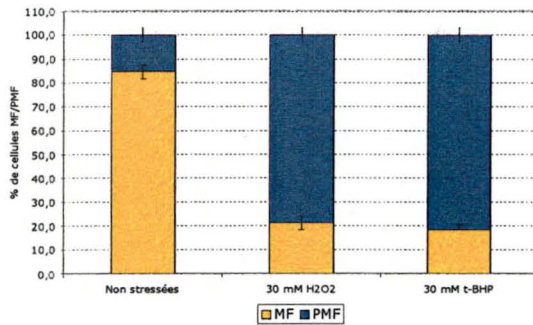
Les modèles de SIPS mis au point au laboratoire se basent sur la réalisation de stress répétés ou non sur des fibroblastes diploïdes humains de poumon foetal (WI-38, IMR-90) ou de peau (BJ, AG04431). Ces cellules ont une durée de vie répllicative limitée à environ 45-50 passages en culture, puis deviennent sénescents. Les caractéristiques de la sénescence sont analysées à partir de cellules jeunes contrôles, c'est-à-dire ayant subi peu de passage en culture ou de cellules ayant subi un stress au *t*-BHP, à l' H_2O_2 , aux UV ou à l'éthanol. Afin de mettre en évidence les effets à long terme des stress, cette analyse est réalisée 72 heures après la fin du stress.

Cependant, au fil des passages en culture, les cellules se rapprochent de la sénescence répllicative avec l'apparition progressive des caractéristiques qui lui sont associées. Dans le cadre d'études de surexpression de gènes potentiellement protecteur, il est impossible de transférer ces cellules de façon conventionnelle, d'isoler et de tester des clones indépendants. Ces étapes nécessitent en effet de nombreux passages en culture qui auraient pour effet de rapprocher les cellules d'un état sénescents et de ne plus permettre la distinction de cellules en SIPS par rapport aux cellules non stressées. La technique de transfection stable par voie rétrovirale suivie d'une courte sélection des cellules transfectées a déjà été appliqué à notre problématique. Ce type de transfection est cependant très lourd à mettre en oeuvre (techniques de clonage conventionnelles, création de lignées d'emballage, infection virale des cellules cibles, sélection, etc.).

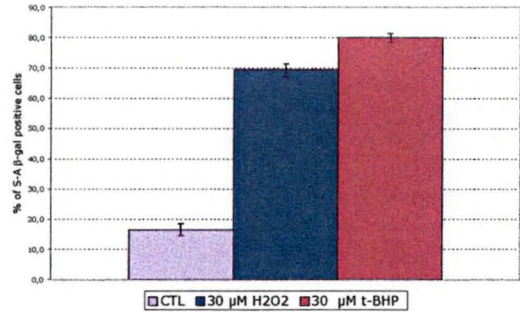
Afin de remédier à ces inconvénients et de nous permettre de tester rapidement le rôle fonctionnel de plusieurs gènes en parallèle, nous avons développé un modèle de SIPS dans des cellules WI-38 immortalisées par la transfection du cDNA de la sous-unité catalytique de la télomérase (WI-38 h-TERT). L'expression de la télomérase a pour effet d'éviter le raccourcissement des télomères au fil des divisions cellulaires et résulte en l'immortalisation des cellules hôtes. Contrairement à ce qui se passe avec l'antigène T du virus SV40, le mécanisme d'immortalisation est indépendant des protéines Rb et p53, dont le rôle dans l'établissement de la SIPS est bien démontré. Il n'y a donc pas d'interférences avec les mécanismes connus liés à l'induction de la SIPS (hypophosphorylation de Rb, induction de p53).

De nombreuses expériences de mise au point d'un modèle de SIPS dans ces cellules ont été réalisées. Notre équipe a montré que l'incubation des cellules WI-38 h-TERT en présence de 30 μM d' H_2O_2 ou 30 μM de *t*-BHP durant deux heures, suivie d'une période de récupération de trois jours avait pour effet d'induire la sénescence prématurée de ces cellules, comme en témoigne l'apparition des caractéristiques de la sénescence tels que la S.A. β -gal, l'arrêt

1) Morphotypes



2) S.A β-gal



3) Morphologie

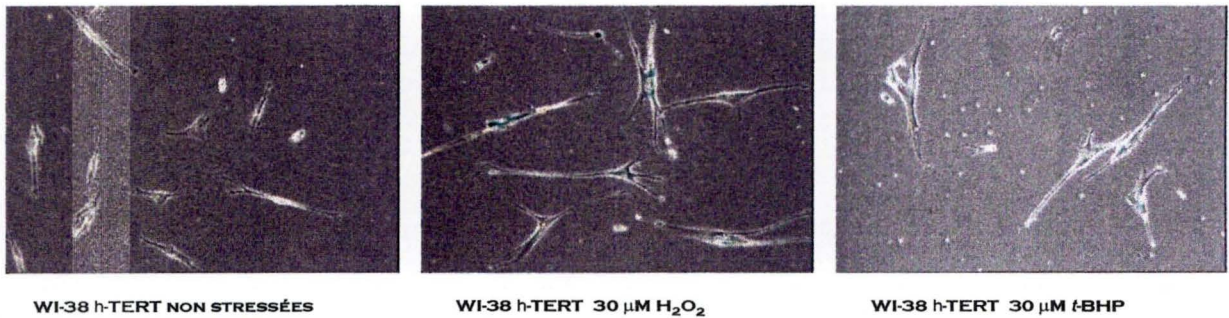


Figure A.IV : Analyse de l'activité S.A β-gal et des morphotypes, caractéristiques de la sénescence observées après un stress unique au *t*-BHP ou à l'H₂O₂ sur des fibroblastes humains WI-38 immortalisés par l'expression de la sous-unité catalytique de la télomérase. 1) WI-38 h-TERT non stressées, stressées avec 30μM *t*-BHP ou H₂O₂, MF morphotypes mitotiques ; PMF morphotypes post-mitotiques. 2) WI-38 h-TERT non stressées, stressées avec 30 μM *t*-BHP ou H₂O₂. 3) Visualisation de la morphologie et de la S.A β-gal par micrographie

prolifératif et une morphologie de type sénéscent (travail de thèse de S. Chiarizia) (**figure A.IV**).

Un tel modèle de SIPS en fibroblastes humains WI-38 immortalisés rend les expériences de transfection et de surexpression bien plus confortables puisque les passages en culture liés à la sélection et au clonage cellulaire n'ont aucun effet sur les caractéristiques de la sénescence rééplivative. A court terme, une version de ces cellules WI-38 h-TERT compatible avec la technologie Flp-In, c'est-à-dire ayant intégré un site FRT, sera générée au laboratoire afin de simplifier encore plus les étapes liées à la transfection.

En combinant la technologie du clonage Gateway, la transfection d'une lignée Flp-In et notre modèle de SIPS en lignée immortelle WI-38 h-TERT, nous estimons qu'il est possible endéans trois à quatre mois d'exprimer quatre à cinq gènes d'intérêt en parallèle et de tester l'effet de leur surexpression sur la résistance des cellules WI-38 h-TERT aux stress cytotoxiques et subcytotoxiques.

But du travail

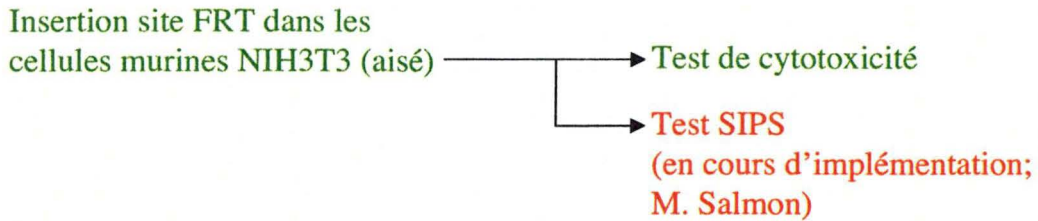
Le but de ce travail vise à étudier le rôle de gènes dont l'expression varie dans la sénescence prématurée induite par des stress (SIPS) ou dans des cellules sénescents et de tester les effets de leur surexpression sur le plan de la résistance face à des stress cytotoxiques et subcytotoxiques.

L'étude du transcriptome et du protéome des cellules en SIPS ou en sénescence répliquative a généré de nombreuses données sous forme de gènes et de protéines montrant des variations d'expression significatives. Afin d'exploiter ces données, il est primordial d'établir des lignées stables surexprimant ces gènes et d'analyser la réponse aux stress de ces cellules. Cela nous permettra de définir la raison pour laquelle l'expression de ces gènes varie en SIPS et de mettre en évidence des effets de protection face aux stress. La surexpression d'une liste conséquente de gènes suppose toutefois leur clonage dans des vecteurs d'expression, la transfection de ceux-ci dans des lignées cellulaires et leur analyse fonctionnelle. Afin de rendre cette démarche possible, notre laboratoire a mis en place des outils nous permettant de réaliser ces différentes étapes de façon rapide et efficace. Cette démarche combine la technologie de clonage Gateway, la transfection d'une lignée cellulaire Flp-In et l'analyse fonctionnelle en terme de protection des gènes transfectés contre des stress cytotoxiques et subcytotoxiques. Dans ce contexte, le présent travail vise également à valider cette approche. Nous avons ainsi sélectionné trois gènes dont des variations du niveau d'expression ont été démontrées lors des études du transcriptome de fibroblastes humains WI-38 en SIPS, à savoir la chaîne légère de la ferritine, l' α -synucléine et la protéine p66 SHC.

La ferritine joue un rôle central dans le maintien de l'équilibre intracellulaire du fer, dont la forme libre participe par la réaction de Fenton à la formation de radicaux libres. En effet, des ions Fe^{2+} réagissent avec le peroxyde d'hydrogène pour former des radicaux hydroxyles ($^{\circ}OH$) hautement réactifs. Dans ce travail, nous nous proposons d'étudier l'effet de la surexpression de la chaîne légère de la ferritine, impliquée dans la minéralisation et le stockage à long terme du fer.

L' α -synucléine est une protéine de 140 acides aminés dont le rôle dans les pathologies neurodégénératives fait l'objet d'une littérature abondante et parfois controversée. Son implication dans la maladie de Parkinson est cependant bien démontrée puisqu'elle représente un composant majeur des corps de Lewy qui s'accumulent dans la *substantia nigra*. Il a aussi été démontré qu'une augmentation de l'expression de l' α -synucléine dans une lignée de cellules hypothalamiques avait pour effet de diminuer la cytotoxicité du peroxyde d'hydrogène ou de la privation de sérum.

(1) Etude de la compatibilité de la technologie Flp-In avec la SIPS



(2) Utilisation de la technologie Flp-In en fibroblastes humains

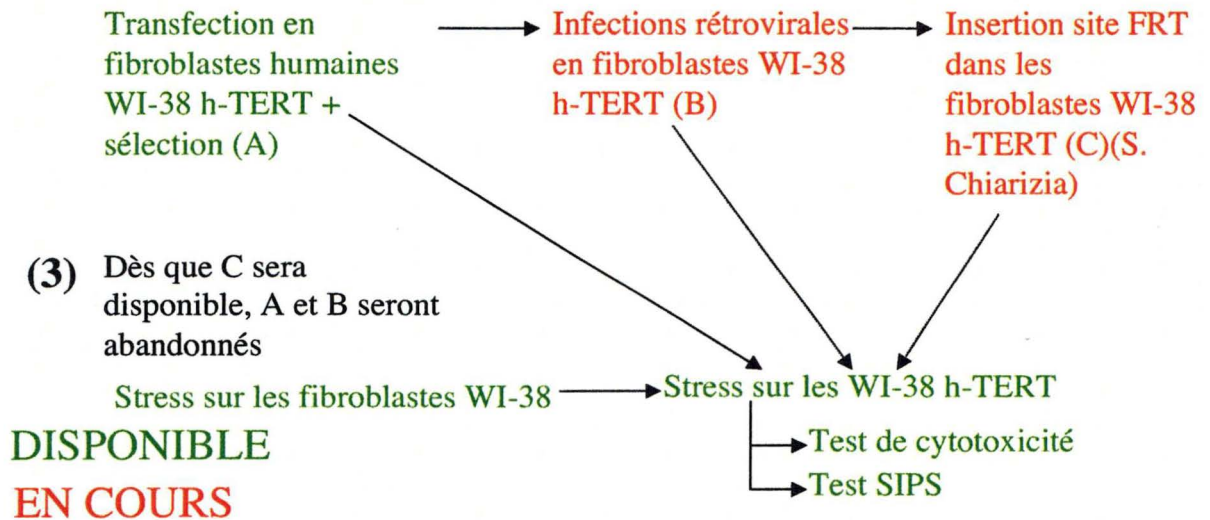


Schéma : Stratégie actuelle et à court terme pour réaliser des tests fonctionnels basés sur la SIPS

Enfin, p66 SHC est une protéine adaptatrice impliquée dans la transduction de signaux mitogènes suite à son activation par phosphorylation sur résidu tyrosine. Dans des conditions de stress, la protéine p66 SHC est phosphorylée sur résidu sérine par l'intermédiaire de la c-Jun-N-terminal Kinase (JNK). Dans ces conditions, p66 SHC joue un rôle pro-apoptotique.

Au cours de ce travail, nous analyserons les effets de la surexpression de ces 3 gènes sur la résistance de fibroblastes murins NIH 3T3 Flp-In face à des stress cytotoxiques au *t*-BHP, à l'H₂O₂, à l'éthanol et aux UVB. Ceci nous permettra d'étudier la compatibilité de la technologie Flp-In avec les études sur la SIPS. Nous transfecterons également nos trois gènes d'intérêt dans des fibroblastes humains WI-38 immortalisés par l'expression constitutive de la sous-unité catalytique de la télomérase (h-TERT). Les conditions d'induction de la SIPS étant bien maîtrisées pour cette lignée cellulaire, elles nous permettront au-delà de ce travail de tester la résistance de cellules surexprimant nos gènes d'intérêt suite à des stress subcytotoxiques. Les techniques conventionnelles de transfections et d'infections virales seront abandonnées lorsque les fibroblastes WI-38 h-TERT seront compatible avec la technologie Flp-In. A plus long terme, et ce bien au-delà de ce mémoire de fin de licence, les gènes conférant une résistance aux stress cytotoxiques et contre l'apparition de la SIPS seront étudiés dans des organismes modèles (*S. cerevisiae*, *C. elegans*, souris) sur le plan de la longévité de ces organismes et de leur résistance aux stress.

MATERIEL ET METHODES

Culture de bactéries

Souches bactériennes

DH5 α : F ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* (rk $^{-}$,mk $^{+}$)
phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1

TOP 10 : F- *mcra-(mrr-hsdRMS-mcrBC)-80lacZ-M15-lacX74deoRrecA1araD139-(ara-leu)7697 galU galK rpsl* (Str R) *endA1 nupG*

Milieux de culture

LB Broth (Becton Dickinson Sparks, Maryland, USA)

Hydrolysate de caséine (peptone) : 1%

NaCl : 0,5%

Extrait de levure : 0,5%

Bacto Agar (Difco, Detroit, USA)

Antibiotiques

ampicilline (100 g/ml)

kanamycine (50 g/ml)

chloramphénicol (27 μ g/ml)

Méthode

Le milieu LB est préparé à partir d'eau distillée additionnée de 2% de milieu LB Broth en poudre. On autoclave 25 minutes à 120°C et on laisse refroidir à 55°C pour ajouter les éventuels antibiotiques. Le milieu LB solide est équivalent au milieu LB liquide auquel on a ajouté 2% d'agar (Difco, Detroit, USA). On autoclave également 25 minutes à 120°C avant d'ajouter les additifs désirés. Ensuite, on coule le milieu dans des boîtes de Pétri que l'on laisse solidifier à température ambiante.

Transformation bactérienne

Le processus de transformation permet l'introduction d'ADN plasmidique dans des cellules bactérienne compétentes qui nous ont été fournies par la société Invitrogen (Carlsbad, USA).

Méthode

Ajouter sur glace l'ADN plasmidique aux bactéries TOP10 ou DH5 α *Ultracomp*TM.

Laisser reposer 30 minutes sur glace.

Placer 30 secondes dans un bain à 42°C pour réaliser le choc thermique.

Laisser reposer 5 minutes sur glace.

Ajouter 250 μ l de milieu SOC à la suspension bactérienne.

Incuber pendant 1 heure à 37°C sous agitation.

Étaler sur milieu solide sélectif et incuber toute la nuit à 37°C

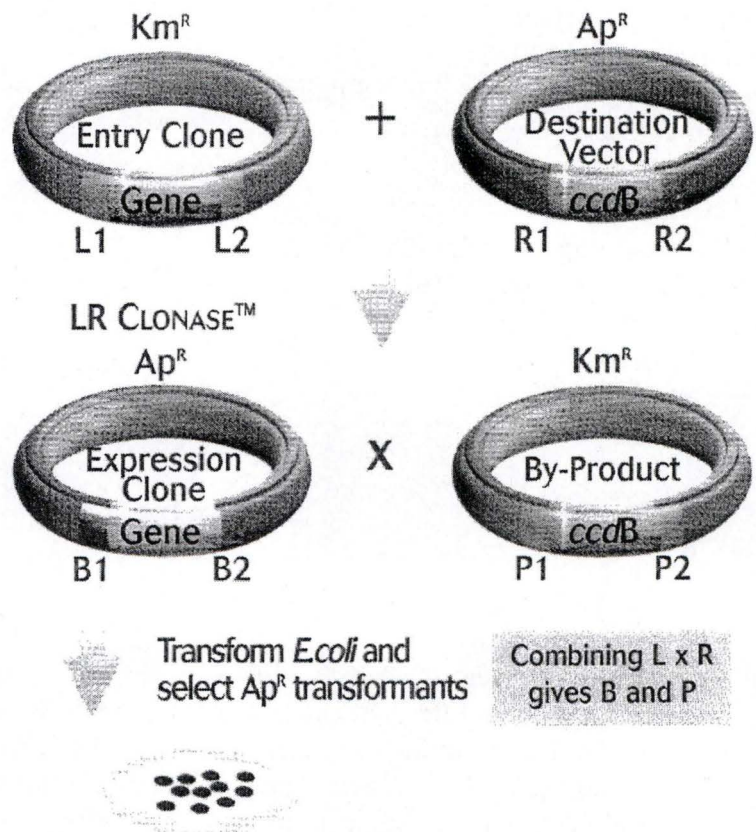


Figure B.I : Réaction de clonage LR pour construire un vecteur d'expression

Technique de clonage à l'aide du système Gateway

Construction du vecteur d'entrée

Matériel

Kit « *Invitrogen Gateway BP CLONASE* » contenant le vecteur donneur pDONR201, le tampon de réaction BP, le mélange enzymatique « BP clonase » et la protéinase K
TE (Tris-EDTA)

Méthode

Préparation du mélange réactionnel BP

1-10 µl clone de départ

2 µl pDONR201

4 µl de tampon de réaction BP

16 µl de TE

4 µl de BP clonase

Incuber pendant 60 minutes à 25°C

Ajouter 2 µl de protéinase K

Incuber pendant 10 minutes à 37°C

Transformer 1 µl de la réaction dans des bactéries TOP10 ou DH5α *Ultracomp*TM

b) Construction du vecteur de destination (Figure B.I)

Matériel

Kit « *Invitrogen Gateway LR CLONASE* » contenant le vecteur de destination (pcDNADEST40, pEF5/FRT/V5-DEST), le tampon de réaction LR, le mélange enzymatique « LR clonase » et la protéinase K
TE (Tris-EDTA)

Méthode

Préparation du mélange réactionnel LR : 1-11 µl de clone d'entrée

1-11 µl de vecteur de destination

4 µl de tampon de réaction LR

16 µl de TE

4 µl de LR clonase

Incuber pendant 60 minutes à 25°C

Ajouter 2 µl de protéinase K

Incuber pendant 10 minutes à 37°C

Transformer 1 µl de la réaction dans des bactéries TOP10 ou DH5α *Ultracomp*TM

Minipréparation d'ADN plasmidique

Les principales étapes de cette technique sont :

- La lyse alcaline des bactéries
- La liaison de l'ADN à une colonne de silice
- L'éluion de l'ADN

Matériel

Kit « *QIAprep Spin Miniprep using a microcentrifuge* » (Figure II) :

Tube microcentrifuge

Tampon P1

Tris-HCl (50 mM ; pH 8)

RNase A (100 µg/ml)

Tampon P2

Tampon N3

Colonnes (Qiagen, Hilden, Allemagne)

Tampon PE

Tampon PB

Tampon EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5)

Centrifugeuse de table (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne)

Méthode

Inoculer 3 ml de milieu LB contenant l'antibiotique approprié et incuber toute la nuit à 37°C sous agitation.

Centrifuger 1 ml de culture à 13000 rpm pendant 5 minutes. (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne)

Resuspendre le culot bactérien dans 250 µl de tampon P1 contenant de la Rnase.

Ajouter 250 µl de tampon P2 et inverser les tubes 4 à 6 fois pour mélanger.

Ajouter 350 µl de tampon N3.

Centrifuger pendant 10 minutes à 13000 rpm.

Récupérer le surnageant (750 µl) et le placer sur la colonne.

Centrifuger pendant 1 minute à 13000 rpm et jeter l'éluat.

Laver la colonne avec 500 µl de tampon PB et centrifuger pendant 1 minute à 13000 rpm et jeter l'éluat.

Laver la colonne avec 750 µl de tampon PE et centrifuger pendant 1 minute à 13000 rpm et jeter l'éluat .

Répéter cette étape une nouvelle fois.

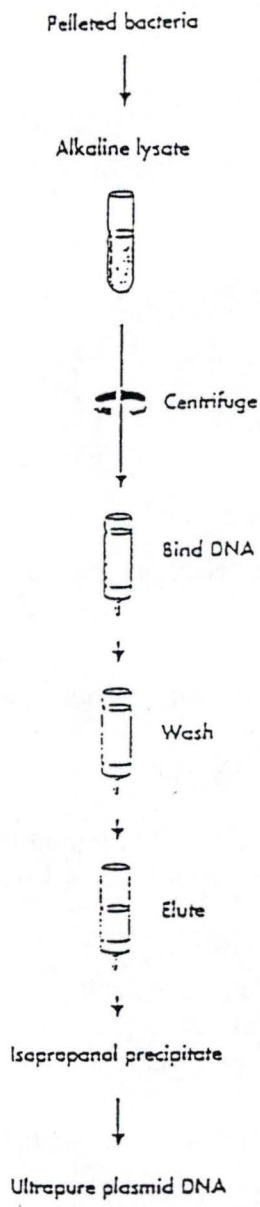
Placer la colonne sur un eppendorf.

Eluer l'ADN en ajoutant 30 ou 50 µl de tampon EB ou d'eau distillée et centrifuger pendant 1 minute à 13000 rpm.

Maxi-préparation d'ADN plasmidique

La maxi-préparation permet de purifier de grandes quantités d'ADN plasmidique. Cette technique utilise une colonne échangeuse d'anions sur laquelle s'adsorbe l'ADN

QIAGEN Plasmid Maxi Kit



Hands-on time	30 minutes
Total time	145 minutes

Figure B.II : Protocole de purification d'ADN plasmidique à grande échelle à l'aide du kit QIAGEN.

plasmidique, ce qui permet de le séparer des protéines, des débris cellulaires, de l'ARN et de l'ADN génomique.

Matériel

Kit de purification de plasmides : « Qiagen plasmid Maxi kit » (Qiagen, Hilden, Allemagne)

Tampon de resuspension (P1) :

- 50 mM Tris-HCl pH 8
- 10 mM EDTA
- 100 µg/ml RNase A
- (conservation à 4°C après avoir ajouté la RNase A)

Tampon de lyse (P2) :

- 200 mM NaOH, 1% SDS
- (conservation à température ambiante)

Tampon de neutralisation (P3) :

- 3 M d'acétate de potassium
- (conserver à 4°C)

Tampon d'équilibrage des colonnes (QBT) :

- 750 mM NaCl
- 50 mM MOPS, pH 7,0
- 15% d'isopropanol
- 0,15% Triron X-100

Tampon de lavage (QC) :

- 1 M NaCl
- 50 mM MOPS, pH 7,0
- 15% d'isopropanol

Isopropanol (Merck, Darmstadt, Allemagne) conservé à température ambiante.

Ethanol 70% (Merck, Darmstadt, Allemagne) conservé à - 20°C.

Méthode (Figure B.II)

Si le plasmide est présent en grand nombre de copies au sein de la bactérie, 100 ml de milieu liquide sont ensemencés avec 100 µl d'une culture de nuit. Si le plasmide est présent en faible nombre de copies au sein de la bactérie, 250 ml de milieu liquide sont ensemencés avec 1 ml d'une culture de nuit.

Incuber la culture une nuit à 37°C sous agitation à 250 rpm.

Centrifuger la culture à 6000 g pendant 15 minutes (Beckman Avanti J-25, rotor JLA-16.250) et éliminer le surnageant.

Resuspendre le culot dans 10 ml de tampon P1.

Ajouter 10 ml de tampon P2 et mélanger doucement, puis laisser 5 minutes à température ambiante.

Ajouter 10 ml de tampon P3 et mélanger doucement, puis laisser sur glace pendant 20 minutes.

Centrifuger 30 min à 4°C à 20.000 g (Beckman Avanti J- 25, rotor JA-20) et récupérer le surnageant.

Equilibrer les colonnes Qiagen-Tip 500 avec 10 ml de tampon QBT et laisser la colonne se vider par gravité.

Déposer le surnageant sur la colonne.

Laver la colonne avec 2 x 30 ml de tampon QC.

Eluer l'ADN plasmidique avec 15 ml de tampon QF.

Récupérer l'éluat dans un Corex de 30 ml en verre.
Précipiter l'ADN avec 0.7 volume (10,5 ml) d'isopropanol.
Centrifuger 30 minutes à 12.000 g à 4°C, et éliminer le surnageant.
Laver avec 5 ml d'éthanol 70 %.
Centrifuger 10 minutes à 1200 g à 4°C.
Décantier délicatement le surnageant.
Sécher le culot pendant 30 minutes (retourner les tubes sur du papier et les mettre à 37°C).
Resuspendre le culot dans 250 à 500 µl H₂O distillée stérile.
Conserver à - 20°C.

Restrictions enzymatiques

Les enzymes utilisées nous ont été fournies par Promega (Madison, U.S.A). Le mélange réactionnel est constitué du tampon de restriction préconisé par le fournisseur, de l'ADN à digérer et de l'enzyme (2-10 U / µg d'ADN). Les réactions sont réalisées durant 1 à 2 h à 37°C.

Electrophorèse sur gel d'agarose

Cette technique consiste à séparer des molécules d'ADN selon leur taille sous l'action d'un champ électrique constant sur un gel constitué de polymères d'agarose (0,8-2 % dans du TBE). Le pourcentage en agarose est déterminé en fonction des tailles respectives des fragments à séparer. Des gels à haut pourcentage en agarose permettent de séparer des fragments d'ADN de petites tailles et inversement. La taille des fragments obtenus après digestion est estimée à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire (100 bp ladder, 1kb ladder, Promega, USA). Les fragments sont visualisés par l'ajout d'une solution de bromure d'éthidium dans le gel. L'ADN est visualisé sous illumination UV.

Matériel

Cuve d'électrophorèse (Horizon 11-14, Gibco, Paisley, Grand-Bretagne)
Transilluminateur, longueur d'onde : 392 nm (Analis, Namur, Belgique)
Appareil photo : Kaiser RA1 + Photo-pront IP-001-SD (Vilbert-Lourmat, France)
Film K65HM (Mitsubishi, Japon) + imprimante P91 (Mitsubishi, Japon)
TBE 1X (Tris-borate 0,9 M ; EDTA 0,002 M), stock TBE 10X (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.)
Lampe UV (Vilbert-Lourmat, France)
Générateur EPS 500/400 (Pharmacia, Suède)
Bromure d'éthidium, solution stock de 500 µg/ml (Sigma, St Louis, U.S.A.)
Agarose (Ultra Pure Grade Agarose, Bio-Rad, U.S.A.)
Tampon de charge (6X Load Dye)
Marqueurs ADN de poids moléculaire :
100 bp DNA Ladder (Promega, Madison, U.S.A.)
1 kb DNA Ladder (Promega, Madison, U.S.A.)

Méthode

Porter à ébullition un volume approprié d'un mélange de TBE 1X additionné de 0,5% à 2% d'agarose selon la taille des fragments à séparer.

Ajouter le bromure d'éthidium (dilué 5000X) à cette solution.

Couler sur le support *ad hoc* muni de peignes et laisser solidifier le gel.

Immerger le gel dans la cuve d'électrophorèse remplie de tampon TBE 1X .

Déposer les échantillons contenant du tampon de charge dans les puits du gel.

Faire migrer les échantillons à un voltage compris entre 80 V et 120 V. Les fragments d'ADN, chargés négativement, se déplacent vers l'anode, à une vitesse inversement proportionnelle à leur taille.

Arrêter la migration et visualiser les différents fragments dans le gel sous une illumination UV.

Le séquençage

Les réactions de séquençage d'ADN plasmidique ont été réalisées au sein du Département de Médecine (Neurobiologie) des FUNDP. La technique utilisée repose sur l'incorporation par PCR de didéoxynucléotides fluorescents. Suivant les ADN à séquencer, les amorces T7 et BGH (*Bovine Growth Hormone reverse primer*) ont été utilisées.

Techniques de culture cellulaire

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé des fibroblastes murins NIH 3T3 Flp-In.

Matériel

DHG (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)

DHG + 10% DCS : Milieu DHG additionné de 10% de sérum de veau donneur (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)

Solution de trypsine EDTA : trypsine à 0.25% (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)

Milieu de rinçage : PBS (phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0.9%, pH 7.4)

Boîtes de culture stériles de 25 cm² (T25) ou de 75 cm² (T75) (Corning, Cambridge, USA)

Cellules murines NIH3T3 Flp-In.

Antibiotiques pénicilline streptomycine (Bio-whitaker, Verviers, Belgique).

Glutamine (2,5 mM final)

Méthode

Repiquage de cellules murines NIH3T3 Flp-In.

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de 75 cm² (T75). Quand elles sont confluentes, elles sont repiquées dans des conditions stériles.

Préchauffer le milieu de rinçage (PBS), le milieu de culture et la trypsine à 37°C

Décantier l'ancien milieu et rincer les cellules avec 10 ml de milieu de rinçage afin d'éliminer toute trace de sérum.

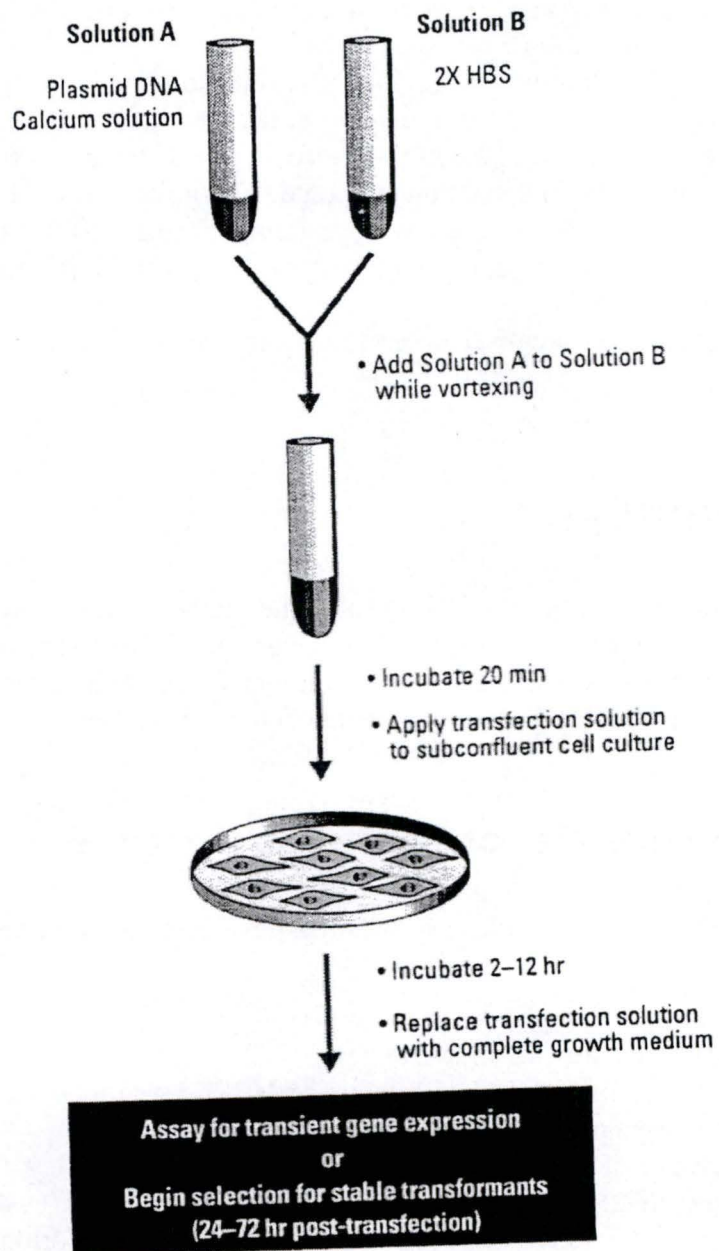


Figure B.III : Méthode de transfection au phosphate de calcium (Clontech, Palo Alto, U.S.A.)

Ajouter 0,8 ml de trypsine par T75. Incuber les cellules à 37°C jusqu'à ce qu'elles soient toutes détachées, c'est-à-dire pendant environ 2 minutes pour les NIH 3T3 Flp-In. Rajouter 10 ml de milieu dans la T75 et à l'aide d'une pipette Pasteur, rompre les agrégats cellulaires et répartir le milieu contenant les cellules détachées en nouvelles boîtes de culture T75. Placer les boîtes de culture contenant les NIH3T3 entrouvertes dans une étuve à 37°C diffusant de l'air contenant 5% de CO₂ afin d'ajuster le pH du milieu de culture.

Décongélation et mise en culture des cellules

Le cryotube contenant les cellules à décongeler est immédiatement placé dans un berlin contenant de l'eau à 37°C.

Centrifuger les cellules pendant 10 minutes à 1000 rpm..

Resuspendre le culot dans du milieu et transférer dans une nouvelle boîte de culture.

Le lendemain, changer le milieu de culture afin d'éliminer toute trace de DMSO.

Transfection des cellules NIH3T3

Matériel

Kit Calphos Mammalian transfection (Clontech, Palo Alto, USA) contenant du HBS (Hepes Buffer Saline 2X) stocké à -20°C et une solution de calcium 2 M

Cellules à 50-80% de confluence

Milieu de culture DHG + antibiotiques + L-glutamine + 10% DCS

PBS (Phosphate Buffer Saline) 10 mM à pH 7,4 contenant 0,9 % de NaCl

ADN plasmidique purifié

Eau stérile

Méthode (Figure B.III)

Repiquer les cellules à transfecter la veille de manière à obtenir le jour de la transfection entre 60 et 80 % de confluence.

Trois heures avant la transfection, changer le milieu de culture des cellules

Pour chaque transfection, préparer la solution A et B

Solution A :

ADN plasmidique

eau stérile

solution de calcium 2 M

Solution B : HBS 2X

Ajouter la solution A goutte-à-goutte à l'aide d'une pipette Pasteur à la solution B tout en bullant la solution B. On permet ainsi la formation d'un précipité de phosphate de calcium et d'ADN.

Incuber la solution de transfection pendant 20 minutes à température ambiante.

Vortexer doucement la solution avant de l'ajouter goutte-à-goutte au milieu de culture.

Incuber les cellules de 2 à 12 heures dans une étuve à 5% CO₂ (37°C).

Retirer le milieu de culture et rincer une fois au PBS.

Rajouter 10 ml de milieu de culture frais.

Incuber dans l'étuve à 37°C avec 5% CO₂. La sélection à l'hygromycine B (200 µg/ml) débute 24 à 72 heures après la transfection.

Extraction protéique

Matériel

PBS (Phosphate Buffer Saline)

M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent ; Pierce, Rockford, USA)

Inhibiteurs de protéases « Complete » (Roche, Mannheim, Allemagne)

Méthode

Retirer avec précaution le milieu de culture

Rincer 1 fois au PBS

Ajouter entre 400 et 1000 µl de M-PER pour une T 75

Agiter doucement pendant 5 minutes

Collecter le lysat dans un tube Eppendorf

Centrifuger à 10.000 rpm pendant 10 minutes

Transférer le surnageant dans un nouveau tube Eppendorf

Western Blot

L'électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Le transfert de celles-ci sur membrane de nitrocellulose ou de polyvinylidène difluorure (PVDF) permet leur détection à l'aide d'un anticorps spécifique (anticorps primaire) et d'un anticorps secondaire conjugué à une peroxydase. La détection est réalisée en présence d'un substrat de la peroxydase et de luminol. L'oxydation du luminol s'accompagne d'émission de lumière qui peut être détectée à l'aide d'un film autoradiographique.

Matériel

Extraits cellulaires de fibroblastes WI-38 h-Tert et NIH 3T3 Flp-in transfectés ou non

Centrifugeuse (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne)

Minigel NUPAGE (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)

Tampon de migration :

tampon MOPS : 50 ml (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)

eau distillée : porter à 1 litre

Minicuve (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)

Etalons de poids moléculaire : Seeblue plus 2 pre-stained protein standard (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)

Eponges

Papiers Whatman (Merck, Darmstadt, Allemagne)

Membrane PVDF (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Uppsala, Suède)

Tampon de transfert :

tampon de transfert NU PAGE : 5ml (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)

méthanol : 10ml (20ml si deux gels)
eau distillée : porter à 100ml
Générateur (Biorad Power PAC 300)
Tampon de rinçage (TBS-Tween) :
TBS (100x)
Tween 20 (1000x) : Polyoxyéthylènesorbitan monolaurate (Sigma, St Louis, USA)
Porter à volume avec de l'eau distillée
Gloria (Nestlé, Belgique)
Anticorps primaires
Anticorps secondaires
Substrat de révélation : ECL Advanced Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences, Little Chalfort, Angleterre)
Film autoradiographique (Biotech, Buckinghamshire, Angleterre)

Méthode

Décongeler les extraits cellulaires et faire bouillir 4 minutes en présence du tampon de charge.

Déposer les échantillons sur gel et laisser migrer durant environ 1 heure (sous 200V), dans le tampon de migration.

Enlever le gel du moule et effectuer le montage suivant :

électrode négative

2 éponges imbibées de tampon de transfert NUPAGE

2 papiers whatmans imbibés de tampon de transfert NUPAGE

gel

membrane PVDF préalablement incubée dans le méthanol, rincée à l'eau et équilibrée dans du tampon de transfert NUPAGE

2 papiers whatmans imbibés de tampon de transfert NUPAGE

2 éponges imbibées de tampon de transfert NUPAGE

électrode positive

Transférer les protéines du gel sur la membrane PVDF en présence de tampon de transfert (et d'eau dans le reste de la cuve de manière à éviter une surchauffe sous l'effet du courant) : sous 7V et 150mA durant au moins 2 heures.

Bloquer la membrane en présence de TBS-T + gloria (5%) durant une heure à température ambiante.

Incuber la membrane à température ambiante avec les anticorps primaires dilués dans du TBS-T + gloria (5%) durant deux heures ou la nuit à 4°C.

Rincer la membrane 3 fois durant 5 min avec du TBS-T + gloria (5%).

Incuber la membrane avec les anticorps secondaires dilués dans du TBS-T + gloria (5%) durant une heure.

Rincer la membrane une fois 5 min avec du TBS-T + gloria (5%), deux fois 5 min avec du TBS-T seul et une fois 10 min avec du TBS-T seul.

Placer la membrane durant 5 min en présence du substrat de la peroxydase sur une plaque de plexiglas.

En chambre noire, exposer un film autoradiographique sur la membrane de manière à obtenir une révélation optimale.

Placer le film dans la solution de révélation.

Rincer à l'eau puis placer dans la solution de fixation.

Rincer à l'eau courante.

Immunofluorescence (IF)

Matériel

PBS
PBS-BSA (Sigma A6793, Saint-Louis, USA)
PBS + Triton x-100 1%
Paraformaldéhyde 4%
Anticorps primaire (dilué dans PBS-BSA)
Anticorps secondaire (dilué dans PBS-BSA)
TOPRO-3
Mowiol
Plaque multipuits (24 puits)

Méthode

Repiquer les cellules dans les puits contenant une lame couvre-objet
Rincer les cellules qui ont poussé sur couvre-objet 1 fois avec du PBS (37°C)
Fixer les cellules 10 minutes avec le paraformaldéhyde 4% sur glace à 4°C
Rincer 3 fois au PBS
Perméabiliser au PBS + Triton 1% 5 minutes
Rincer 3 fois 10 minutes au PBS-BSA
Prendre délicatement la lamelle et la retourner sur 30 µl d'anticorps primaire dilué sur parafilm en chambre humide
Incuber overnight à 4°C
Remettre la lamelle dans la plaque multipuits
Rincer 3 fois 10 minutes au PBS-BSA
Prendre délicatement la lamelle et la retourner sur 30 µl d'anticorps secondaire dilué sur parafilm en chambre humide
Incubation 1 heures à l'abri de la lumière
Diluer 80X le TOPRO-3 dans du PBS + RNase 2 mg/ml
Déposer sur le parafilm pendant 30 minutes
Rincer 3 fois au PBS
Monter le couvre-objet sur une lame porte-objet avec du mowiol préchauffé à 56°C

Stress cytotoxiques sur les cellules murines NIH 3T3 Flp-In

Matériel

DHG + 1% DCS (Gigco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
t-BHP 7,92 M (Schuchardt, Honenbrunn, Allemagne)
Ethanol 100 %
H2O2 30 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
DHG +10% DCS+antibiotiques
plaque multipuits (6 puits)

Méthode

Repiquer les cellules en plaques 6 puits avec du milieu complet
Le lendemain, remplacer le milieu par du DHG + 1% DCS contenant la molécule stressante
Incuber 2 heures dans l'étuve à 37°C, 5% CO₂
Rincer 2 fois avec du DHG + 1% DCS
Remplacer le milieu par du DHG + 10 % DCS + antibiotiques

Test de viabilité cellulaire au MTT

Les cellules métaboliquement actives incorporent le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium), et le clivent en son dérivé formazan qui forme des cristaux insolubles en milieu aqueux et de coloration mauve. Cette réaction est catalysée par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. En présence d'une molécule toxique, le nombre de cellules capables de réaliser cette réaction diminue et une corrélation peut être établie entre la viabilité cellulaire et la quantité de MTT clivé.

Matériel

MTT (Sigma, Saint-Louis, USA) préparé à une concentration stock de 2,5 mg/ml dans du PBS
SDS 30%
N,N-diméthyl-formamide
Acide acétique 80%

Méthode

Préparer à partir de deux volumes de SDS 30 % et d'un volume de formamide la solution de lyse pour un puit de 3,5 cm de diamètre. Cette solution est ensuite portée à pH 4,7 avec de l'acide acétique 1 M
Retirer le milieu de culture
Ajouter 1 ml de solution de coloration (MTT)
Incuber 2 heures à 37°C, 5% CO₂
Enlever le surnageant
Ajouter 1 ml de solution de lyse
Lorsque les cristaux sont solubilisés, lire l'absorbance à 570 nm au spectrophotomètre
« Microplate Imaging System

Résultats

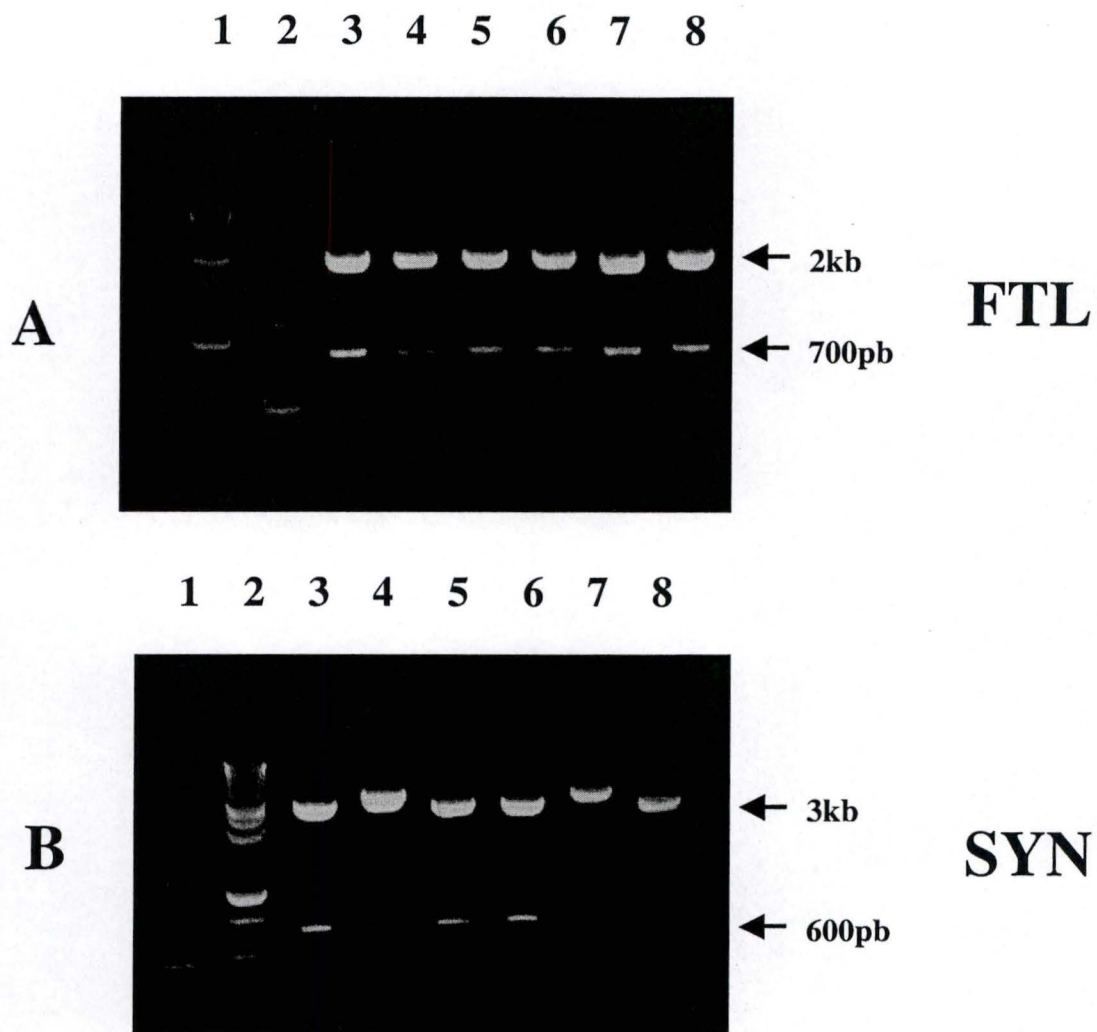


Figure C.I.1 : Restriction diagnostique des vecteurs d'entrée

A) pDONR201/FTL restreint par Pst I, bandes attendues à 2 kb et 700 pb.

1 = Ladder 1kb

2 = Ladder 100 pb

3 à 8 = candidats clones d'entrée

B) pDONR201/SYN restreint par BamH I et Hpa I, bandes attendues à 3kb et 600 pb

1 = Ladder 100 pb

2 = Ladder 1 kb

3 à 8 = candidats clones d'entrée

I) Clonages par la technologie Gateway

La surexpression d'un gène dans un organisme hôte (lignée cellulaire, bactéries, levures,...) suppose le clonage préalable de son cDNA correspondant dans un vecteur d'expression, en aval d'un promoteur fort et en amont d'un épitope éventuel et d'une séquence de polyadénylation.

Notre premier objectif a donc été de construire des vecteurs permettant l'expression de nos cDNA d'intérêt dans la lignée de fibroblastes murins NIH3T3 Flp-In (pEF5/FRT/V5-DEST) et dans les cellules WI-38 h-TERT (pcDNA DEST40). Les cDNA correspondant aux gènes codant pour la chaîne légère de la ferritine, pour l' α -synucléine et pour la protéine p66 SHC proviennent de la firme RZPD qui commercialise les clones issus du Consortium Image. Nous avons pris soin de commander des clones contenant des cDNA entièrement séquencés et bordés par les sites de recombinaison AttB1 et AttB2 (dans des vecteurs compatibles avec la technologie Gateway tels que pOTB7 ou pCMV/SPORT6). La correspondance des cDNA avec les séquences théoriques a également été confirmée par séquençage au laboratoire après réception des clones.

Ayant opté pour l'usage de la technologie de clonage Gateway, nous avons tout d'abord construit des clones d'entrée pour nos cDNA d'intérêt. Cette étape a été réalisée *in vitro* par réaction de recombinaison BP entre le vecteur donneur pDONR201 et le plasmide pOTB7 ou pCMV/SPORT6 contenant respectivement les cDNA de la chaîne légère de la ferritine et de p66 SHC d'une part et de l' α -synucléine d'autre part. Les coordonnées des clones provenant de la société RZPD sont reprises ci-dessous.

CDNA	IDENTIFICATION DU CLONE	VECTEUR DE CLONAGE
CHAÎNE LÉGÈRE DE LA FERRITINE	IMAG P998E1410 434Q2	POTB7
α -SYNUCLÉINE	IMAG P958J 0764Q2	PCMVS-SPORT6
P66 SHC	IMAG P958M191 813Q2	POTB7

Les produits de réaction ont ensuite été transformés dans des bactéries CcdA⁻ DH5 α . Celles-ci ont été étalées sur milieu sélectif contenant 50 μ g/ml de kanamycine. Pour chaque transformation, des clones ont été isolés et amplifiés en culture liquide afin d'en extraire leur ADN plasmidique. L'insertion correcte des cDNA d'intérêt a ensuite été vérifiée par restriction diagnostique (**Figure C.I.1**). Les clones présentant les profils de restriction attendus ont ensuite été séquencés sur les deux brins. Les clones d'entrées FTL1, α -SYN3 et p66 contiennent respectivement les cDNA de la chaîne légère de la ferritine, de l' α -synucléine et de p66 SHC bordés cette fois des sites de recombinaison AttL1 et AttL2, ont été sélectionnés pour la construction des plasmides d'expression.

Deux types de vecteurs de destination ont retenu notre attention. D'une part, le vecteur pEF5/FRT/V5-DEST permet l'expression en lignée NIH3T3 Flp-In, car il possède le site de recombinaison FRT pour l'intégration ciblée du transgène au sein de la cellule hôte en utilisant une lignée Flp-In. Il contient en outre le promoteur humain du facteur d'élongation EF1 α , les sites de recombinaison AttR1 et AttR2, le gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection bactérienne et le gène de résistance à l'hygromycine pour la sélection des cellules transfectées. D'autre part, le vecteur pcDNA DEST40 permet la surexpression des cDNA

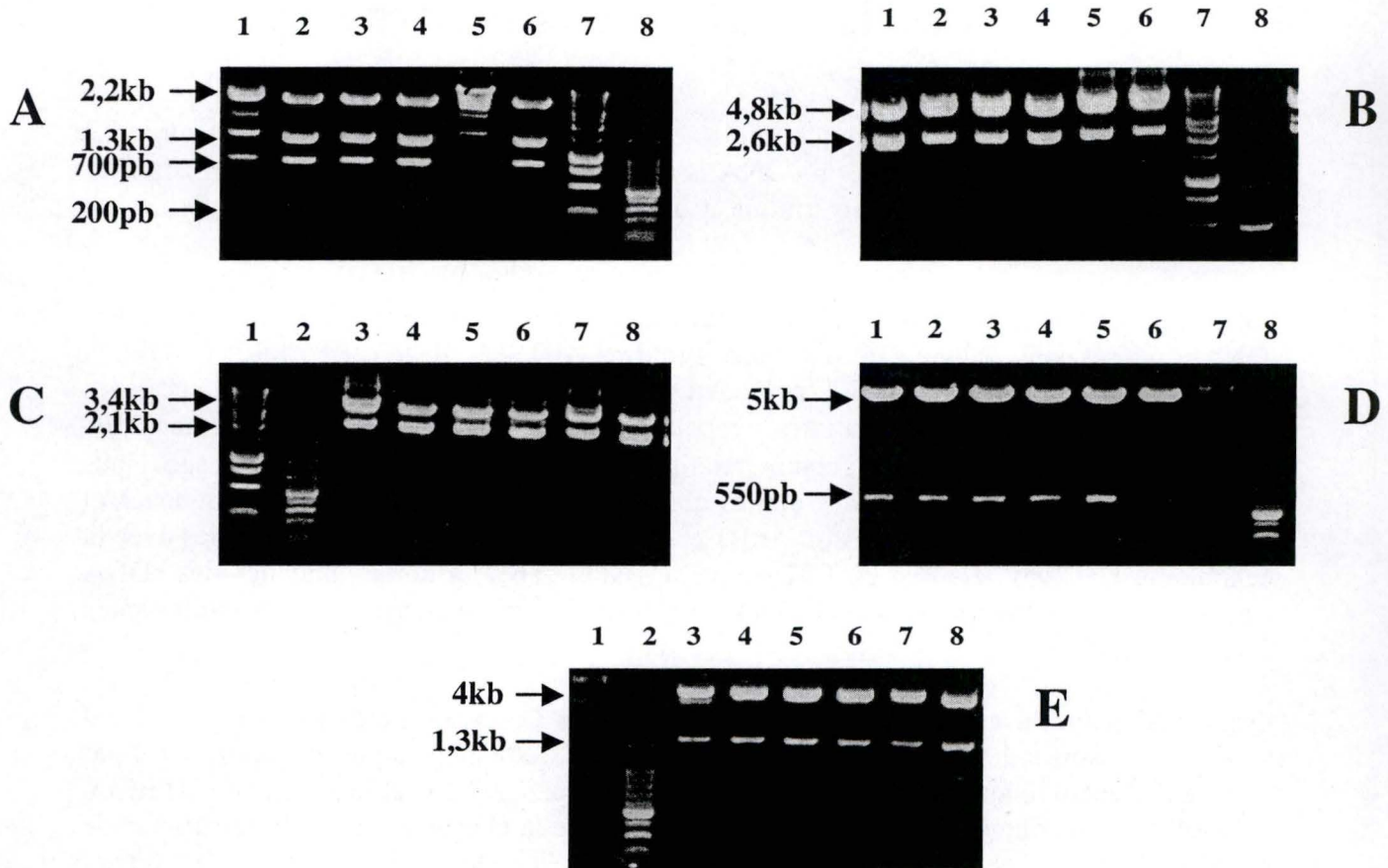


Figure C.I.2 : Restriction diagnostique des différents vecteurs d'expression obtenus

p66 : protéine adaptatrice p66 SHC

FTL : chaîne légère de la ferritine

SYN : α -synucléine

A pEF/FRT/FTL restreint par Hind III, bandes attendues à 2,2 kb, 1,3 kb, 700 pb et 200 pb

1 à 6 = candidats vecteurs d'expression

7 = Ladder 1kb

8 = Ladder 100pb

B pCMV/DEST40/p66 restreint par Pst I, bandes attendues à 4,8 kb et 2,6 kb

1 à 6 = candidats vecteurs d'expression

7 = Ladder 1kb

8 = Ladder 100pb

C pCMV/DEST40/FTL restreint par Pst I, bandes attendues à 3,4 kb et 2150 pb

1 = Ladder 1 kb

2 = Ladder 100 pb

3 à 8 = candidats vecteurs d'express

D pEF/FRT/SYN restreint par BamH I, bandes attendues à 5 kb et 550 pb

1 à 6 = candidats vecteurs d'expression

7 = Ladder 1kb

8 = Ladder 10

E pCMV/DEST40/SYN restreint par BamH I et Bgl II, bandes attendues à 4 kb et 1350 pb

1 = Ladder 1 kb 2 = Ladder 100 pb 3 à 8 = candidats vecteurs d'expression

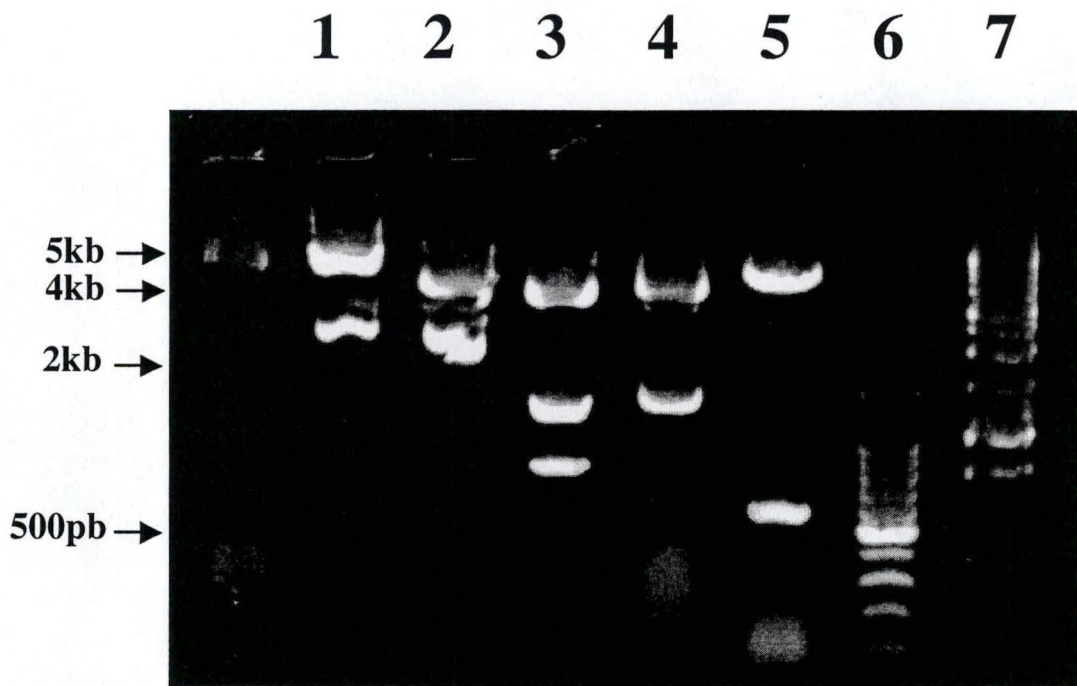


Figure C.I.3 : Restriction diagnostique des clones d'expression sélectionnés

p66 : protéine adaptatrice p66 SHC

SYN : α -synucléine

FTL : chaîne légère de la ferritine

1 pCMV/DEST40/p66 restreint par pst I, bandes à 4,8 et 2,6 kb

2 pCMV/DEST40/FTL restreint par pst I, bandes à 3,4 kb et 2150 pb

3 pEF/FRT/FTL restreint par Hind III, bandes à 2,2 kb, à 1,3 kb et à 700 pb et 200 pb

4 pCMV/DEST40/SYN restreint par BamH I et Bgl II, bandes à 4 kb et à 1350 pb

5 pEF/FRT/SYN restreint par BamH I, bandes à 5 kb et à 550pb

6 100 pb Ladder

7 1 Kb Ladder

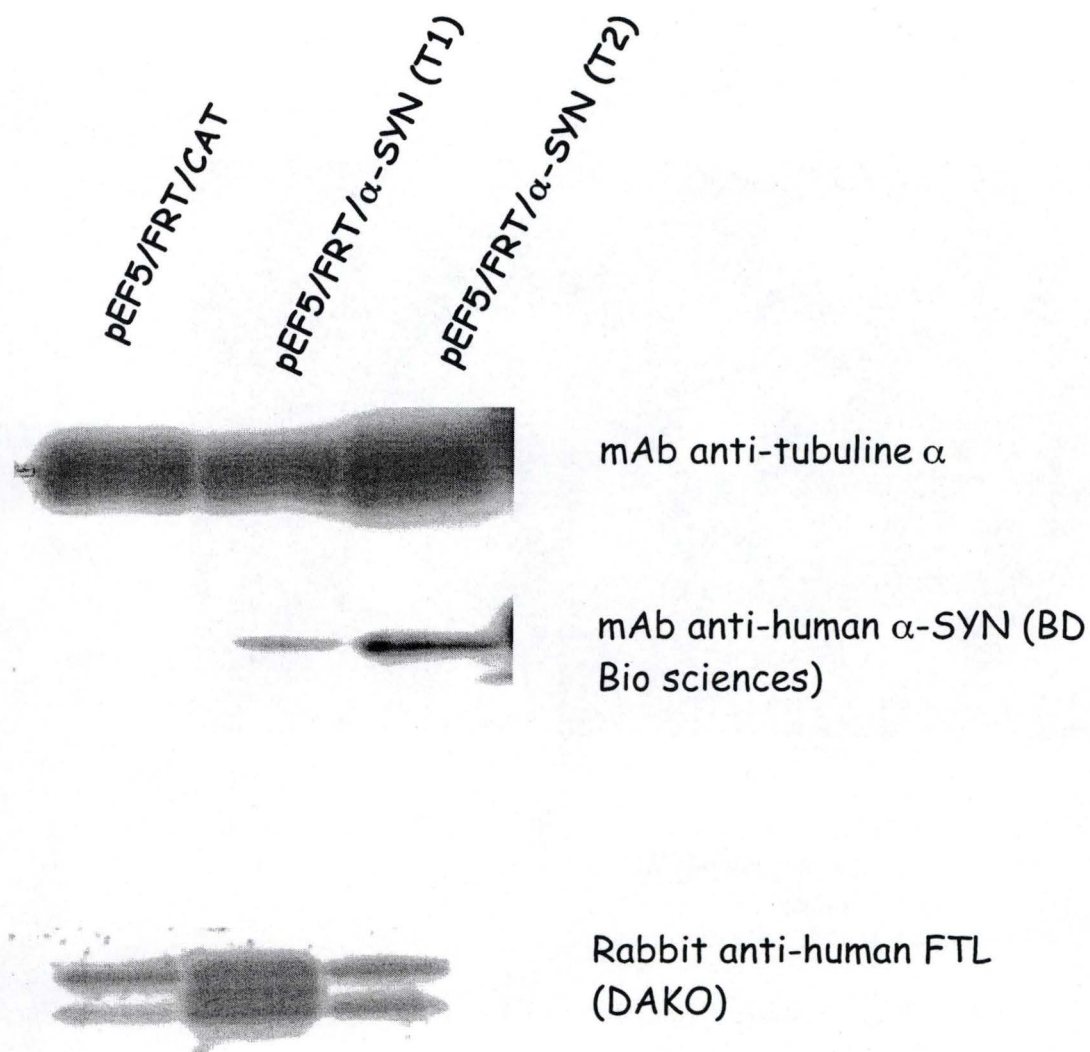


Figure C.II.1 : Western blot mettant en évidence la surexpression de l'α-synucléine (α-SYN) et de la chaîne légère de la ferritine (FTL). Ces résultats sont normalisés par rapport à l'α-tubuline.

Dilution anticorps : mAb anti-tubuline α = 1/20000

mAb anti-human α-SYN = 1/500

Rabbit anti-human FTL = 1/1000

Révélation à l'aide du substrat ECL Advance

d'intérêt sous le contrôle du promoteur viral CMV, dans la lignée WI-38 h-TERT, ne contenant pas de sites FRT. Il contient également les sites AttR1 et AttR2, le gène de résistance à l'ampicilline et le gène de résistance à la néomycine pour la sélection des transfectants. Des réactions de recombinaison ont dès lors été réalisées entre ces vecteurs de destination et les différents clones d'entrée que nous avons obtenus. Après une nouvelle transformation de bactéries CcdA^r TOP10 et croissance sur milieu sélectif contenant 100 µg/ml d'ampicilline, des clones résistants ont été isolés et amplifiés. L'ADN plasmidique en a été extrait et purifié. Des restrictions diagnostiques ont été ensuite réalisées, pour confirmer la correcte insertion des cDNA en aval des promoteurs EF1 α ou CMV (**Figures C.I.2**). Les clones ayant le profil d'expression attendu ont été amplifiés à grande échelle et l'ADN plasmidique extrait et purifié. Les plasmides ont ensuite été séquencés afin de vérifier l'absence de mutations ponctuelles ou de codons stop prématurés dans la phase de lecture (voir annexes). Les plasmides pEF/FRT/FTL 2 et 3, pEF/FRT/SYN 1 et 2, pCMV/DEST40/p66 1 et 2 ont été sélectionnés pour les étapes de transfection des cellules NIH3T3 Flp-In, tandis que les plasmides pCMV/DEST40/FTL 1 et 2, pCMV/DEST40/SYN 5 et 6, pCMV/DEST40/p66 1 et 2 ont été choisis pour la transfection de la lignée WI-38 h-TERT, qui sera quant à elle réalisée dans la continuité de ce travail (**Figure C.I.2 et C.I.3**).

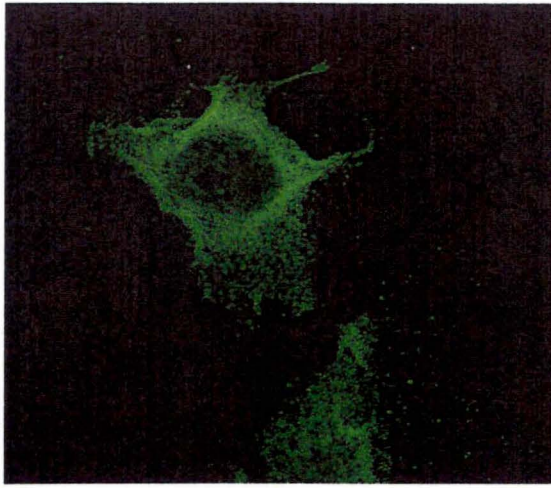
II) Transfection des fibroblastes murins NIH3T3 Flp-In et analyse de la surexpression.

Les cellules NIH3T3 Flp-In contiennent un site de recombinaison FRT unique et un gène hybride Lac-Zéo au sein d'un locus transcriptionnellement actif. Le système Flp-In permet de remplacer ce gène hybride par nos cDNA d'intérêt assurant ainsi leur intégration ciblée et une expression optimale. Les constructions ont ainsi été cotransfectées avec le vecteur pOG44, permettant l'expression transitoire de la Flp recombinase. En plus des cellules NIH3T3 Flp-In non transfectées, nous avons utilisé un second contrôle au cours de cette étude. Il s'agit d'un plasmide permettant l'expression stable de la chloramphénicol acétyl transférase (pEF/FRT/CAT). Deux jours après la transfection, les cellules transfectées ont été sélectionnées en ajoutant 200 µg/ml d'hygromycine B au milieu de culture. Deux semaines après le début de la sélection, des clones cellulaires se sont formés pour les différentes transfections. Ces clones ont été trypsinisés, rassemblés et amplifiés en vue de les caractériser.

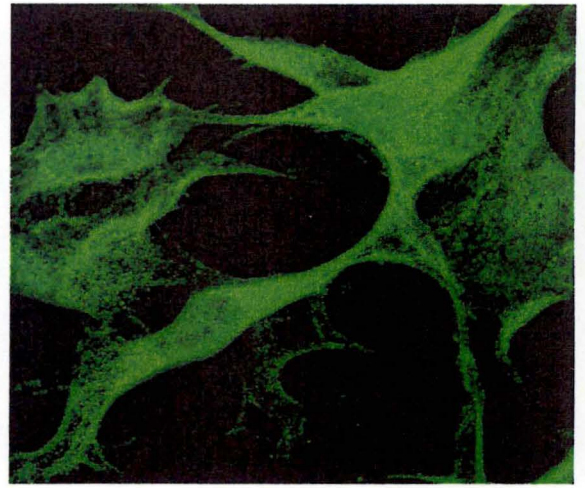
Dans un premier temps, la surexpression de ces trois cDNA d'intérêt a été testée par la technique du *western blot*. Des extraits protéiques ont été réalisés en présence d'inhibiteurs de protéases à partir des cellules transfectées. Les protéines ont été récupérées sur gel de polyacrylamide 4-12 %, puis transférées sur membrane de nitrocellulose. Celles-ci ont ensuite été incubées en présence d'anticorps dirigés contre la forme humaine de la ferritine (polyclonal de lapin), l' α -synucléine (IgG₁ monoclonal de souris) et la protéine p66 SHC (polyclonal de lapin). Après incubation avec les anticorps secondaires *ad hoc* couplés à la peroxydase, révélation à l'aide d'un substrat chémoluminescent et autoradiographie, l'intensité des bandes correspondant à nos protéines d'intérêt a été comparée à l'intensité des bandes obtenues à partir des cellules contrôles.

Comme le démontre la **figure C.II.1**, la chaîne légère de la ferritine et l' α -synucléine sont surexprimées dans les cellules transfectées. Les chaînes légères et lourdes de la ferritine murine seraient également détectées. La chaîne légère de la ferritine humaine étant de poids moléculaire légèrement supérieur à la chaîne murine, elle apparaît sous la forme d'une bande

(1)



NIH3T3 CAT

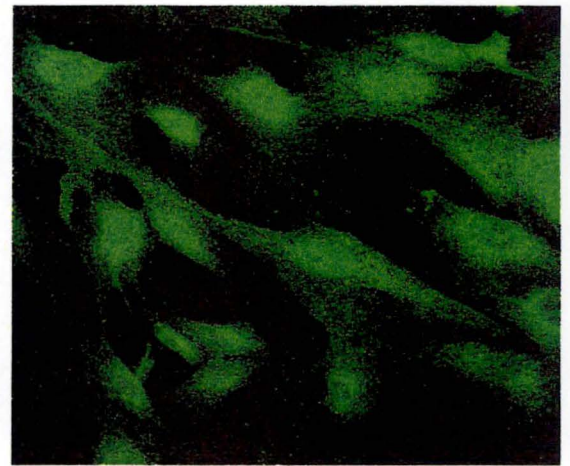


NIH3T3 SYN (T2)

(2)



NIH3T3 CAT



NIH3T3 FTL (T1)

Figure C.II.2 : Marquage immunofluorescent (1) des cellules NIH3T3 contrôles (CAT) , des cellules NIH3T3 surexprimant l' α -synucléine (α -SYN) marquée avec un anticorps dirigée contre la forme humaine de l' α -synucléine, (2) des cellules NIH3T3 surexprimant la chaîne légère de la ferritine (FTL) marquées par des anticorps dirigés contre la forme humaine de la chaîne légère de la ferritine.

distincte, aux environ de 18 kDa. L' α -synucléine apparaît comme attendu à 17 kDa sous la forme d'une bande unique. Il est intéressant de remarquer que contrairement à la ferritine, l'expression endogène d' α -synucléine n'est pas ou faiblement détectable selon les expériences avec l'anticorps utilisé dans les fibroblastes contrôles. La surexpression de la protéine p66 SHC n'a pu être démontrée par *western blot*.

Les données ont été corrélées avec la technique d'immunofluorescence en microscopie confocale (**Figure C.II.2**). La surexpression de la chaîne légère de la ferritine et de l' α -synucléine est clairement démontrée en comparant l'intensité de la fluorescence des cellules transfectées par rapport aux cellules contrôles. Nos résultats confirment la localisation cytoplasmique de ces deux protéines. Comme dans le cas du *western blot*, les signaux observés pour les cellules transfectées avec le cDNA du gène codant pour p66 SHC ne se distinguent pas par rapport aux contrôles.

III) Analyse des effets de la surexpression sur la résistance aux stress cytotoxiques au *t*-BHP, à l' H_2O_2 , aux UVB et à l'éthanol.

La surexpression de la chaîne légère de la ferritine et l' α -synucléine ayant été clairement démontrée, les cellules transfectées ont été soumises à des stress à doses cytotoxiques de *t*-BHP, d' H_2O_2 , d'UVB et d'éthanol (voir graphiques page suivante). Des tests préliminaires ont été réalisés au préalable afin de définir les doses cytotoxiques des différents agents stressants et d'établir une gamme pertinente de concentrations.

Pratiquement, les cellules transfectées et contrôles ont été mises en présence de concentrations croissantes de molécules stressantes ou exposées à des doses croissantes d'UVB durant deux heures. Après lavage pour éliminer toute trace d'agent stressant, les cellules ont été incubées dans du milieu de culture complet durant 24 heures. Les tests de survie cellulaire au MTT ont alors été réalisés afin d'estimer le pourcentage de survie en fonction de la concentration de l'agent stressant. Les courbes de survie en fonction des doses appliquées sont illustrées ci-dessous.

Les résultats les plus surprenants proviennent des tests réalisés sur les cellules NIH3T3 transfectées par le cDNA codant pour p66 SHC. En effet, bien que la surexpression de la protéine n'ait pu être démontrée, nos expériences, réalisées à plusieurs reprises, démontrent un effet de protection majeur contre la cytotoxicité du *t*-BHP. Aucun effet n'a par contre pu être obtenu suite aux stress réalisés à l' H_2O_2 , aux UVB ou à l'éthanol (**Figure C.III.1**).

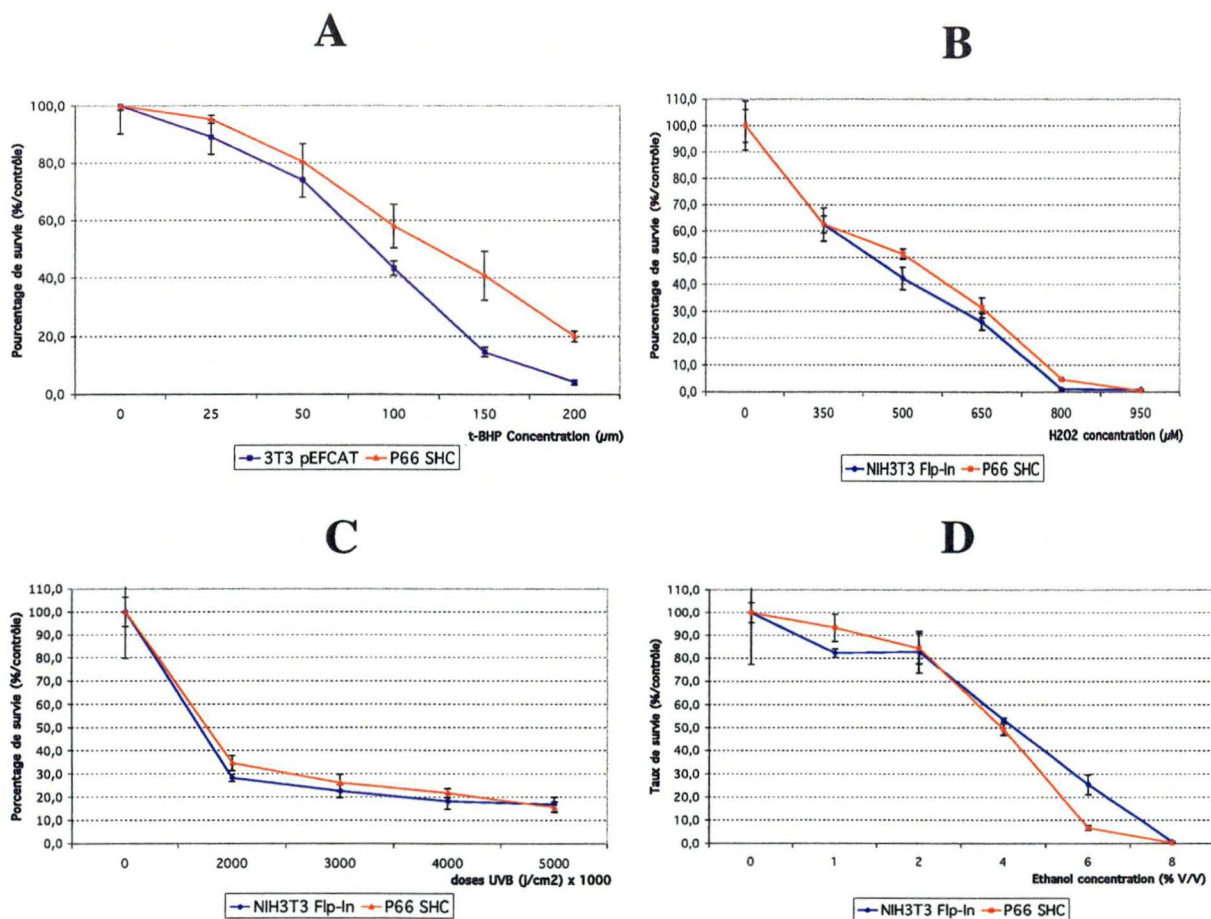


Figure III.1 : STRESS CYTOTOXIQUES SUR LES NIH3T3 TRANSFECTÉES PAR L'ADNc de p66 SHC. Les cellules ont été soumises à des stress au *t*-BHP (A), à l'H₂O₂ (B), aux UVB (C) ou à l'EtOH (D) pendant 2 heures, suivis d'une période de récupération de 24 heures au terme de laquelle un test de survie cellulaire a été effectué par la méthode au MTT. Le pourcentage de survie est calculé par rapport à la valeur obtenue pour les cellules non stressées.

La surexpression de la chaîne légère de la ferritine ne confère pas de protection contre les stress au *t*-BHP, à l'H₂O₂ ou à l'éthanol. Par contre, nous avons pu mettre en évidence un effet significatif contre des stress réalisés à des doses croissantes d'UVB. Cette protection se manifeste jusqu'à 1,75 kJ/cm² et n'est plus visible au-delà de cette dose (Figure C.III.2).

Les effets les plus spectaculaires ont été démontrés après stress des cellules NIH3T3 surexprimant l' α -synucléine. En effet, ces cellules présentent une résistance nettement accrue suite à des stress réalisés au *t*-BHP, à l'H₂O₂, aux UVB, et dans une plus faible mesure, à l'éthanol. Les micrographies reprises à la Figure C.III.3 illustrent l'état des cellules contrôles ou surexprimant l' α -synucléine suite à un stress de deux heures réalisé à doses croissantes de *t*-BHP suivi d'une période de récupération de 24 heures. Dans cette même expérience, le pourcentage de survie cellulaire a été déterminé en parallèle par la méthode au MTT et par un dosage de la quantité de protéines cellulaires, réalisé par la méthode au réactif de Folin. La

quantité de protéines reflète en effet le nombre de cellules vivantes au sein de l'échantillon et confirme les tests que nous avons réalisés au MTT (Figure C.III.4).

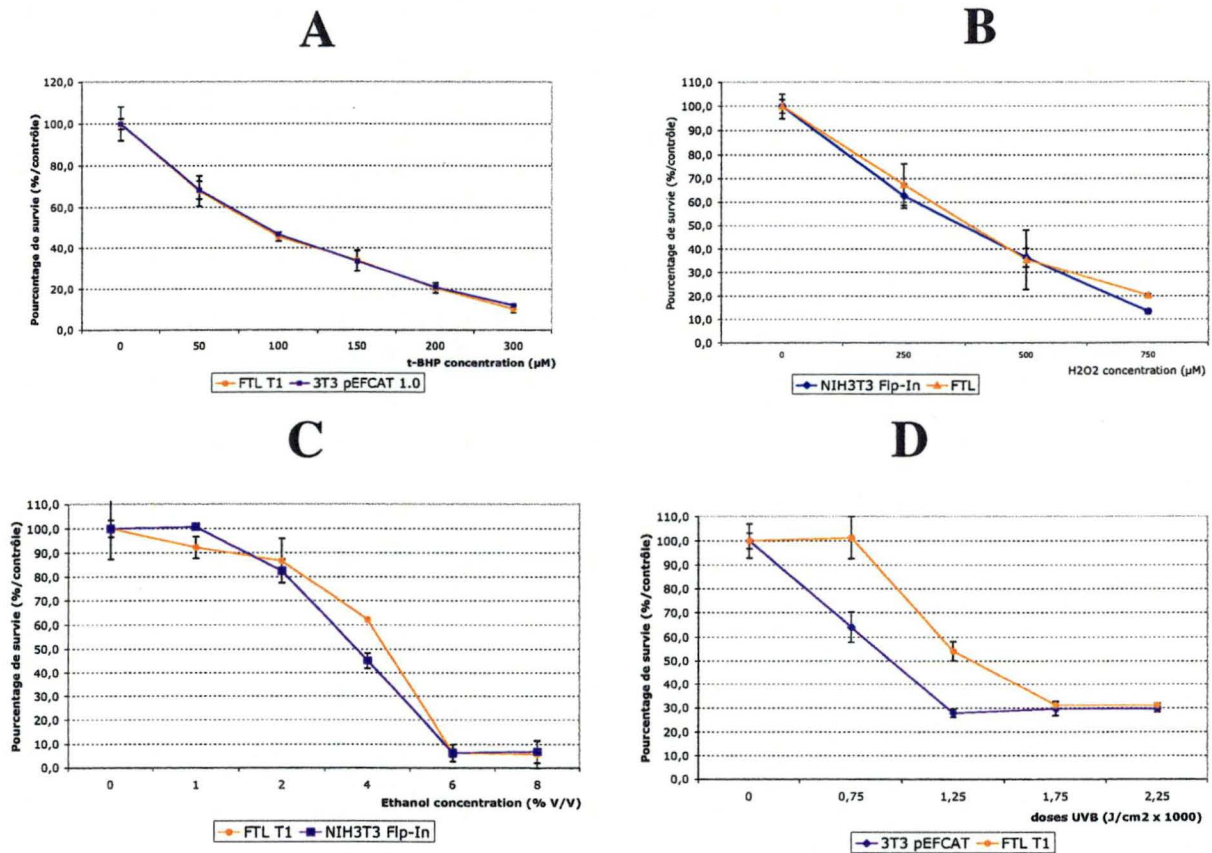


Figure C.III.2 : STRESS CYTOTOXIQUES SUR LES NIH 3T3 SUREXPRIMANT LA CHAÎNE LÉGÈRE DE LA FERRITINE . Les cellules ont été soumises à des stress au *t*-BHP (A), à l' H_2O_2 (B), à l'EtOH (C) ou aux UVB (D) pendant 2 heures, suivis d'une période de récupération de 24 heures au terme de laquelle un test de survie cellulaire a été effectué par la méthode au MTT. Le pourcentage de survie est calculé par rapport à la valeur obtenue pour les cellules non stressées.

t-BHP

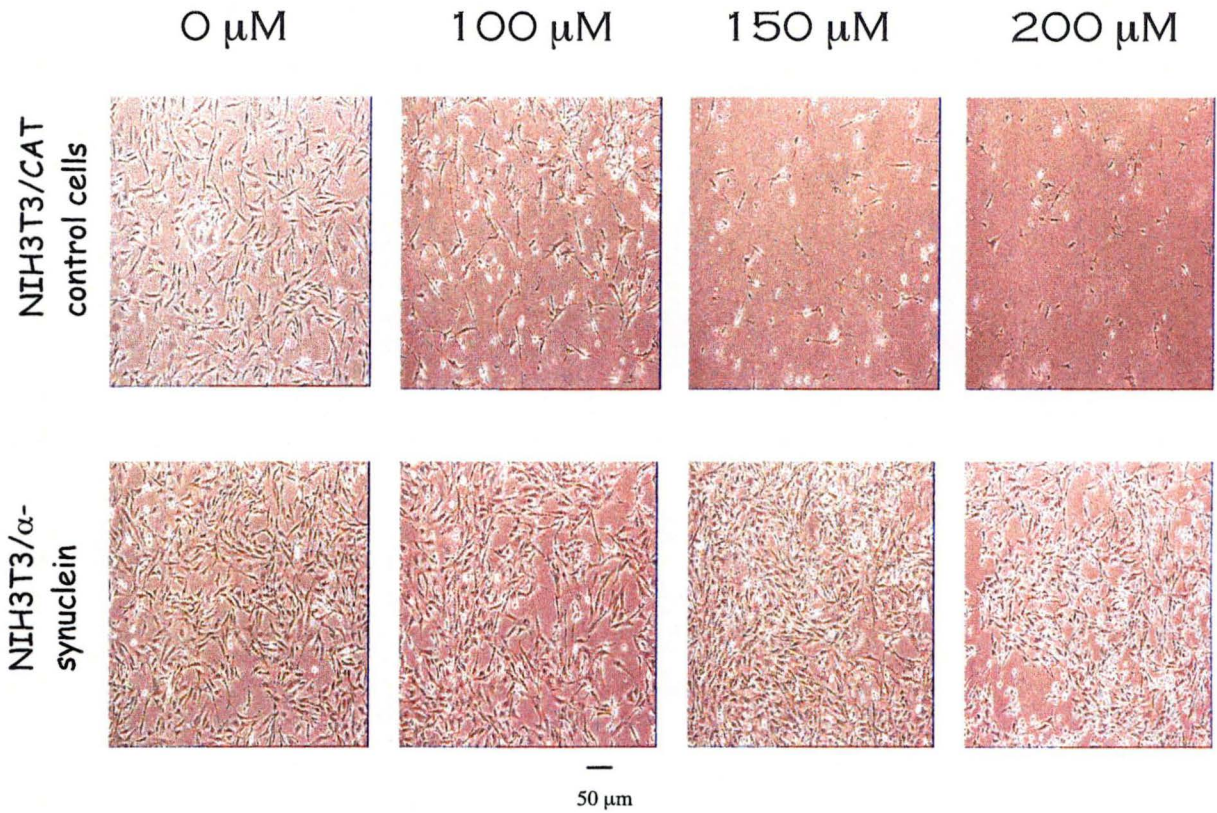


Figure C.III.3 : Micrographies mettant en évidence la protection conférée la surexpression de l' α -synucléine face à un stress unique au *t*-BHP. Les micrographies ont été prises 24 heures après le stress.

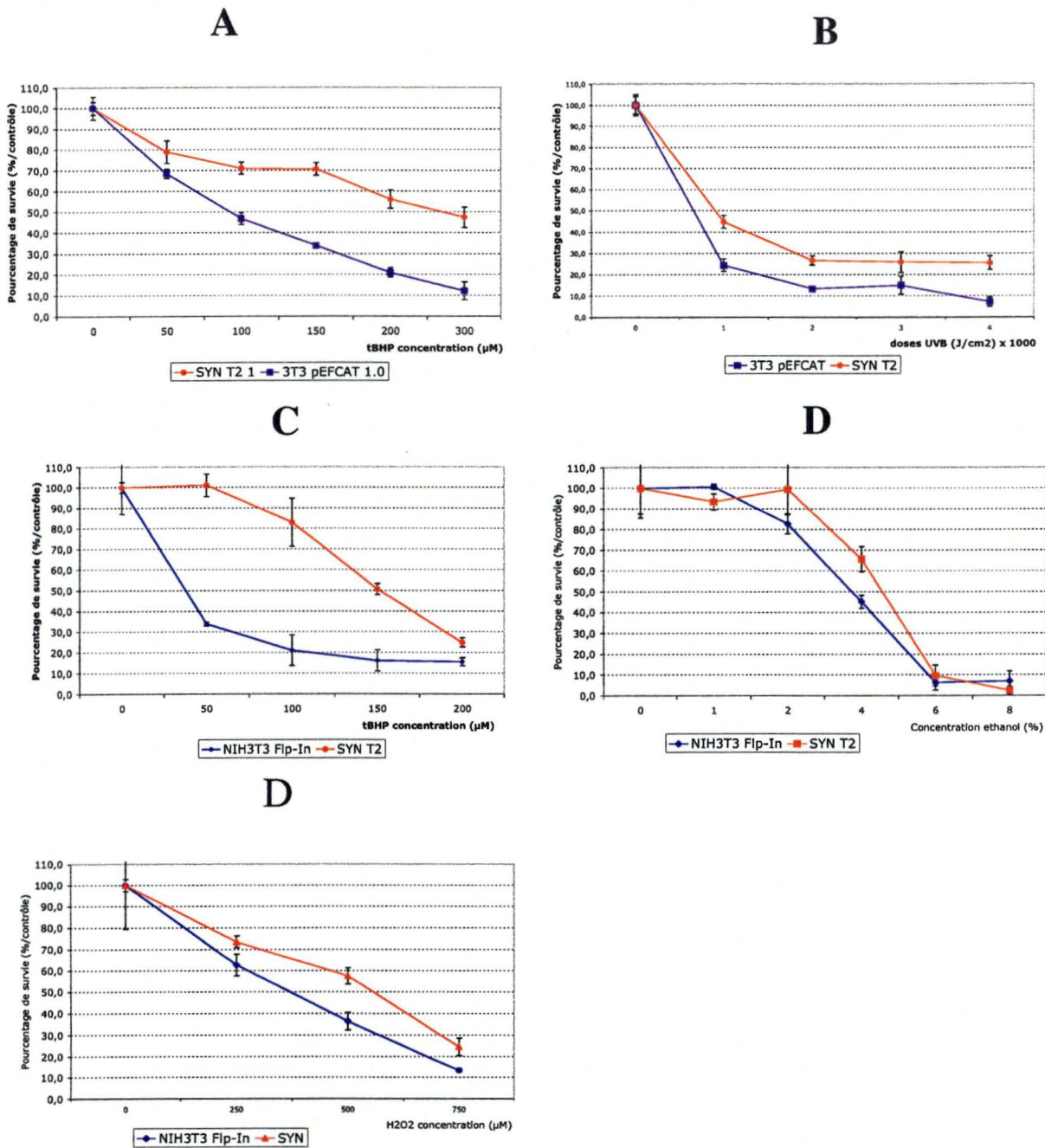


Figure C.III.4 : STRESS CYTOTOXIQUE SUR LES NIH3T3 SUREXPRIMANT L' α -SYNUCLEINE : Les cellules ont été soumises à des stress au *t*-BHP (A,C), aux UVB (B), à l'EtOH (D), et à l'H₂O₂ (E) pendant 2 heures, suivis d'une période de récupération de 24 heures au terme de laquelle un test de survie cellulaire a été effectué par la méthode au MTT (A, B, D, E) ou par dosage protéique par la méthode au réactif de Folin (C). Le pourcentage de survie est calculé par rapport à la valeur obtenue pour les cellules non stressées.

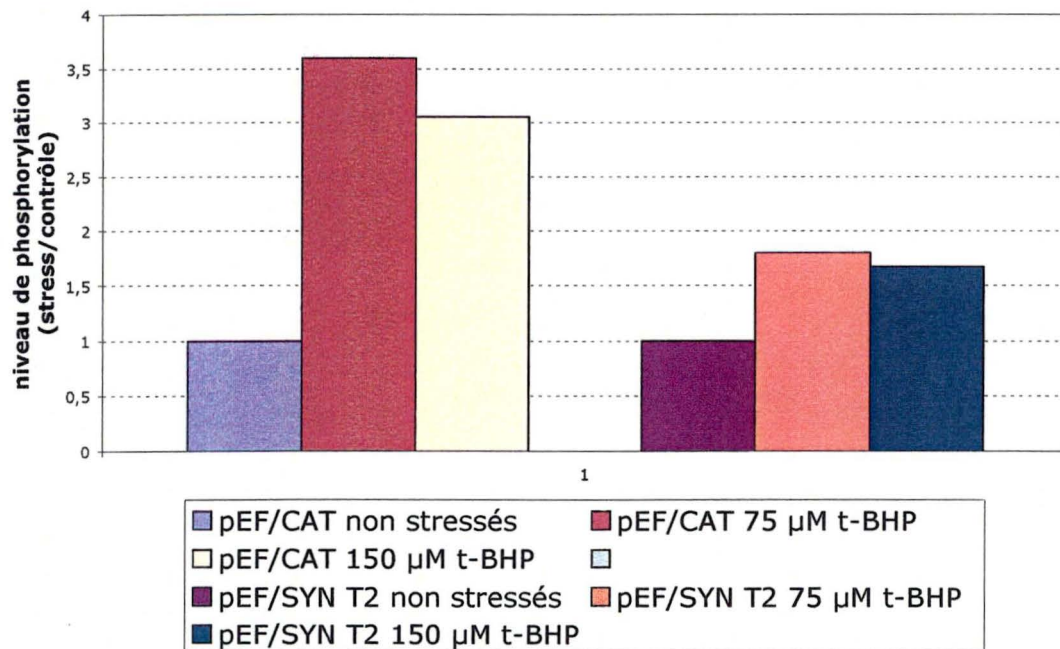
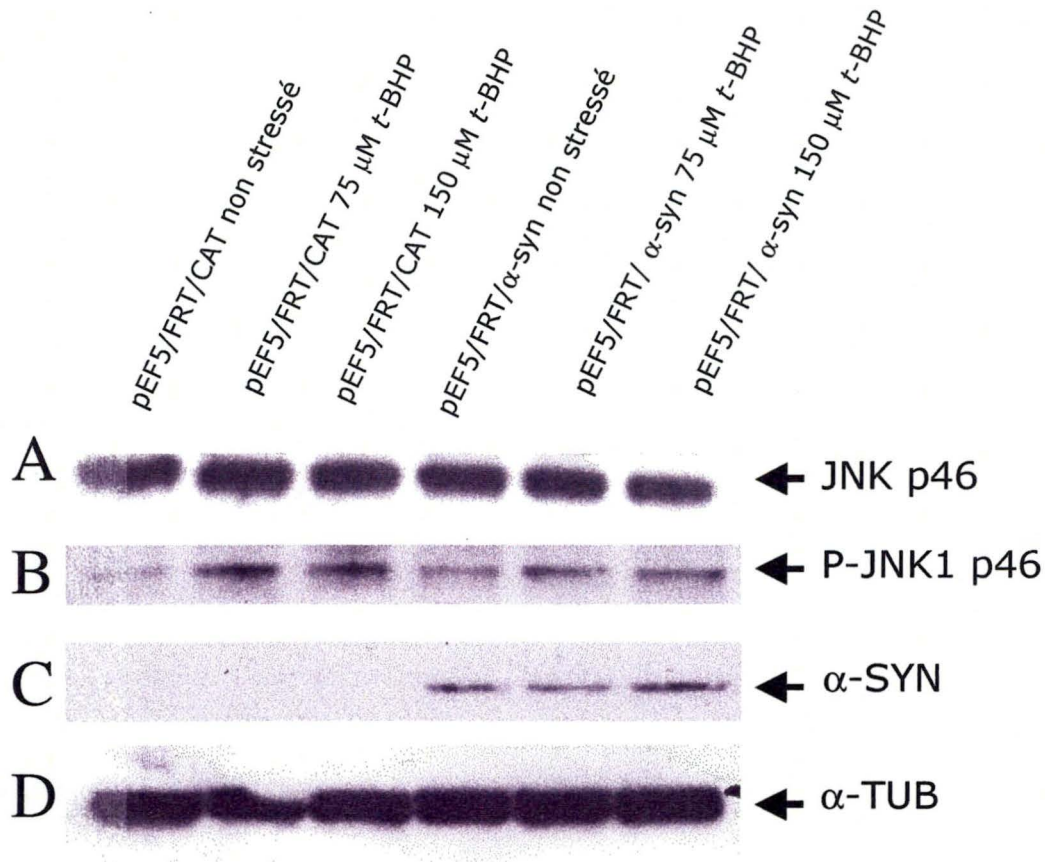


Figure C.IV.1 : Mise en évidence par *western blot* de la différence de niveau de phosphorylation de la JNK après stress sous *t*-BHP chez les cellules NIH3T3 surexprimant ou non l' α -synucléine. Les cellules ont été stressées durant 30 min en présence de 75 ou 150 μM de *t*-BHP. Les anticorps utilisés sont l'anti-JNK (A), l'anti-P-JNK (B) en dilution 1/1000 (Cell Signalling Technology, Beverly, USA), l'anti- α -SYN (C) en dilution 1/500 (BD Biosciences, USA) et l'anti- α -tubuline (D) en dilution 1/20000 (Innogenex). Substrat de révélation ECL Advance et Lumiglo (Cell Signalling Technology, Beverly, USA)

Etude du mécanisme de protection contre les stress conféré par la surexpression de l' α -synucléine

Dans des cellules hypothalamiques humaines GT1-7, la surexpression de l' α -synucléine protège contre des stress à l' H_2O_2 par inactivation de la cascade de transduction du signal impliquant une *c-Jun* NH₂-terminal-kinase (JNK) et conduisant à la phosphorylation des facteurs de transcription *c-jun* et ATF-2 (Hashimoto et al., 2002).

Nous avons donc analysé par *western blot* l'état de phosphorylation de la JNK après un stress de trente minutes réalisé au *t*-BHP sur des cellules surexprimant ou non l' α -synucléine. Afin de déterminer la quantité relative de la forme phosphorylée par rapport à la quantité de JNK totale, nous avons utilisé d'une part un anticorps dirigé contre la protéine JNK, et d'autre part un anticorps spécifique dirigé contre sa forme doublement phosphorylée sur les résidus thréonine 183 et tyrosine 185. L'intensité des bandes obtenues avec l'anticorps anti-phospho JNK a ainsi été rapportée à l'intensité du signal obtenu avec l'anticorps reconnaissant la JNK indépendamment de son état de phosphorylation. La figure montre l'augmentation de la quantité de JNK phosphorylée dans les cellules stressées par rapport aux cellules non stressées.

Que les cellules surexpriment ou non l' α -synucléine, nos résultats montrent une augmentation du signal correspondant à la forme phosphorylée de la JNK suite à un stress réalisé à des concentrations de 75 et 150 μ M de *t*-BHP (**Figure C.IV.1**) Une étude de densitométrie d'image nous a permis de quantifier ces résultats qui suggèrent un effet inhibiteur de la surexpression de l' α -synucléine sur l'activation de la cascade de stress modulée par la JNK. En effet, l'augmentation du signal obtenue après stress chez les cellules contrôles ne surexprimant pas l' α -synucléine est nettement plus forte que l'augmentation du signal observée après stress chez les cellules surexprimant l' α -synucléine.

Discussion
Conclusion et perspectives

Nos cellules utilisent des mécanismes leur permettant de survivre à des stress intenses et/ou de ne pas entrer en sénescence induite prématurément par les stress. Au laboratoire, nous avons identifié une série de gènes dont le niveau d'expression varie lorsque les fibroblastes humains WI-38 sont soumis à des stress subcytotoxiques au *t*-BHP ou à l'éthanol induisant leur sénescence prématurée. Dans ce contexte, l'objectif de notre travail est double.

D'une part, nous visons à tester l'effet de la surexpression de trois protéines, la chaîne légère de la ferritine, l' α -synucléine et la protéine adaptatrice p66 SHC sur la résistance des fibroblastes NIH3T3 suite à des stress cytotoxiques réalisés au *t*-BHP, à l'éthanol, à l' H_2O_2 et aux UVB. Ces trois gènes ont été choisis sur base de l'amplitude de leur variation du niveau d'expression en sénescence répllicative et/ou en sénescence prématurée, de leur intérêt scientifique et des données publiées concernant leur fonction. Nous espérons, au terme de cette analyse fonctionnelle, identifier un ou plusieurs gène protecteur, qui sera par la suite étudié pour la résistance qu'il pourrait conférer contre des stress subcytotoxiques induisant la SIPS et à plus long terme pour sa capacité à modifier la longévité et la résistance au stress d'un organisme modèle. D'autre part, nous avons pour second objectif de valider la combinaison de la technique de clonage Gateway et du système de transfection Flp-In, dont l'avantage est de permettre une sélection polyclonale des cellules surproductrices. En effet, vu le nombre de gènes identifiés au laboratoire et dont l'expression varie en SIPS, il est d'importance stratégique dans le cadre de projet européen « FUNCTIONAGE » de développer des systèmes efficaces nous permettant de cloner, transfecter, surexprimer et tester l'effet de ces gènes dans des modèles de culture de cellules *in vitro*.

Nos trois cDNA d'intérêt ont tout d'abord été clonés dans le vecteur d'expression pEF5/FRT/V5-DEST en aval du promoteur constitutif EF1 α . Le vecteur contient le site FRT qui assure l'intégration du transgène par recombinaison médiée par la Flp recombinase. Les plasmides d'expression ont ensuite été transfectés dans les cellules NIH3T3 Flp-In. Un plasmide codant pour la Flp recombinase a été cotransfecté afin d'assurer l'expression transitoire de l'enzyme. Le plasmide pEF5/FRT/CAT-V5 nous a servi de contrôle dans nos expériences. Il permet d'exprimer le gène codant pour la chloramphénicol acétyl transférase n'ayant aucun effet, ni aucune fonction dans les cellules eucaryotes. Dans tous les cas, des clones résistants à l'hygromycine B se sont développés. Ils ont été rassemblés et amplifiés en vue de vérifier l'expression.

La surexpression de la chaîne légère de la ferritine et de l' α -synucléine a été confirmée à la fois par la technique du western blot et par immunofluorescence en microscopie confocale. La surexpression de la protéine p66 SHC n'a par contre pas pu être démontrée.

Nous nous sommes ensuite concentrés sur l'étude de l'effet de la surexpression de nos trois gènes d'intérêt sur la résistance des cellules NIH3T3 suite à des stress cytotoxiques au *t*-BHP, à l'éthanol, à l' H_2O_2 et aux UVB. Concernant p66 SHC, nous ne nous attendions à aucun effet remarquable, vu que la surexpression n'a pu être mise en évidence. Cependant, les résultats obtenus après stress au *t*-BHP sont surprenants et vont de plus à l'encontre des données publiées relatives à l'invalidation du gène p66 SHC chez la souris. Les souris *knock out* pour p66 SHC sont en effet plus résistantes face à des stress réalisés par une alimentation riche en paraquat. Ces souris *knock out* présentent en outre une longévité moyenne et maximale supérieure par rapport aux animaux contrôles. Les fibroblastes issus de ces animaux sont aussi plus résistants lorsqu'ils sont soumis à des stress cytotoxiques au peroxyde d'hydrogène (Migliaccio *et al.*, 2002), ce qui est en accord avec le rôle pro-apoptotique de la protéine p66 SHC en condition de stress. La phosphorylation de cette protéine par l'activité de la c-Jun-N-

terminal Kinase (JNK1) sur les résidus sérine (218 et 222) en réponse à un stress à l'H₂O₂ a pour effet de favoriser l'apoptose des fibroblastes en culture, et ce par une voie dépendante de la protéine p53 (Mielke *et al.*, 2000). Dans nos expériences, la transfection du cDNA du gène p66 SHC confère aux fibroblastes murins NIH3T3 une résistance accrue face à un stress au *t*-BHP. En supposant qu'il y ait bien surexpression de p66 SHC, nous pourrions imaginer que la protéine p66 SHC humaine surexprimée dans des cellules murines ait un effet dominant négatif sur les propriétés pro-apoptotiques de la protéine. Nous pourrions ainsi émettre l'hypothèse que la protéine humaine n'est pas phosphorylée sur sérine dans des cellules murines, tout en mobilisant la réserve de JNK1 active. Afin d'expliquer ce résultat, nous testerons à court terme l'état de phosphorylation de la protéine en condition de stress. La transfection du cDNA du gène p66 SHC en lignée de fibroblastes humains est également en cours de réalisation.

La surexpression de la chaîne légère de la ferritine ne confère pas de protection contre les stress cytotoxiques au *t*-BHP, à l'H₂O₂ ou à l'éthanol. Cependant, les cellules transfectées résistent mieux à des stress réalisés aux UVB, en particulier aux doses inférieures en UVB à 1,75 kJ/cm².

L'effet protecteur que nous observons est spécifique des stress aux UVB, et pourrait s'expliquer de la façon suivante. Les UVB sont des radiations qui ont pour effet de générer de l'H₂O₂. En effet, ils stimulent l'activité de la chaîne respiratoire et la production d'anions superoxydes O₂^{•-}. Ceux-ci sont alors dismutés par la superoxyde dismutase en O₂ et en H₂O₂. La concentration en H₂O₂ augmente d'autant plus que les UV ont pour effet de réduire l'activité de la catalase dans les fibroblastes (Shinolo *et al.*, 1997). Des radicaux libres °OH extrêmement réactifs sont ensuite formés par la réaction de Fenton. Celle-ci génère des radicaux °OH extrêmement réactifs et des ions OH⁻ et ce grâce aux électrons fournis par les ions Fe²⁺.



Outre les dommages causés par les radicaux °OH, la toxicité des ions Fe³⁺ générés par la réaction est en grande partie liée à sa capacité de participer à la formation d'espèces très réactives autres que le °OH endommageant directement l'ADN, les lipides et les protéines, et aboutissant à une toxicité cellulaire importante (pour une revue, Torti *et al.*, 2002). De plus, le fer en excès peut convertir les sous-produits de la respiration cellulaire comme l'anion superoxyde (O₂^{•-}) en radicaux hydroxyles °OH. La ferritine a pour fonction de réguler la disponibilité intracellulaire du fer et de contrôler ainsi la formation de radicaux libres liée à son oxydation.

La ferritine est un hétéropolymère comprenant des chaînes lourdes et légères. Elle est constituée de 24 sous-unités formant une cavité sphérique de 8 nm pouvant contenir jusqu'à 4000 atomes de fer. La chaîne lourde possède une activité ferroxidase catalysant l'oxydation du Fe²⁺ en Fe³⁺. La chaîne légère intervient ensuite dans le stockage des ions Fe³⁺ par la présence de résidus acides sur la surface interne de la cavité sphérique. Ceux-ci facilitent la nucléation du fer et permettent ainsi la régénération du site ferroxidase de la chaîne lourde (pour une revue, Arosio *et al.*, 2002). La surexpression de la chaîne légère de la ferritine pourrait donc limiter la quantité de fer intracellulaire et ainsi réduire de ce fait la production de radicaux libres liée à son oxydation. Elle pourrait également favoriser la régénération du site ferroxidase de la chaîne lourde. La surexpression de la chaîne légère permettrait ainsi de réduire la quantité d'ions Fe²⁺ et de limiter la réaction de Fenton et donc la production de radicaux °OH et d'ions Fe³⁺ libres lors de stress sous UVB. Au delà de 1,75 kJ/cm² d'UVB, l'H₂O₂ produit en plus grande quantité pourrait participer à la formation de radicaux libres par

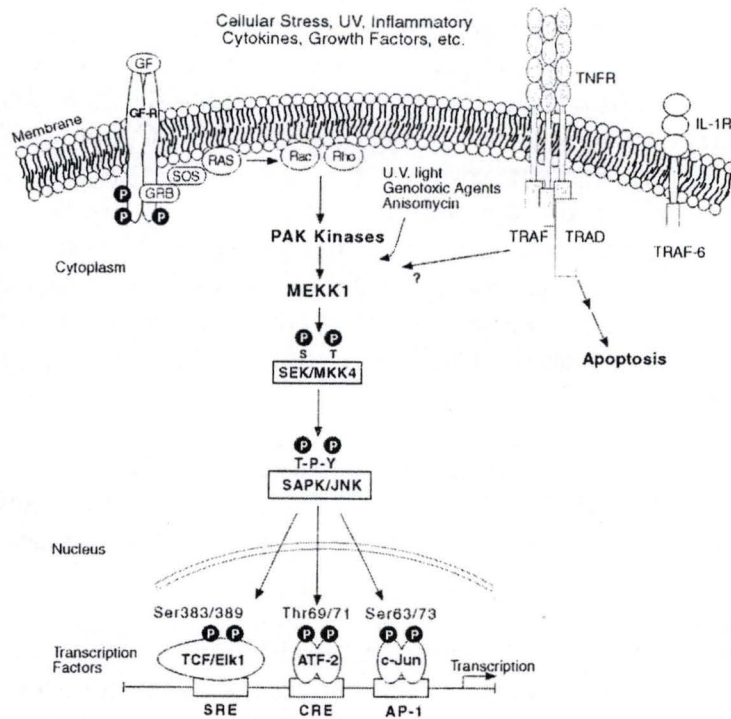


Figure D.I.1 : Les stress cellulaires mènent à la phosphorylation de SAPK/JNK. L'activation de cette kinase résulte en la phosphorylation de facteurs de transcription variés tels que ATF-2 et c-Jun (Cell Signalling Technology, Beverly, USA)

d'autres réaction que la réaction de Fenton. Ceux-ci seraient responsables de l'accumulation de dommages à la cellules conduisant à sa dégénérescence et à sa mort.

Vu la résistance conférée par la chaîne légère de la ferritine contre la cytotoxicité des UVB, il nous paraît pertinent de tester dans le futur les effets de sa surexpression contre le vieillissement prématuré de fibroblastes de peau face aux UVB. Nous disposons en effet au laboratoire de cellules BJ immortalisées par la sous-unité catalytique de la télomérase (BJ h-TERT), pour lesquelles un modèle d'induction de la SIPS aux UVB est maîtrisé. Nous pouvons ainsi espérer que l'expression de la chaîne légère de la ferritine puisse conférer une résistance contre l'apparition des caractéristiques de la sénescence. En effet, si la production d' H_2O_2 intracellulaire suite au stress est limitée par la disponibilité réduite des ions Fe^{2+} , nous pourrions faire l'hypothèse que l' H_2O_2 ne puisse dès lors plus jouer son rôle de second messenger dans l'initiation de la transduction du signal menant à l'apparition des caractéristiques de la SIPS.

Bien que l' α -synucléine soit principalement exprimée dans les terminaisons synaptiques des cellules neuronales, l'étude par damier à ADN sur les fibroblastes WI-38 a mis en évidence une augmentation du niveau d'ARN messenger lorsque ces cellules sont stressées à doses subcytotoxiques d' H_2O_2 . Il nous a dès lors paru intéressant de tester dans des fibroblastes les effets de sa surexpression sur la cytotoxicité d'agents stressants comme le *t*-BHP, l' H_2O_2 , l'EtOH et les UVB. Dans le système nerveux, l' α -synucléine pourrait faciliter le transport vésiculaire au synapse. Des souris *knock out* pour l' α -synucléine présente un défaut dans la sécrétion et la reprise de dopamine, suggérant ainsi un rôle dans la neurotransmission de la molécule. Les homologues qu'elle présente avec les protéines 14.3.3 (également surexprimées en SIPS) suggèrent également une fonction de protéine chaperone.

L'implication de l' α -synucléine dans les maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson est clairement démontrée et en fait une cible pharmacologique d'intérêt. Elle est en effet un composant majeur des corps de Lewy présents dans les neurones dopaminergiques dans la *substantia nigra* des patients atteints de la maladie de Parkinson. On a découvert des mutations ponctuelles dans le gène codant pour l' α -synucléine chez des patients atteints d'une forme familiale de la maladie suggérant une implication directe de l' α -synucléine dans la pathogénie. Les mécanismes à la base de la dégénérescence neuronale restent cependant encore inconnus et l' α -synucléine n'est vraisemblablement pas le seul facteur déterminant la vulnérabilité des neurones. En effet, bien que l' α -synucléine soit exprimée dans tout le système nerveux central, la neurodégénérescence se limite à une région du cerveau, à savoir les neurones dopaminergiques de la *substantia nigra*. Un article récent publié dans *Nature* suggère que la neurotoxicité de l' α -synucléine résulte d'une interaction avec la dopamine (pour une revue Barr *et al.*, 2001). En outre, ils suggèrent que la toxicité de l' α -synucléine est également étroitement liée à la formation d'un complexe insoluble avec la protéine chaperone 14.3.3. La séquestration de la protéine 14.3.3 dans ce complexe aurait ainsi pour effet de limiter la quantité de protéine 14.3.3 disponible pour se lier et inhiber l'action des protéines pro-apoptotiques Bad, rendant ainsi les cellules plus sensibles au stress (pour une revue Barr *et al.*, 2001). Par contre, de façon surprenante, ils montrent également par des expériences de surexpression que tant la forme native que les mutants associés à la maladie de Parkinson, protègent contre la dégénérescence des cellules HCN non-dopaminergiques (neurones corticaux) suite à des stress à l' H_2O_2 .

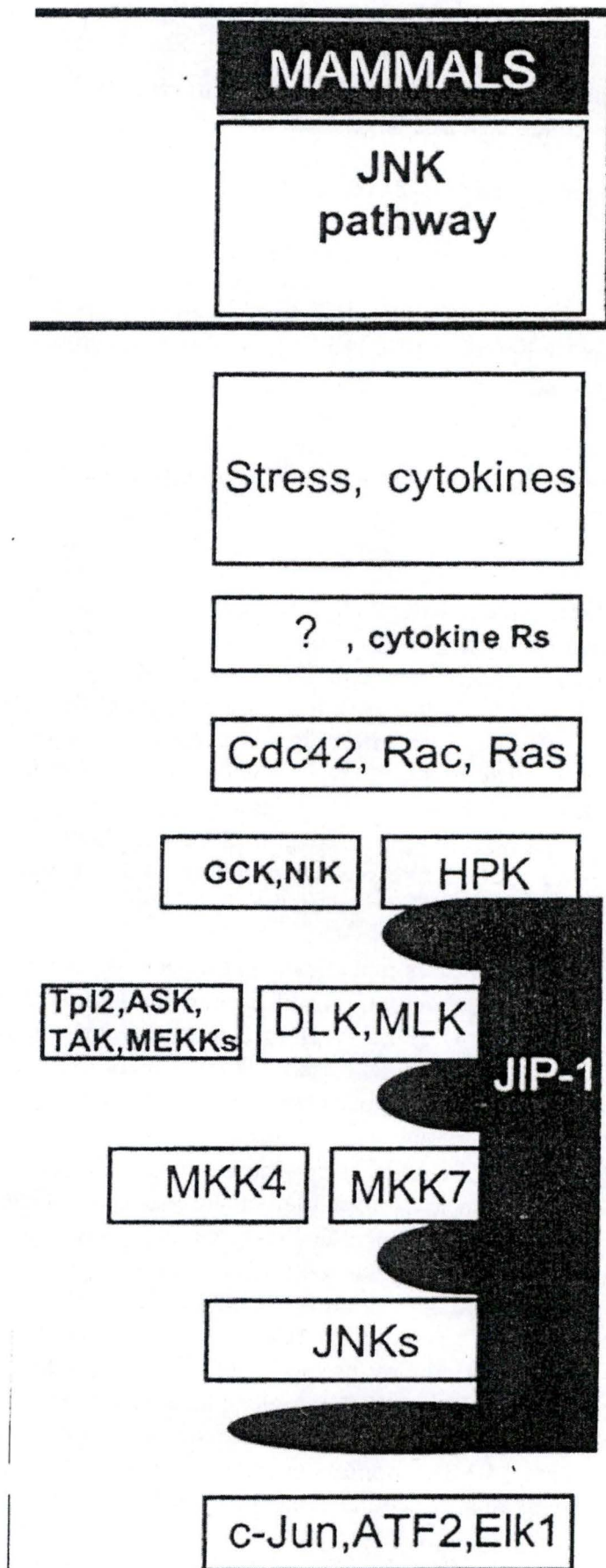


Figure D.I.2 : Schéma illustrant la fonction organisatrice de JIP1/IB1 dans la cascade de transduction du signal liée modulée par la JNK (Barr *et al.*, 2001).

Au même moment, Hashimoto *et al.* (2002) ont surexprimé l' α -synucléine dans une lignée de cellules hypothalamiques murines et ont analysé l'implication de la voie pro-apoptotique de réponse au stress modulée par la JNK suite à des stress à l' H_2O_2 (**Figure D.1.1**). Ils montrent que les cellules transfectées par l' α -synucléine sont plus résistantes à l' H_2O_2 , et que, contrairement aux cellules contrôles, la JNK n'est pas activée. L'inactivation de la JNK en condition de stress est associée à une augmentation de l'expression et de l'activité de la protéine JIP1/IB1 (*JNK-Interacting Protein/Islet-Brain1*), une protéine organisatrice pour la cascade de transduction du signal liée au stress modulée par la JNK. JIP1/IB1 ne possède pas d'activité enzymatique, mais se lie à plusieurs éléments de la cascade modulée par la JNK. Elle permet ainsi de les rassembler et de former un module fonctionnel facilitant les différentes réactions enzymatiques tout en minimisant les interférences avec d'autres voies de transduction (**Figure D.1.2**). La surexpression de JIP1/IB1 a cependant pour effet de limiter la translocation de la JNK vers le noyau malgré la présence de signaux de stress, empêchant ainsi la phosphorylation de c-JUN et d'ATF-2 (Dickens *et al.*, 1997). Un équilibre entre les différentes kinases et la protéine JIP1/IB1 est donc critique pour le bon fonctionnement de la cascade.

Dans nos fibroblastes murins NIH3T3 Flp-In, la surexpression de l' α -synucléine protège de façon spectaculaire contre la cytotoxicité au *t*-BHP, mais également contre l' H_2O_2 , les UVB et dans une plus faible mesure, contre l'éthanol. Ces résultats vont donc dans le même sens que les observations réalisées sur les cellules hypothalamiques ou neurocorticales ne synthétisant pas de dopamine. Il est intéressant d'élargir ces données à des cellules fibroblastiques et de montrer que la protection contre les stress n'est pas limitée aux cellules composant le système nerveux central. L'utilisation d'anticorps spécifiques de la forme doublement phosphorylée de la JNK nous a permis de montrer que l'activation de la JNK suite à un stress au *t*-BHP est moindre dans les cellules surexprimant l' α -synucléine que dans les cellules contrôles. Par la suite, il nous faudra tester si, comme dans les cellules hypothalamiques, l'inactivation de la JNK en condition de stress par la surexpression de l' α -synucléine est également associée à une augmentation de JIP1/IB1. Lorsque nous analyserons les effets à long terme de stress subcytotoxiques et l'apparition des caractéristiques de la SIPS dans les cellules surexprimant l' α -synucléine, nous serons particulièrement attentifs à l'état de phosphorylation des facteurs de transcription ATF-2 et c-JUN, cible de la JNK. ATF-2 a été impliqué dans le modèle élaboré par Frippiat *et al.* (2001) expliquant la surexpression du TGF- β 1 dans l'apparition des marqueurs de la SIPS. L'importance de la cascade de transduction du signal modulée par la JNK dans l'induction de la SIPS et la protection contre des stress cytotoxiques sera également analysée. Afin de reproduire les effets de la surexpression de l' α -synucléine, nous inactiverons la JNK ou d'autres éléments de la cascade à l'aide d'inhibiteurs chimiques, d'ARN antisens, de dominants négatifs ou de ARNsi. Il sera aussi informatif d'analyser les effets de la surexpression de l' α -synucléine sur le profil d'expression génique des cellules stressées. Cette démarche devrait nous permettre d'identifier des gènes en aval de la voie modulée par la JNK et impliqués dans la résistance aux stress

En conclusion, dans le cadre du projet FUNCTIONAGE, plusieurs gènes dont le niveau d'expression varie en SIPS ont déjà été surexprimés dans des lignées de fibroblastes humains WI-38 SV40 ou murins NIH3T3 Flp-In. La résistance des cellules face à des stress cytotoxiques a été analysée (**Figure D.1.3**). Dans ce présent travail, nous nous sommes focalisés sur trois gènes et avons validé une approche originale qui consiste à combiner la technique de clonage Gateway à la transfection d'une lignée Flp-In. Nos résultats ouvrent des


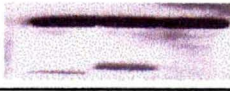
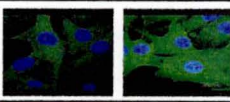

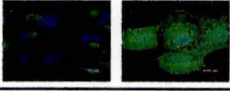
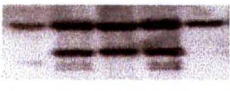
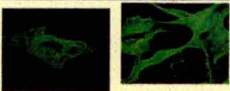
GOI	Function	DB #	Cloning	Host cell line	Expression	Resistance
Pyruvate kinase (PK2M-V5)	Metabolism	P14618	Restriction	WI-38 SV40		H ₂ O ₂ +
Heat shock protein 27 (Hsp27)	Stress response	P04792	Restriction	WI-38 SV40	Not shown	T-BHP ++
Heat shock protein 27 (Hsp27-V5)	Stress response	P04792	TOPO-D	NIH3T3 Flp-In		None
14.3.3 Tau	Cell cycle / docking	P27348	Gateway	NIH3T3 Flp-In		None
Ferritin light chain (FTL)	Iron balance	BC004245	Gateway	NIH3T3 Flp-In		UV-B ++
P66 SHC	Proliferation / apoptosis	U73377	Gateway	NIH3T3 Flp-In	Not shown	t-BHP +++
Peroxioredoxin VI	antioxidant	P30041	Restriction	WI-38 SV40		T-BHP +++ H ₂ O ₂ +
Peroxioredoxin VI & mutants	antioxidant	P30041	TOPO-D	NIH3T3 Flp-In		Wt +++ C47 None S32 +++
α-synuclein	Apoptosis / stress response	AY049786	Gateway	NIH3T3 Flp-In		T-BHP +++ H ₂ O ₂ ++ UV-B ++

Figure D.I.3 :Tableau reprenant les gènes analysés à ce jour dans le cadre du projet FUNCTIUNAGE. La fonction, la technique de clonage, la lignée hôte et les effets de la surexpression sur la cytotoxicité du *t*-BHP, de l'H₂O₂, de l'EtOH et des UVB sont décrits ;

perspectives fort intéressantes qui seront exploitées dans la continuité de ce travail, tant du point de vue mécanistique par rapport aux réactions liées à la réponse au stress, que pour l'analyse de l'effet de la surexpression de ces gènes dans des modèles d'induction de la sénescence prématurée induite par les stress.

Bibliographie

- Allsopp, R.C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W. and Harley, C.B. (1992) Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10114-10118.
- Arosio, P. and Levi, S. (2002) Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radic Biol Med*, **33**, 457-463.
- Asai, K., Hirabayashi, T., Houjou, T., Uozumi, N., Taguchi, R. and Shimizu, T. (2003) Human group IVC phospholipase A2 (cPLA2gamma). Roles in the membrane remodeling and activation induced by oxidative stress. *J Biol Chem*, **278**, 8809-8814.
- Barr, R.K., Bogoyevitch, M.A. (2001) The c-Jun N-terminal protein kinase family of Mitogen-activated protein kinase (JNK MAPK's). *IJBCD*, **33**, 1047-1063
- Bayreuther, K., Rodemann, H.P., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M. and Francz, P.I. (1988) Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 5112-5116.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S. and Wright, W.E. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, **279**, 349-352.
- Brack, C., Lithgow, G., Osiewacz, H. and Toussaint, O. (2000) EMBO WORKSHOP REPORT: Molecular and cellular gerontology Serpiano, Switzerland, September 18-22, 1999. *Embo J*, **19**, 1929-1934.
- Chainiaux, F., Magalhaes, J.P., Eliaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002a) UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 1331-1339.
- Chainiaux, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002b) Exposure of human skin diploid fibroblasts to repeated subcytotoxic doses of ultraviolet-B induces the overexpression of transforming growth factor-beta1 mRNA. *Ann N Y Acad Sci*, **973**, 44-48.
- Chen, Q.M., Tu, V.C., Catania, J., Burton, M., Toussaint, O. and Dilley, T. (2000) Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide. *J Cell Sci*, **113 (Pt 22)**, 4087-4097.
- Cristofalo, V.J., Gerhard, G.S. and Pignol, R.J. (1994) Molecular biology of ageing. *Surg Clin North Am*, **74**, 1-21
- Dierick, J.F., Dieu, M., Remacle, J., Raes, M., Roepstorff, P. and Toussaint, O. (2002a) Proteomics in experimental gerontology. *Exp Gerontol*, **37**, 721-734.
- Dierick, J.F., Eliaers, F., Remacle, J., Raes, M., Fey, S.J., Larsen, P.M. and Toussaint, O. (2002b) Stress-induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes, proteomic evidence. *Biochem Pharmacol*, **64**, 1011-1017.
- Dierick, J.F., Kalume, D.E., Wenders, F., Salmon, M., Dieu, M., Raes, M., Roepstorff, P. and Toussaint, O. (2002c) Identification of 30 protein species involved in replicative senescence and stress-induced premature senescence. *FEBS Lett*, **531**, 499-504.
- Dierick, J.F., Pascal, T., Chainiaux, F., Eliaers, F., Remacle, J., Larsen, P.M., Roepstorff, P. and Toussaint, O. (2000) Transcriptome and proteome analysis in human senescent fibroblasts and fibroblasts undergoing premature senescence induced by repeated sublethal stresses. *Ann N Y Acad Sci*, **908**, 302-305.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. and et al. (1995) A biomarker that

- identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9363-9367.
- Dimri, G.P., Nakanishi, M., Desprez, P.Y., Smith, J.R. and Campisi, J. (1996) Inhibition of E2F activity by the cyclin-dependent protein kinase inhibitor p21 in cells expressing or lacking a functional retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, **16**, 2987-2997.
- Dumont, P., Burton, M., Chen, Q.M., Gonos, E.S., Fripiat, C., Mazarati, J.B., Eliaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2000) Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med*, **28**, 361-373.
- Dumont, P., Royer, V., Pascal, T., Dierick, J.F., Chainiaux, F., Fripiat, C., de Magalhaes, J.P., Eliaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2001) Growth kinetics rather than stress accelerate telomere shortening in cultures of human diploid fibroblasts in oxidative stress-induced premature senescence. *FEBS Lett*, **502**, 109-112.
- Foschi, M., Franchi, F., Han, J., La Villa, G. and Sorokin, A. (2001) Endothelin-1 induces serine phosphorylation of the adaptor protein p66Shc and its association with 14-3-3 protein in glomerular mesangial cells. *J Biol Chem*, **276**, 26640-26647.
- Fripiat, C., Chen, Q.M., Remacle, J. and Toussaint, O. (2000) Cell cycle regulation in H₂O₂-induced premature senescence of human diploid fibroblasts and regulatory control exerted by the papilloma virus E6 and E7 proteins. *Exp Gerontol*, **35**, 733-745.
- Fripiat, C., Chen, Q.M., Zdanov, S., Magalhaes, J.P., Remacle, J. and Toussaint, O. (2001) Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem*, **276**, 2531-2537.
- Fripiat, C., Dewelle, J., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002) Signal transduction in H₂O₂-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med*, **33**, 1334-1346.
- Gabbita, S.P., Robinson, K.A., Stewart, C.A., Floyd, R.A. and Hensley, K. (2000) Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. *Arch Biochem Biophys*, **376**, 1-13.
- Garrido, C., Bruey, J.M., Fromentin, A., Hammann, A., Arrigo, A.P. and Solary, E. (1999) HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *Faseb J*, **13**, 2061-2070.
- Goldstein, S., Ballantyne, S.R., Robson, A.L. and Moerman, E.J. (1982) Energy metabolism in cultured human fibroblasts during aging in vitro. *J Cell Physiol*, **112**, 419-424.
- Greider, C.W. (1996) Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem*, **65**, 337-365.
- Greider, C.W. and Blackburn, E.H. (1996) Telomeres, telomerase and cancer. *Sci Am*, **274**, 92-97.
- Hagemann, C. and Blank, J.L. (2001) The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cell Signal*, **13**, 863-875.
- Hanafusa, H., Ninomiya-Tsuji, J., Masuyama, N., Nishita, M., Fujisawa, J., Shibuya, H., Matsumoto, K. and Nishida, E. (1999) Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J Biol Chem*, **274**, 27161-27167.
- Harley, C.B., Futcher, A.B. and Greider, C.W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, **345**, 458-460.
- Hashimoto, M., Hsu, L.J., Rockenstein, E., Takenouchi, T., Mallory, M. and Masliah, E. (2002) alpha-Synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun N-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells. *J Biol Chem*, **277**, 11465-11472.

- Hastie, N.D., Dempster, M., Dunlop, M.G., Thompson, A.M., Green, D.K. and Allshire, R.C. (1990) Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*, **346**, 866-868.
- Hayflick, L. (1977) The cellular basis for biological aging. in the "Handbook of the biology of aging.", 149-159, Van Nostrand Reinhold Company New-York.
- Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961) The serial cultivation of human diploid cell strain, *Exp. Cell. Res.*, **25**, 585-621
- Kakhlon, O., Gruenbaum, Y. and Cabantchik, Z.I. (2001) Repression of ferritin expression increases the labile iron pool, oxidative stress, and short-term growth of human erythroleukemia cells. *Blood*, **97**, 2863-2871.
- Kirkwood, T.L., Kapahi, P. and Shanley, D.P. (2000) Evolution, stress, and longevity. *J Anat*, **197 Pt 4**, 587-590.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y. and Erusalimsky, J.D. (2000) Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, **113 (Pt 20)**, 3613-3622.
- Lodish, H.F., Hilton, D.J., Klingmuller, U., Watowich, S.S. and Wu, H. (1995) The erythropoietin biogenesis, dimerization, and intracellular signal transduction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **60**, 93-104
- Lotharius, J. and Brundin, P. (2002) Impaired dopamine storage resulting from alpha-synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, **11**, 2395-2407.
- Lucking, C.B. and Brice, A. (2000) Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci*, **57**, 1894-1908.
- Manning-Bog, A.B., McCormack, A.L., Li, J., Uversky, V.N., Fink, A.L. and Di Monte, D.A. (2002) The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem*, **277**, 1641-1644.
- Manning-Bog, A.B., McCormack, A.L., Purisai, M.G., Bolin, L.M. and Di Monte, D.A. (2003) Alpha-synuclein overexpression protects against paraquat-induced neurodegeneration. *J Neurosci*, **23**, 3095-3099.
- Mansouri, A., Ridgway, L.D., Korapati, A.L., Zhang, Q., Tian, L., Wang, Y., Siddik, Z.H., Mills, G.B. and Claret, F.X. (2003) Sustained Activation of JNK/p38 MAPK Pathways in Response to Cisplatin Leads to Fas Ligand Induction and Cell Death in Ovarian Carcinoma Cells. *J Biol Chem*, **278**, 19245-19256.
- Mantle, D. and Preedy, V.R. (1999) Free radicals as mediators of alcohol toxicity. *Adverse Drug React Toxicol Rev*, **18**, 235-252.
- Martin, G.M., Sprague, C.A. and Epstein, C.J. (1970) Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype. *Lab Invest*, **23**, 86-92.
- Masaki, H. and Sakurai, H. (1997) Increased generation of hydrogen peroxide possibly from mitochondrial respiratory chain after UVB irradiation of murine fibroblasts. *J Dermatol Sci*, **14**, 207-216.
- Mehlen, P., Schulze-Osthoff, K. and Arrigo, A.P. (1996) Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem*, **271**, 16510-16514.
- Meyne, J., Ratliff, R.L. and Moyzis, R.K. (1989) Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 7049-7053.
- Mielke, K. and Herdegen, T. (2000) JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog Neurobiol*, **61**, 45-60.
- Migliaccio, E., Giorgio, M., Mele, S., Pelicci, G., Reboldi, P., Pandolfi, P.P., Lanfrancone, L. and Pelicci, P.G. (1999) The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature*, **402**, 309-313.

- Nemoto, S. and Finkel, T. (2002) Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science*, **295**, 2450-2452.
- Ochi, T. and Miyaura, S. (1989) Cytotoxicity of an organic hydroperoxide and cellular antioxidant defense system against hydroperoxides in cultured mammalian cells. *Toxicology*, **55**, 69-82.
- Orino, K., Lehman, L., Tsuji, Y., Ayaki, H., Torti, S.V. and Torti, F.M. (2001) Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J*, **357**, 241-247.
- Ostrerova, N., Petrucelli, L., Farrer, M., Mehta, N., Choi, P., Hardy, J. and Wolozin, B. (1999) alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J Neurosci*, **19**, 5782-5791.
- Ozawa, T., Sugiyama, S., Tanaka, M. and Hattori, K. (1991) Mitochondrial DNA mutations and disturbances of energy metabolism in myocardium. *Jpn Circ J*, **55**, 1158-1164.
- Pardee, A.B. (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**, 1286-1290.
- Pearce, A.K. and Humphrey, T.C. (2001) Integrating stress-response and cell-cycle checkpoint pathways. *Trends Cell Biol*, **11**, 426-433.
- Picard, V., Epsztejn, S., Santambrogio, P., Cabantchik, Z.I. and Beaumont, C. (1998) Role of ferritin in the control of the labile iron pool in murine erythroleukemia cells. *J Biol Chem*, **273**, 15382-15386.
- Remacle, J., Raes, M., Toussaint, O., Renard, P. and Rao, G. (1995) Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function. *Mutat Res*, **316**, 103-122.
- Rodemann, H.P., Bayreuther, K., Francz, P.I., Dittmann, K. and Albiez, M. (1989a) Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro. *Exp Cell Res*, **180**, 84-93.
- Rodemann, H.P., Bayreuther, K. and Pfleiderer, G. (1989b) The differentiation of normal and transformed human fibroblasts in vitro is influenced by electromagnetic fields. *Exp Cell Res*, **182**, 610-621.
- Sanchez-Amate, M.C., Carrasco, M.P., Zurera, J.M., Segovia, J.L. and Marco, C. (1995) Persistence of the effects of ethanol in vitro on the lipid order and enzyme activities of chick-liver membranes. *Eur J Pharmacol*, **292**, 215-221.
- Seo, J.H., Rah, J.C., Choi, S.H., Shin, J.K., Min, K., Kim, H.S., Park, C.H., Kim, S., Kim, E.M., Lee, S.H., Lee, S., Suh, S.W. and Suh, Y.H. (2002) Alpha-synuclein regulates neuronal survival via Bcl-2 family expression and PI3/Akt kinase pathway. *Faseb J*, **16**, 1826-1828.
- Skulachev, V.P. (2000) The p66shc protein: a mediator of the programmed death of an organism? *IUBMB Life*, **49**, 177-180.
- Suh, Y. (2002) Cell signaling in aging and apoptosis. *Mech Ageing Dev*, **123**, 881-890.
- Termini, J. (2000) Hydroperoxide-induced DNA damage and mutations. *Mutat Res*, **450**, 107-124.
- Torti, F.M. and Torti, S.V. (2002) Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*, **99**, 3505-3516.
- Toussaint, O., Houbion, A. and Remacle, J. (1992) Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. II. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture. *Mech Ageing Dev*, **65**, 65-83.
- Toussaint, O., Medrano, E.E. and von Zglinicki, T. (2000) Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*, **35**, 927-945.
- Toussaint, O., Michiels, C., Raes, M. and Remacle, J. (1995) Cellular aging and the importance of energetic factors. *Exp Gerontol*, **30**, 1-22.

- Toussaint, O., Remacle, J., Dierick, J.F., Pascal, T., Frippiat, C., Magalhaes, J.P. and Chainiaux, F. (2001) Hormesis: a quest for virtuality? *Hum Exp Toxicol*, **20**, 311-314; discussion 319-320.
- Toussaint, O., Remacle, J., Dierick, J.F., Pascal, T., Frippiat, C., Zdanov, S., Magalhaes, J.P., Royer, V. and Chainiaux, F. (2002a) From the Hayflick mosaic to the mosaics of ageing. Role of stress-induced premature senescence in human ageing. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 1415-1429.
- Toussaint, O., Royer, V., Salmon, M. and Remacle, J. (2002b) Stress-induced premature senescence and tissue ageing. *Biochem Pharmacol*, **64**, 1007-1009.
- Trinei, M., Giorgio, M., Cicalese, A., Barozzi, S., Ventura, A., Migliaccio, E., Milia, E., Padura, I.M., Raker, V.A., Maccarana, M., Petronilli, V., Minucci, S., Bernardi, P., Lanfrancone, L. and Pelicci, P.G. (2002) A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene*, **21**, 3872-3878.
- Vile, G.F. and Tyrrell, R.M. (1993) Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J Biol Chem*, **268**, 14678-14681.
- Vile, G.F. and Tyrrell, R.M. (1995) UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. *Free Radic Biol Med*, **18**, 721-730.
- Volonte, D., Zhang, K., Lisanti, M.P. and Galbiati, F. (2002) Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. *Mol Biol Cell*, **13**, 2502-2517.
- von Zglinickl, T., Saretzki, G. (1995) Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts : a model for senescence?. *Exp. Cell. Res.*, **220**, 186-193
- Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.C., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K.L. and Hochstrasser, D.F. (1996) From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)*, **14**, 61-65.
- Wood, Z.A., Schroder, E., Harris, J.R., Poole, L.B. (2003) Structure, mechanisms and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*, **28 n°1**, 32-40