Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Effet de l'aluminium sur le vieillissement cellulaire

Janssens, Dominique

Award date:
1991

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

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

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

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

Download date: 04. May. 2026

FACULTES UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES



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



FACULTES
UNIVERSITAIRES
N.-D. DE LA PAIX
NAMUR

Bibliothèque
FMB
D/1991/16

FM B4/1991/16





Effet de l'aluminium sur le vieillissement cellulaire

JANSSENS Dominique

LBS 5044648
190179

Au terme de ce mémoire, je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Remacle de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir prodigué ses judicieux conseils durant toute cette année.

Mes remerciements les plus vifs s'adressent à Olivier Toussaint qui m'a guidée tout au long de ce mémoire dans une atmosphère de bonne humeur. Je lui suis surtout reconnaissante pour sa constante disponibilité, sa compétence et son sens humain.

Je remercie également Andrée Houbion pour son aide technique, sa disponibilité, son sens de l'organisation et surtout sa gentillesse ainsi que Marc Dieu pour son aide dans les corrections.

Un grand merci aussi à tous les membres du laboratoire de biochimie cellulaire pour leur sympathie, pour leurs encouragements ainsi que pour l'excellente ambiance qu'ils y font régner. Et tout particulièrement à Isabelle, Maggy et Manoëlle pour leur bonne humeur de tous les instants.

Enfin, une pensée toute particulière à Florent pour son soutient moral durant ces quatre années ainsi que pour son investissement dans la dactylographie et la mise en page de ce mémoire.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 facnam-b - Telefax 081/23.03.91

Effet de l'aluminium sur le vieillissement cellulaire

JANSSENS Dominique

Résumé

Nous avons étudié l'effet de l'aluminium sur le vieillissement des cellules en culture. L'étude du vieillissement a été réalisée à partir d'un modèle issu de la thermodynamique des systèmes ouverts qui prédit le passage des cellules d'un état stationnaire à un autre au cours du temps; ce passage étant irréversible et allant vers une augmentation du niveau d'erreurs et une diminution de la capacité de production d'entropie. Ce passage peut être accéléré sous l'effet d'un stress et l'intensité de celui-ci déterminera l'ampleur des passages vers des types âgés. Nous avons choisi comme modèle d'étude les fibroblastes WI-38 vu qu'on leur reconnait un processus de différenciation en 7 étapes, chacune représentée par un type de fibroblaste morphologiquement et biochimiquement distinct.

Nous avons montré que l'application de sels d'aluminium entraîne effectivement un passage de cellules de types jeunes vers des types plus âgés. Nous avons également essayé de cibler l'effet du stress et avons montré que celui-ci ne semble pas intervenir via le système radicalaire. L'une des actions principales de l'aluminium étant sa fixation sur l'ATP et la calmoduline, nous avons essayé d'obtenir une protection face au stress via des molécules à haute valeur énergétique. Nous avons effectivement obtenus une protection vis-à-vis du stress sous aluminium en améliorant énergétiquement le milieu dans lequel nous effectuons le stress. Enfin, la présence de desferroxamine et d'EDTA à la suite du stress permet une meilleure récupération des cellules.

MEMOIRE de licence en Sciences biologiques
Juin 1991
Promoteur : J. Remacle

Plan

Chapitre 1 / Introduction

1/ Théories générales du vieillissement 1

2/ Thermodynamique et vieillissement 3

2.1/ Systèmes linéaires 4

2.2 /Systèmes non-linéaires 5

2.3 / Evolution d'un système ouvert au cours du temps 6

2.4 / Implication pour le vieillissement cellulaire 8

2.4.1 / Effet des stress stochastiques 9
2.4.2 / Influence sur le génome 11

3 / Applications du modèle 12

3.1 / Effet des stress uniques 13

3.2 / Effet des stress multiples 13

3.3 / Choix de l'aluminium 13

4 / Toxicité de l'aluminium 14

4.1 / Introduction 14

4.2 / Métabolisme de l'aluminium au niveau de l'organisme 15

4.2.1 / Forme sous laquelle l'aluminium se trouve à l'intérieur de l'organisme 15
4.2.2 / Absorption et contenu corporel 16
4.2.3 / Distribution tissulaire 16
4.2.4 / métabolisme général 17
4.2.5 / métabolisme intracellulaire 18

4.3 / Biochimie et effet sur le métabolisme cellulaire 19

4.3.1 / Effet sur les enzymes et les substances en rapport avec celles-ci. 19
4.3.2 / Effet sur l'ADN et sur la division cellulaire 19
4.3.3 / Effet sur les microtubules et les filaments 20
4.3.4 / Effet sur les lipides membranaires 21

Chapitre 2: Objectifs du mémiore 22

Chapitre 3: Matériels et méthodes

1 / Culture de fibroblastes 24

1.1 / Fibroblastes WI-38 24
1.2 / Décongélation et mise en culture 24
1.3 / Milieu de culture 24
1.4 / Méthode de culture 25

2 / Mesure de la toxicité par dosage de protéines 25

3 / Détermination des types morphologiques 25

4 / Détermination de l'effet des stress uniques sur le type morpholgique 26

5 / Stress successifs 26

6 / Comptage de cellules survivantes 27

7 / Dosage de l'aluminium en absorption atomique 27

7.1 / principes de base 27

7.1.2 / Spectre d'absorption 27
7.1.2 / Radiation de résonance 28
7.2 / Formation de la vapeur atomique 28

7.2.1 / production d'atomes libres 28
7.2.2 /Système de base en absorption atomique 29
7.3 / Technique analytique de mesure utilisée 29

7.4 / Méthode 29

8 / Tests statistiques 30

Chapitre 4 : Résultats

1 / Etude de la toxicité de l'aluminium 31

1.1 / Toxicité en fonction de la concentration 31

1.2 / Toxicité en fonction de la durée de stress 31

1.3 / Tests de spécificité de la toxicité de l'aluminium 32

1.4 / Effet de l'aluminium sur les mitoses 33

2 / Effet de stress uniques et successifs sur le vieillissement 34

2.1 / Présentation des types morphologiques 34

2.2 / Proprotions des types morphologiques 35

2.3 / Effet des stress uniques 35

2.3.1 / Effet du stress sur des cellules de culture de passage 25 36

a/ Aspects qualitatifs 36

b/ Aspects quantitatifs 37

2.3.2 / Stress sur des cellules de culture de passage 35 39

2.3.3 / Stress sur des cellules de culture de passage 42 40

2.4 / Effet des stress successifs 42

3 /Hypothèse énergétique

3.1 / Effet du découplage partiel des phosphorylations oxydatives 44

3.1.1 / Effet du mCCCP sur la croissance des fibroblastes en culture 45

3.1.2 / Etude de toxicité d'un stress d'aluminium couplé à la présence de mCCCP dans le milieu 45
3.1.3 / Effet des stress sous aluminium sur le vieillissement des cellules en présence de mCCCP 47

3.2 / Effet d'un apport nutritif sur la toxicité et le vieillissement des cellules stressées 49

3.2.1 / Toxicité de l'aluminium dans un milieu plus riche 49
3.2.2 / Etude de l'effet sur le vieillissement 50
3.2.3 / Ciblage de l'effet protecteur du Puck+ 53

4/ Essais de protection 54

4 1 / Essai de chélation de l'aluminium après le stress 55

4.2 / Antioxydants 56

4.2.1 / Le glutathion (GSH) 56
4.2.2 / La vitamine E 56
4.2.3 / Vitamine C 57
4.2.4 / Conclusion 57

4.3 / Protection par des protéines extra-cellulaires 58

4.4 / Protection du métabolisme énergétique 58

4.4.1 / Glucose 59
4.4.2 / Insuline 59
4.4.3 / β-hydroxybutyrate 60
4.4.4 / glutamine 60

4.5 / Effet sur le vieillissement en présence de chacune des molécules testées contre la toxicité 61

Chapitre 5: Discussion 62

Bibliographie 69

Chapitre 1: Introduction

1/ Théories générales du vieillissement

L'étude du vieillissement représente un domaine de recherche très actif. Ces dernières années, plusieurs articles ont tenté de donner une vue cohérente des aspects théoriques du vieillissement cellulaire (Hayflick, 1985; Holliday, 1988; Strehler, 1986). La multitude de théories concernant le vieillissement (Hayflick, 1985) ainsi que leur échec au niveau de l'explication de toutes les données expérimentales suggère le fait que le vieillissement n'est pas contrôlé par un mécanisme simple.

Les théories du vieillissement peuvent être divisées en deux grandes catégories, les théories déterministes et les théories stochastiques. Les premières considèrent le vieillissement comme un processus programmé agissant au cours du temps et contrôlé aussi bien au niveau de l'organisme (par exemple par le système nerveux central ou le système endocrinien) ou comme étant inhérent au contrôle génétique de la cellule. Selon ce point de vue, le vieillissement ainsi que la mort cellulaire seraient un prolongement du programme de différenciation. Parmi ces théories, nous trouvons par exemple, la théorie de dysdifférenciation des cellules (Cutler, 1982), théorie de la restriction des codons (Strehler, 1977) et la théorie de régulation génique (Kanungo, 1980). Au niveau expérimental, la découverte récente de groupes de polypeptides apparaissant successivement au cours du vieillissement cellulaire et mis en évidence par la technique de gel à deux dimensions faisant suite à un marquage à la méthionine radioactive (^{35}S-méthionine), parle en faveur de mécanismes programmés (Bayreuther *et al*, 1988; Francz *et al,* 1989). La seconde catégorie de théories insiste sur l'importance des événements stochastiques environnementaux qui conduisent à des altérations irréversibles au sein de beaucoup de systèmes biologiques. Un grand nombre d'hypothèses existent en faveur de cette idée centrale, la plus connue est la théorie de l'erreur catastrophique (Orgel,1963, 1973), mais il y a également la théorie des radicaux libres (Harman, 1956,1969, 1980, 1987) et encore d'autres basées sur l'observation de différences spécifiques au cours du vieillissement des cellules, ces différences affectant par exemple, les mitochondries, les

ATPases (Economos *et al.* , 1980; Miquel *et al.* , 1980; Fleming *et al.*, 1982)... Au niveau des arguments typiquement biochimiques, donnons principalement deux exemples. Le premier est la découverte d'une diminution de la fidélité de la synthèse protéinique dans des extraits de fibroblastes âgés (Luce et Bunn, 1989) et le second est une augmentation de la thermolabilité d'enzymes tels la glucose-6-phosphate déshydrogénase (Houben *et al*, 1984) et la superoxide dismutase (Somville *et al*, 1985) au cours du vieillissement cellulaire.

Nous voyons donc que les causes de mort de la cellule associées au vieillissement cellulaire sont extrêmement variables. C'est pourquoi une théorie globale du vieillissement cellulaire doit tenir compte de l'existence des causes multifactorielles du vieillissement et de la mort et devrait pouvoir unifier les aspects stochastiques et déterministes du vieillissement.

Dans cette optique, plusieurs auteurs ont tenté une telle unification théorique. Parmi ceux-ci, Strehler (1986) considère le vieillissement comme un processus basé sur l'évolution du génome au cours du temps. Cet auteur insiste sur le fait que la stabilité du génome permet le maintien de la vie pendant de longues périodes de temps. Néanmoins, des phénomènes d'altération moléculaire agissant au niveau du génome finiraient par être responsables de la détérioration progressive de la structure cellulaire. Cette détérioration progressive pourrait être considérée comme un exemple d'application du second principe de la thermodynamique qui prédit une perte graduelle de l'ordre, et ce phénomène se rencontre dans tous les systèmes biologiques.

Pour Segal (1988), l'influence de l'environnement est primordiale et selon son point de vue, le vieillissement serait le résultat de la diminution progressive de la capacité pour un organisme de faire face à son environnement. Les stress d'origine extra-cellulaire sont certainement une cause de la mort cellulaire. En effet, si un stress extérieur devient trop important par rapport au système de défense cellulaire, un processus dégénératif peut prendre place et conduire à la mort cellulaire. La mort cellulaire, qui est la fin du processus de vieillissement, peut alors être considérée comme le point de rupture entre la capacité de défense cellulaire et les agressions extérieures (Holliday, 1988). Selon ce point de vue, l'équilibre entre les défenses et les attaques est essentiel au maintien de la vie cellulaire et, si les erreurs ou les attaques atteignent

un seuil critique, un processus irréversible prend place et conduit à la dégénérescence de la cellule (Michiels *et al.*,1990).

Beaucoup d'arguments expérimentaux et théoriques ont été fournis en faveur de ce processus. D'une part, on a montré qu'une production excessive de radicaux libres mène à la mort cellulaire. Cette mort peut être retardée ou annulée par l'injection d'enzymes anti-oxydants à l'intérieur de la cellule (Raes *et al.*,1987; Michiels *et al.*, 1988). Dans ces expériences, le seuil critique d'accumulation d'erreurs dues aux radicaux libres peut ne pas être dépassé si on augmente le contenu cellulaire en ces enzymes ou peut être dépassé plus facilement en inhibant ces enzymes par des inhibiteurs spécifiques (Michiels et Remacle, 1988) ou par des anticorps (Michiels *et al.*, 1988). D'autre part, un développement théorique basé sur le modèle de la production de radicaux libres et leur élimination à l'intérieur de la cellule a confirmé la possibilité d'existence d'un seuil au-delà duquel le système est instable et conduit à la mort cellulaire (Remacle *et al*, soumis pour publication). D'autres types de stress conduisant à la dégénérescence cellulaire peuvent aussi déstabiliser les cellules, rejoignant ainsi le concept de seuil critique.

Si ce concept est capable d'expliquer la mort cellulaire dans certaines conditions expérimentales, la question est de savoir s'il est applicable au vieillissement proprement dit ou, en d'autres mots, de savoir ce qui se passe pendant le vieillissement pour aboutir finalement au seuil critique et donc à la mort.

Comme le suggère Strehler (1986), la question peut être approchée en utilisant la thermodynamique des systèmes ouverts, ce qui amène à une approche globale systémique du comportement cellulaire et, dans cette perspective, fait transparaître les aspects génétiques et stochastiques du processus de vieillissement.

2/ Thermodynamique et vieillissement

Vu que le système cellulaire est un système ouvert, nous ne développerons que les aspects en relation avec la thermodynamique des systèmes ouverts. Pour rappel, les sytèmes ouverts sont des systèmes qui échangent de la matière et de l'énergie avec leur environnement, tandis

que les systèmes fermés, n'échangent ni énergie, ni matière avec leur environnement.

Il faut également noté que la thermodynamique des systèmes ouverts est divisée en deux domaines : les systèmes décrits par les lois linéaires et les systèmes décrits par les lois non-linéaires.

2.1/ Systèmes linéaires

Le premier degré de complexité de la thermodynamique des processus irréversibles est constitué par les systèmes ouverts proches de l'équilibre de telle sorte que les lois linéaires sont valables. Dans ces conditions, il y a une proportionalité entre les flux de matière et d'énergie et les forces responsables de leur apparition . Des données expérimentales suggèrent que, pour un certain nombre de phénomènes, le domaine linéaire peut être large, tandis que pour d'autres telles les réactions chimiques, il est restreint au voisinage de l'équilibre.

Vu qu'ils opèrent dans une phase stationnaire, le comportement des systèmes ouverts est très différent des systèmes fermés. D'un point de vue thermodynamique, le concept le plus important dans le cadre de cette étude est le théorème de Prigogine (1946) qui prédit qu'à l'état stationnaire et avec des paramètres externes non-modifiés, la vitesse de production d'entropie est constante et minimale. Par conséquent, un système ouvert décrit par les lois linéaires qui a dû quitter son état stationnaire sous l'effet de perturbations, entreprendra des changements jusqu'à ce que sa production d'entropie redevienne minimale (Prigogine, 1946).

En considérant un système ouvert comme un tout, le changement total d'entropie du système ($\delta S/\delta t$) sera la somme de tous les changements locaux d'entropie. Cette variation d'entropie du système peut être considérée comme le résultat de l'entropie totale produite à l'intérieur du système ($\delta iS/\delta t$) par des processus irréversibles comme par exemple des réactions chimiques, des gradients ou encore au flux total d'entropie généré par l'augmentation de la température et par les flux diffusionels de toutes les espèces chimiques se trouvant dans le système ($\delta eS/\delta t$) au travers de la surface entourant le système. Notons de suite que $\delta iS/\delta t$ est appelé production d'entropie (P) du système.

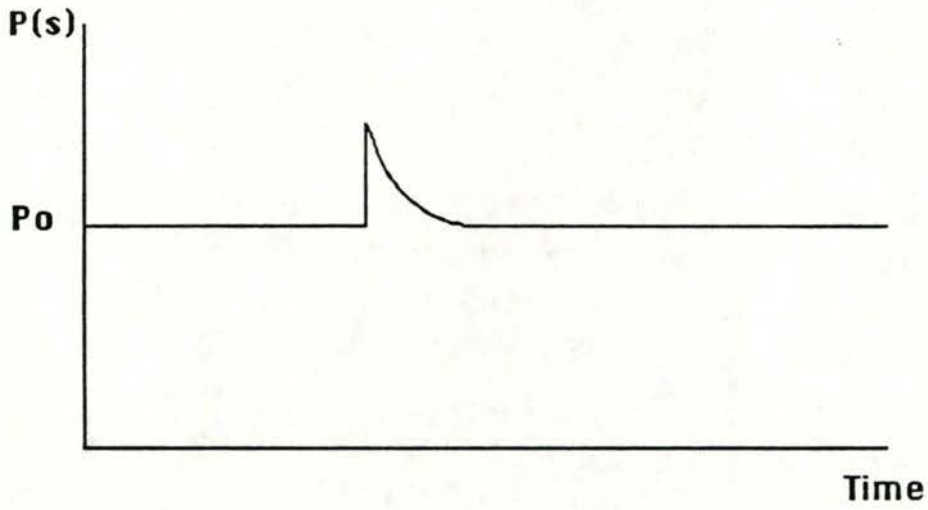


Figure 1: Représentation du théorème de Prigogine qui prédit qu'un système linéaire ouvert qui s'écarte de son état stationnaire se conduit de telle sorte que la production d'entropie $P=\delta iS/\delta t$ diminura au cours du temps ($dP/dT < 0$) afin de revenir à sa valeur initiale de production d'entropie P_0 (d'après Toussaint et al., sous presse).

Si le système se trouve dans un état stationnaire donné, alors sa propre entropie ne doit pas varier au cours du temps, donc $\delta S/\delta t = deS/dt + \delta iS/\delta t = 0$. Dans ce cas, $-\delta eS/\delta t = \delta iS/\delta t$, ce qui signifie que toute l'entropie produite par le système est exportée à l'extérieur. L'équation écrite par Prigogine implique également que toute augmentation de la production d'entropie du système est compensée par l'exportation d'entropie dans l'environnement. En termes thermodynamiques, cette production d'entropie diminuera ($\delta P/\delta t < 0$) jusqu'à atteindre la valeur minimale (Po) caractéristique de l'état stationnaire. (fig. 1)

En résumé, pour un système linéaire, après toute variation de la production d'entropie, le système reviendra toujours vers sa production d'entropie initiale. A un tel état stationnaire, le système agira à un minimum de production d'entropie et sera stable aussi longtemps qu'il restera dans le domaine linéaire.

2.2 /Systèmes non-linéaires

Lorsque l'on parle de systèmes non-linéaires, on considère les systèmes loin de l'équilibre. C'est le cas de tous les systèmes biologiques quel que soit leur degré de complexité, du niveau moléculaire aux organismes (pour une description thermodynamique de ces systèmes, voir Babloyantz, 1986). Contrairement aux systèmes ouverts linéaires qui ne possèdent qu'un seul état stationnaire, les systèmes ouverts loin de l'équilibre peuvent avoir plus d'un état stationnaire stable, chacun étant caractérisé par une valeur de production d'entropie $P=\delta iS/\delta t$ (entropie totale produite à l'intérieur du système). Dans un système loin de l'équilibre, la dépendance entre les flux et les forces est très complexe et donc difficile à évaluer du fait que les forces et les flux sont devenus indépendants.

Il est néanmoins possible de définir le critère de stabilité d'un tel état stationnaire de sorte que toute fluctuation peut être analysée afin de voir si elle serait non-nuisible pour le système ou si elle déstabilisera cet état stationnaire. Notons que ces développements théoriques ne sont corrects que si nous analysons le voisinage immédiat des états stationnaires considérés. Ici, c'est également la production d'entropie qui peut fournir l'information, ou plus précisément, le second terme $1/2\ \delta^2P$ du développement de Taylor de la fonction de production d'entropie $P=P_0+\delta P+1/2\ \delta^2P+...$ qui exprime la production d'entropie résultant des fluctuations de toutes les forces et de tous les flux du système. $1/2\ \delta^2P$

$$P = P0 + dP + 1/2\ d2P + \ldots$$

$$S = S0 + dS + 1/2\ d2S + \ldots$$

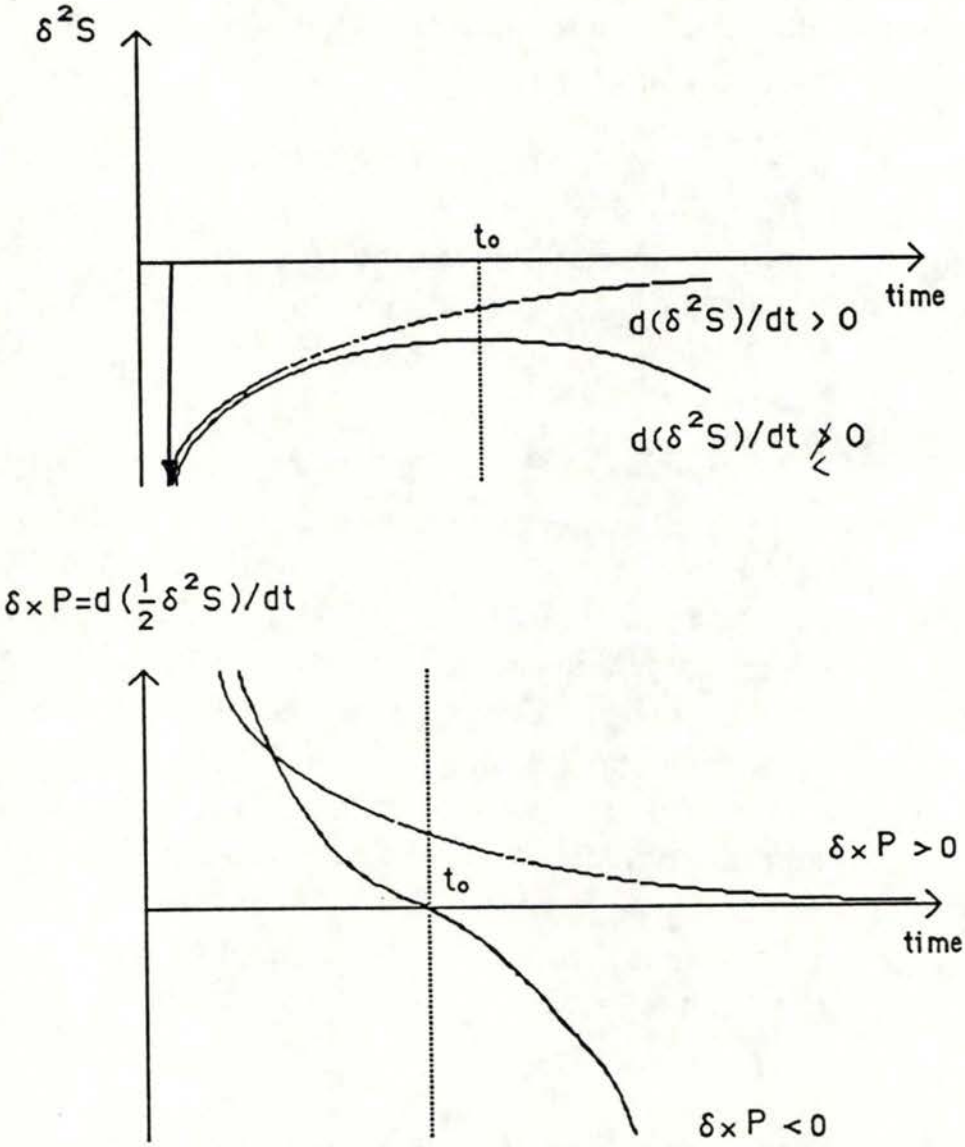


Figure 2: Critère de stabilité d'un état stationnaire loin de l'équilibre. Les fluctuations provoquent une augmentation de d^2S (qui devient plus négatif). Si le système peut annuler les fluctuations, d^2S devient moins négatif ou $d(d^2S)/dt$ est positif. Dans ce cas, le système est stable ($d^2P=d(d^2S/2)/dt > 0$). Si le système est incapable de diminuer les fluctuations, $d(d^2S)/dt$ devient de plus en plus négatif. Dans ce cas, le système est instable ($d^2P=d(d^2S/2)/dt < 0$) et recherche un nouvel état stationnaire (d'après Toussaint *et al.*, sous presse).

est appelé excès de production d'entropie, également désigné par $\delta_x P$ (Glansdorff et Prigogine, 1971). Cet excès de production d'entropie est en relation avec l'entropie produite par le système exprimé par l'équation $\delta_x P = \delta/\delta t \; 1/2 \; \delta^2 S$ avec $\delta^2 S$ qui correspond à la contribution de second ordre de la fonction d'entropie du système résultant d'une fluctuation. $\delta^2 S$ indique une direction définie d'évolution du système de telle sorte qu'il donne une information sur les possibilités pour le système de revenir ou non à son état stable initial.

Nous obtenons le critère de stabilité des états stationnaires loin de l'équilibre qui est donné par $\delta_x P \geq 0$. La stabilité du système peut être testée par l'introduction de fluctuations de forces ou de flux dans le système et en évaluant l'excès de production d'entropie $\delta_x P$. Le signe de ce paramètre donnera une information sur la stabilité de l'état stationnaire; s'il est positif, le système reviendra dans son état stationnaire de départ, et s'il est négatif, le système quittera cet état (fig 2). En termes pratiques, un système loin de l'équilibre peut quitter son état stationnaire si les fluctuations de départ ne disparaissent pas et augmentent la perturbation initiale jusqu'à une valeur seuil qui provoquera la recherche par le système d'un autre état stationnaire.

2.3 / Evolution d'un système ouvert au cours du temps

On peut décomposer le changement au cours du temps de la variation d'entropie $\delta P/\delta t$ comme une variation due au changement des forces thermodynamiques (Xi) alors que les flux restent constants ($\delta_x P/\delta t$) en plus de la contribution due au changement de flux (Ji) lorsque les forces sont constantes ($\delta_j P/\delta t$). Seul le terme $\delta_x P/\delta t$ est essentiel pour définir la stabilité du système en analogie à $\delta P/\delta t = 0$ dans le domaine linéaire (Babloyantz, 1986). Ce terme sera négatif si le système est entraîné loin de son état stationnaire. L'application d'un tel concept est difficile puisque pratiquement, il est impossible pratiquement d'isoler la partie de l'entropie produite par les forces de celle produite par les flux. Nous considérerons donc ce problème d'un point de vue qualitatif.

Une cellule peut être considérée à un moment précis comme étant à un état stationnaire tel que la production d'entropie à l'intérieur du système est identique à la production d'entropie exportée à l'extérieur du système: $-\delta_e S/\delta t = \delta_i S/\delta t$. Si nous suivons un système cellulaire au cours du temps, ce n'est pas toujours vrai. En effet, si toute la production d'entropie à l'intérieur du système cellulaire était toujours exportée à l'extérieur, cela

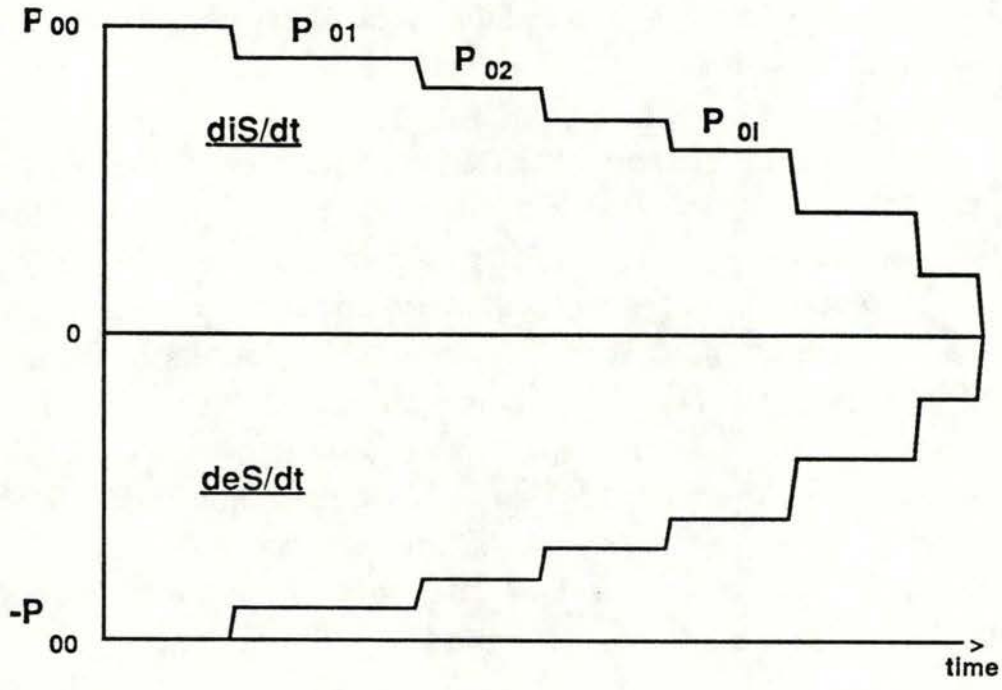


Figure 3: Evolution de la production d'entropie interne au cours du temps. Le niveau de production d'entropie diminura graduellement au cours du temps provoquant le passage par des états stationnaires successifs. Pour chaque état stationnaire, l'entropie produite sera totalement exportée hors du système -deS=diS. Au cours des sauts d'un état à l'autre, l'égalité ne sera plus obtenue tant qu'un nouvel état stationnaire ne sera atteint (d'après Toussaint *et al.*, sous presse).

signifierait que le système cellulaire est éternel, ce qui n'est pas le cas des cellules normales. Au contraire, nous pouvons considérer l'évolution de la cellule comme celle de tout autre système ouvert, avec une diminution progressive de la production d'entropie par le système en corrélation avec une diminution de l'entropie exportée hors du sytème (Fig. 3).

Nous devons nous rappeler que la production d'entropie à l'intérieur d'un système ouvert, tel la cellule qui est dans un état stationnaire déterminé, représente la différence entre l'entropie des molécules et des forces sortant et entrant dans la cellule. Nous comprenons donc mieux que la production d'entropie est liée à l'énergie libre totale convertie en entropie. Dans ce cas, une diminution de la production d'entropie interne de la cellule représente une diminution de la capacité pour la cellule de transformer l'énergie en travail.

Il y a deux aspects à cette hypothèse générale. D'une part, cela pourrait signifier que l'introduction de molécules à haute valeur énergétique dans la cellule, leur transformation en travail, en molécules synthétisées ou en énergie libre va diminuer. De plus, le fonctionnement général de la cellule pourrait être gêné par exemple par une augmentation des erreurs dans la synthèse moléculaire, avec une accumulation des molécules endommagées ou des déchets métaboliques. Cela serait en accord avec les théories d'erreurs ou les théories de dysfonctionnement qui ont été citées dans les théories générales. D'un autre côté, la diminution de production d'entropie peut aussi résulter d'une perte de production d'énergie par la cellule. En fait, cette diminution de la production d'entropie entraînerait une diminution de la fonction de dissipation spécifique liée à l'intensité de production de chaleur. Or, on sait que le vieillissement est associé à une diminution de la production de chaleur ainsi qu'à une diminution de la respiration. Des exemples de telles expériences réalisées sur des insectes, des amphibiens, des oiseaux et des mammifères ont été revues par Zotin *et al.* (1978). Les études sur l'homme réalisées d'après des mesures de la respiration basale (Shock et Yienst, 1955), des quantités d'aliments ingérés et de la dépense énergétique (Mac Gandy *et.al.*,1966) sont en rapport avec les données obtenues à partir des animaux. L'intensité de la respiration a aussi été présentée comme diminuant dans un grand nombre d'organes et de tissus dans le cas du vieillissement du rat (Nagorny *et al.*, 1966). D'autres études ont été réalisées sur des fractions et des homogénats de tissus (Hayflick et Finch, 1977). Au niveau cellulaire aussi, le métabolisme de base présente une diminution avec le temps,

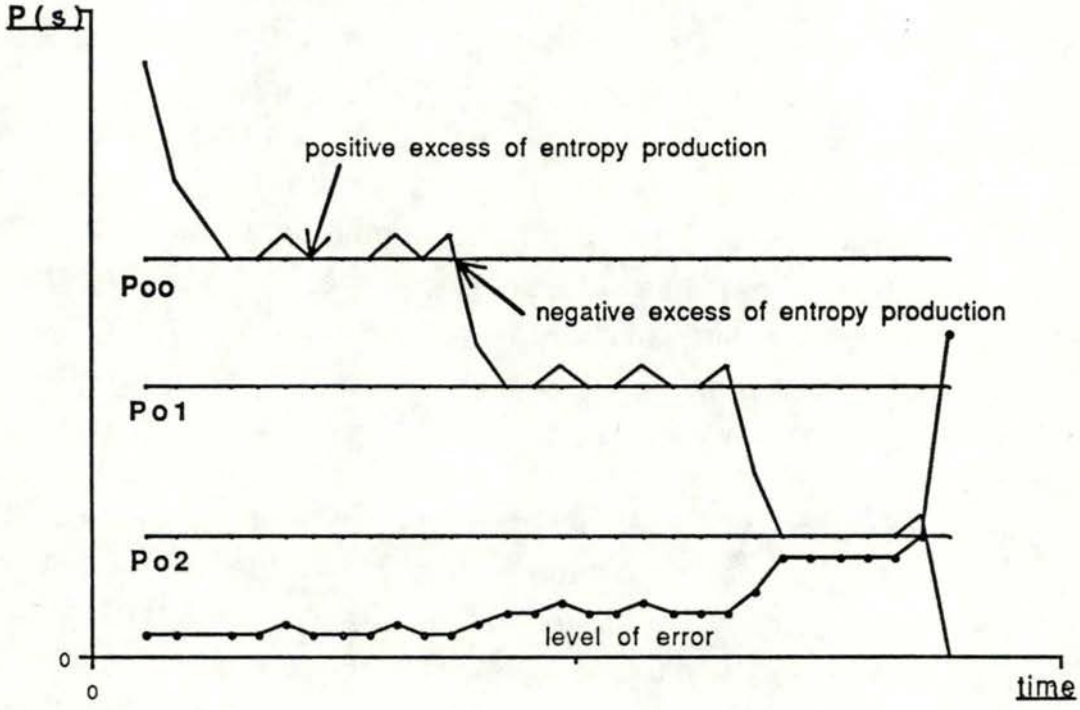


Figure 4 : Systèmes ouverts non linéaires: évolution de la production d'entropie P(S)=diS/dt au cours du temps. Les niveaux différents de P_0 représentent les différents états stationnaires qui peuvent exister suite à un excès négatif de production d'entropie. Simultanément, le niveau d'erreurs à l'intérieur augmentera pour atteindre finalement une déstabilisation totale et irréversible du système (d'après Toussaint *et al.*, sous presse).

spécialement dans les cellules les plus actives telles les hépatocytes. Dans cette deuxième interprétation de la diminution de production d'entropie interne, les systèmes biologiques présenteraient une diminution des fonctions cellulaires et du métabolisme due à une adaptation aux perturbations environnementales ou résultant d'une diminution générale de l'efficacité de la régulation de systèmes contrôlés génétiquement.

2.4 / Implication pour le vieillissement cellulaire

Quelle serait la transcription de ces concepts de thermodynamique dans le cadre d'une meilleure compréhension du vieillissement cellulaire?

Le vieillissement cellulaire est un phénomène complexe qui varie d'une cellule à l'autre probablement en fonction de son état de différenciation et de son espèce d'origine. Mais d'autre part, il existe une caractéristique commune à toutes les cellules: un processus constant de vieillissement qui est dépendant du temps, processus irréversible et graduel qui conduit à la mort cellulaire. La thermodynamique montre que la cellule est un système ouvert loin de l'équilibre qui opère à un minimum de production d'entropie mais que plusieurs minima existent et que la cellule peut passer graduellement de l'un à l'autre au cours du processus de vieillissement (fig. 4).

Pour pouvoir traiter correctement ce phénomène, il faut en premier lieu nous rappeler que les cellules ont un grand nombre de systèmes de défense et de protection qui peuvent prévenir les erreurs, considérées ici comme étant des altérations moléculaires ou des désorganisations structurales, empêchant ainsi des diminutions anormales de la production d'entropie interne. Si ces systèmes n'existaient pas, l'augmentation des erreurs internes conduirait très rapidement à une diminution brutale de la production d'entropie. Cette production d'entropie serait si rapidement diminuée que la cellule ne serait plus capable d'assurer ses voies métaboliques de base et celle-ci mourrait donc très rapidement. Pour cette raison, une étude de l'effet de la diminution de la production de l'entropie interne $\delta iS/\delta t$ au cours du vieillissement des systèmes biologiques, doit tenir compte du rôle joué par les systèmes de défense agissant contre une multitude de stress différents.

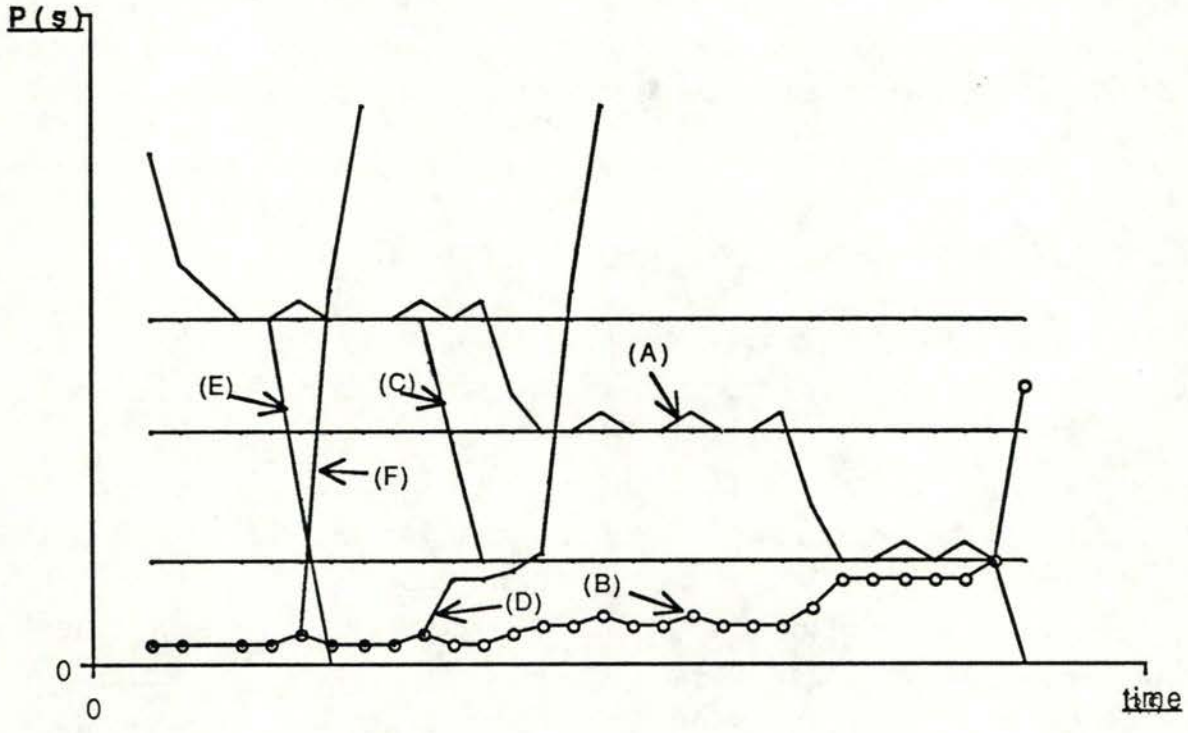


Figure 5 : Effet de faibles stress sur la production d'entropie. Le système réagira afin de revenir dans son état stationnaire de départ en ce qui concerne la production d'entropie (A) et le niveau d'erreurs diminura (B).

Effet d'un stress important sur la production d'entropie. Un stress peut déstabiliser le système de telle sorte qu'il tombe dans un état stationnaire caractérisé par une production d'entropie inférieure (C) et simultanément, le niveau d'erreurs augmentera de manière plus rapide que dans le cas d'une situation normale (D). La capacité de résistance à des stress futurs sera diminuée et le seuil critique sera atteint plus facilement et plus rapidement.

Effet de stress très importants sur la production d'entropie. Le niveau d'erreurs suite au stress deviendra tellement important que le système ne pourra plus trouver un nouvel état stationnaire et disparaîtra (E et F).

(d'après Toussaint *et al.*, sous presse)

2.4.1 / Effet des stress stochastiques

Afin de bien cerner les effets des stress stochastiques, ceux-ci ont été classés en trois groupes différents (fig. 5 et fig. 6).

a/ Des stress de faible intensité ont lieu continuellement, comme par exemple, une petite fluctuation de pH, de température, ou de composition ionique, une faible variation de la concentration en radicaux libres dérivés de l'oxygène, ou encore des variations chimiques de la source de nourriture, des dégâts réversibles au niveau de l'ADN, etc. Thermodynamiquement, de tels petits stress correspondraient à une faible variation d'une ou de plusieurs forces ($\delta \Sigma \Delta Xi/\delta t \neq 0$) conduisant à une petite augmentation du désordre interne directement corrigé par la cellule qui utilise les systèmes de défense correspondant au stress en question. On parle alors d' excès positif de production d'entropie ($\delta xP > 0$) qui n'altère pas la stabilité du système. Afin de se protéger contre ces faibles stress, la cellule peut recourir à deux stratégies. En premier lieu, le système de défense réagira et éliminera les erreurs en exportant de la chaleur et certains produits de réaction hors du système. L'autre solution est que, malgré une petite quantité d'erreurs irréversibles causées par le stress, le système cellulaire peut se conduire de telle sorte que d'autres fonctions cellulaires agiraient pour contrecarrer ces erreurs irréversibles. Ainsi, même si $\delta\Sigma\Delta Xi/dt$ devient nul quand le système revient au niveau de son état stationnaire antérieur, quelques forces Xi peuvent être diminuées et d'autres augmentées.

b / Le second groupe de stress est représenté par des stress successifs apparaissant sur de courtes périodes ou des stress de grande intensité résultant de situations anormales pour la cellule. Des exemples biologiques seraient l'inflammation tissulaire, le phénomène d'ischémie-reperfusion, les attaques cardiaques, l'effet de l'alcoolisme chronique sur le foie, l'exposition à la radioactivité, aux U.V., les produits chimiques toxiques ou les excès de production de radicaux libres,... Dans ces cas, il n'y aura pas uniquement une petite augmentation de la production d'entropie interne mais en plus, le système de défense correspondant au stress pourra être dépassé ou même altéré. Si c'est le cas, le risque d'accumulation d'erreurs dans la cellule sera fortement augmenté. Dans le cas d'un stress faible, les molécules stressantes n'ont pas le temps de provoquer beaucoup d'erreurs irréversibles; par contre, dans le cas de stress importants ou répétés, les erreurs sont telles que le système spécifique de défense correspondant au stress pourrait ne pas être

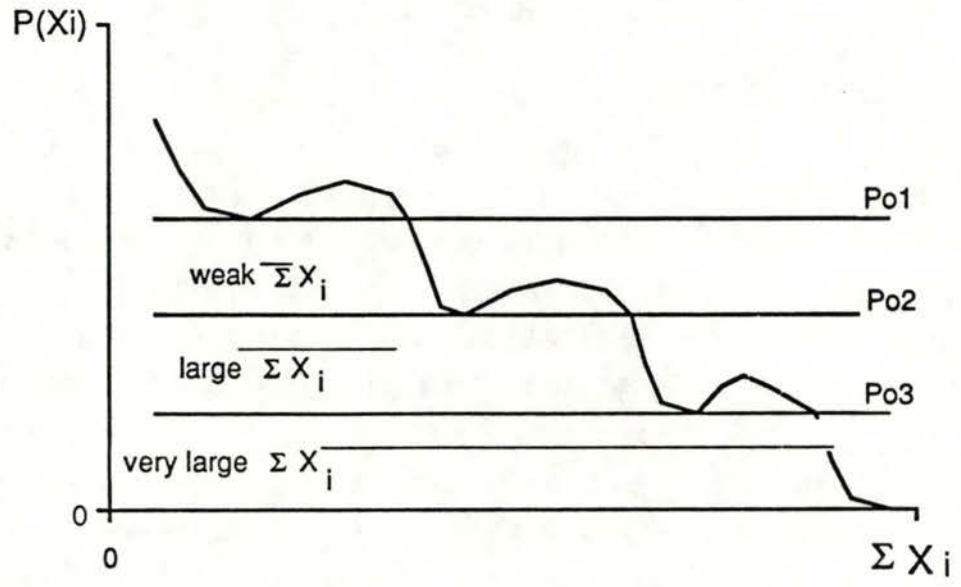


Figure 6: Influence schématique des fluctuations des forces D Xi sur l'évolution possible de la production d'entropie d'un système ouvert. De faibles stress provoqueront uniquement de petites fluctuations de force D Xi de sorte que le système retournera dans son état stationnaire ~~de production d'entropie~~ de départ. Un stress important poussera le système hors du voisinage de l'état staionnaire ~~de départ~~ de sorte que le système ne sera pas capable de revenir dans son état stationnaire de départ et devra en rechercher un nouveau. Un stress très important provoque la destruction du système (d'après Toussaint *et al.*, sous presse).

suffisant et d'autres systèmes de défense seront alors nécessaires. Si ces systèmes induits ou non par le stress sont capables de corriger toutes les erreurs, alors, le système cellulaire reste stable et il y aura uniquement un excès positif de production de l'entropie δxP, comme cela a été décrit pour les stress de faible intensité. Mais si ces systèmes de défense ne peuvent corriger rapidement toutes les erreurs, un grand nombre de constituants structuraux ou fonctionnels de la cellule seront altérés, comme par exemple des enzymes et tout particulièrement celles impliquées dans le métabolisme énergétique de la cellule et sa régulation. Cela conduirait à une augmentation du niveau intracellulaire d'erreurs, ainsi qu'à une diminution de la production d'entropie interne. Cette diminution correspond en fait à un excès négatif de production d'entropie δxP. Comme cela a déjà été dit, un excès négatif de production d'entropie peut déstabiliser l'état stationnaire de la cellule et celle-ci recherche alors un nouvel état stationnaire; si ce dernier ne peut être trouvé, la cellule mourira (la cellule ne sera plus capable de faire face au niveau interne d'erreurs et à la diminution de production d'entropie). Par contre, si la cellule trouve un nouvel état stationnaire, il y aura deux grandes différences irréversibles entre le nouvel état stationnaire et celui d'origine : un plus haut niveau d'erreurs internes et une plus faible production d'entropie interne.

c / Le troisième type de stress est constitué par une attaque si importante que la cellule ne peut trouver de nouvel état stationnaire : le niveau d'erreurs intracellulaires devient si élevé et la production d'entropie si faible, qu'il devient impossible pour la cellule d'assurer ses voies métaboliques de base et de rester en vie.

Le résultat de l'action des deux derniers types de stress sera la mort cellulaire apparaissant soit dans des situations spéciales en cas de stress très intenses ou suite à une augmentation graduelle du niveau intracellulaire d'erreurs. Entre des cellules jeunes, et donc à faible niveau d'erreurs, aucune différence dans la résistance au stress ne sera décelée. Au cours du vieillissement, il sera possible d'observer que les cellules sont de moins en moins aptes à résister à un stress. La production d'entropie diminuera de plus en plus de telle sorte que l'induction des processus de défense de la cellule sera de plus en plus difficile et énergiquement de plus en plus coûteuse pour la cellule. Finalement, le niveau intracellulaire d'erreurs sera si élevé que les cellules ne seront même plus capables de maintenir leurs voies métaboliques de base : ce

sera le "commencement de la fin" parce qu'il n'existera plus aucune barrière pour protéger le système face à de nouveaux stress.

Enfin, on peut se demander quel est le niveau précis d'erreurs entraînant la mort cellulaire? Ce niveau est associé à la capacité de production d'entropie. Nous avons vu qu'il y avait toujours un équilibre entre les attaques et les mécanismes de défense. Lorsque le système ne peut plus maintenir cet équilibre entre les attaques et les défenses, ou lorsque le système a une production d'entropie trop faible que pour pouvoir réagir efficacement à un stress, la cellule doit mourir (fig 6).

De manière à traiter le problème de l'équilibre entre les systèmes de défense et les attaques, il faut considérer non seulement le niveau des attaques mais également celui des systèmes de défense et de maintien de la structure cellulaire. L'existence et l'intensité de ces systèmes étant régulées par le génome, il est donc évident que le génome est concerné par d'éventuels changements d'état stationnaire du système cellulaire (pris dans sa globalité).

2.4.2 / Influence sur le génome

Nous avons vu que le vieillissement cellulaire peut être considéré comme la continuation du processus de différenciation. Selon ce point de vue, le niveau de différenciation résulte de l'expression génétique qui conditionne le comportement de la cellule et l'évolution de sa vitesse de vieillissement. Nous savons que chaque espèce possède une durée de vie maximale et que cette affirmation est également valable au niveau cellulaire. Par exemple, la culture de fibroblastes foetaux qui est réalisée dans des conditions optimalisées avec un minimun de stress extérieurs (excepté la trypsinisation) est caractérisée par un nombre maximal de passages *in vitro* qui est spécifique au tissu et à l'espèce d'origine des cellules.

Bayreuther *et al.* (1988, 1989), ont clairement montré que certains stades de différenciation pouvaient être observés de manière reproductible dans le vieillissement *in vitro* et *in vivo* des fibroblastes humains. En fait, ils ont trouvé une séquence de différenciation en sept étapes passant par trois stades mitotiques, trois stades post-mitotiques et finalement par une étape de dégénérescence. En termes thermodynamiques, ces résultats peuvent être interprétés comme l'évolution de la cellule par au moins sept états stationnaires distincts.

Ces états deviendraient successivement instables et l'on passerait à chaque fois à un nouvel état stationnaire, excepté dans le cas de la dernière étape, où l'instabilité est si grande que les cellules dégénèrent et meurent.

L'interprétation thermodynamique serait que, vu que les cellules sont des systèmes ouverts loin de l'équilibre, elles ont ajusté leur comportement afin de fonctionner avec une production minimale d'entropie et que le nombre de ces minima possibles est limité. Cette interprétation ne réfute pas la théorie de différenciation mais accentue le fait que les cellules ne peuvent subsister que comme un tout à certains états qui sont le résultat de la composition génétique mais aussi de l'optimalisation du fonctionnement cellulaire lui fournissant l'énergie nécessaire. Les raisons de ces passages "naturels" d'un état à un autre seraient multiples. Les perturbations pourraient par exemple résulter de l'instabilité de l'ADN qui a été proposée comme cause première du vieillissement par Strehler (1986). Ces instabilités du DNA forceraient les cellules à s'adapter à de nouveaux états stationnaires afin de s'accorder avec leur nouvelle constitution, et cela conduirait graduellement la cellule vers de nouveaux états de production minimale d'entropie.

Le fait que la cellule ne pourrait exister qu'à des états auxquels elle optimalise sa production d'énergie en diminuant la production d'entropie permet la reconsidération à la fois des théories stochastiques et des théories déterministes. L'une des prédictions d'un tel modèle est que le passage d'un état à un autre serait accéléré par des modifications d'origine extracellulaire comme par exemple, des stress soit répétés ou uniques mais intenses. Dans ce cas, on court-circuite l'évolution du vieillissement "normal" comme cela est représenté de manière simplifiée à la figure 5.

3 / Applications du modèle

Deux types d'études ont déjà été réalisées à partir du modèle qui vient d'être décrit: l'effet des stress uniques et des stress successifs (Toussaint *et al* , soumis pour publication).

3.1 Effet des stress uniques

Bayreuther *et al* (1988, 1989), ont décrit sept types de fibroblastes dans les lignées HH-8 (fibroblastes dermiques humains) et WI-38 (fibroblastes de poumon foetal humain) morphologiquement et biochimiquement distincts. On retrouve en fait trois types mitotiques (MF I, II, III), trois types post-mitotiques (PMF IV, V, VI) et un type dégénérescent (PMF VII).

D'après le modèle théorique, n'importe quelle nature de stress peut avoir un effet sur l'évolution des cellules de types jeunes (I,II, III), en cellules de types plus âgés. Afin de constater si cela se révélait être exact, deux types de stress furent testés, les molécules stressantes étant le TBHP (tert-butylhydroperoxyde) et l'éthanol. Les concentrations et les durées de stress avaient été choisies en fonction d'une toxicité limitée sur les cellules et, à partir de ce moment, une étude sur l'évolution des types morphologiques cellulaires pouvait être réalisée. Avec le TBHP, on a pu constater en plus de la faible mortalité cellulaire qui suit le stress, deux phénomènes différents: l'évolution des cellules de départ de type jeune vers des cellules de type âgé ainsi que le maintien de cellules jeunes qui peuvent récupérer après le stress et se diviser normalement. En présence d'éthanol, des résultats comparables furent obtenus.

3.2 / Effet des stress multiples

Dans le cas de stress multiples au TBHP et à l'éthanol réalisés à chaque passage de la culture cellulaire, on a pû observer une évolution des proportions de types morphologiques beaucoup plus rapide au cours des passages par rapport aux cultures témoins n'ayant pas subi ces stress.

Pour confirmer les résultats obtenus avec les stress à l'éthanol et au TBHP et afin de pouvoir généraliser les prévisions avec la théorie, il était nécessaire de pouvoir reproduire les résultats acquis pour des stress de nature très différente.

3.3 / Choix de l'aluminium

Il existe bien entendu une multitude de stress possibles et un choix devait donc être réalisé. Nous avons effectué un choix premièrement parmi des molécules stressantes qui pouvaient avoir un effet sur le

vieillissement des cellules dans des conditions pratiques, et, deuxièmement, des molécules ayant un effet non-mutagène au niveau de l'ADN afin de confirmer l'hypothèse de réorganisation globale de la structure cellulaire suite à un stress sans que celle-ci ne puisse être expliquée simplement par un effet direct au niveau de l'ADN.

L'aluminium étant de plus en plus mis en évidence dans divers tissus humains ainsi que mis en cause dans une série d'affections et de processus liés au vieillissement, nous l'avons choisi comme molécule stressante dans ce travail. En effet, l'aluminium est communément considéré comme une cause de maladies dans le cas du syndrôme d'encéphalopathie ainsi que pour l'ostéomalacie des personnes sous dialyse. Il est aussi proposé comme pouvant intervenir dans le développement des démences de type Alzheimer et de Parkinson (Ganrot, 1986).

4 / Toxicité de l'aluminium (pour une revue, voir Ganrot, 1986)

4.1 / Introduction

L'aluminium est présent en très petite quantité au sein des organismes vivants mais est abondant dans l'environnement. En aucun cas, on n'a pu donner une fonction biologique définie à l'aluminium, ce qui suggère le fait que l'aluminium posséderait des propriétés qui seraient incompatibles avec les processus fondamentaux de la vie. Le fait que depuis quelques années, un nombre croissant d'effets toxiques ont été décrits pour l'aluminium et ont conduits au développement de l'étude de sa toxicité.

Dans la nature, l'aluminium existe uniquement à l'état oxydé Al (III). Le radical ionique est petit, seulement 0,51 A° (cela est dû à la forte charge électrique de l'ion). La haute charge et la petite taille de l'aluminium (III) lui confère un grand effet de polarisation sur les atomes adjacents. En solution aqueuse, l'ion protolyse donc une partie de son enveloppe d'eau et forme des complexes aqueux, ce qui a pour résultat une acidification de l'eau. Si la solution est neutralisée, la protolyse continue, et des complexes dimériques et polymériques se forment, ce qui peut aboutir à la formation d'un précipité blanc qui est au départ soluble à la fois à pH acide et à pH basique. Les hydroxydes peuvent également former des structures cristallines denses et devenir de plus en plus insolubles, cette phase de maturation apparaît très lentement.

En moyenne, l'aluminium représente au maximum 8% de la croûte terrestre et l'ion est le composant majeur d'un grand nombre de minéraux. A pH neutre, les minéraux constitués d'aluminium sont très insolubles et la concentration en aluminium dissous est donc très faible à la surface de la Terre et dans les eaux souterraines. Par contre, la solubilité augmente avec la diminution du pH. L'acidification actuelle causée par les pluies acides (nitriques et sulfureuses) et l'utilisation de fertilisants acidifiés ont provoqué une augmentation de la quantité d'aluminium soluble dans le sols, les lacs, et les rivières. Cette acidification causerait donc l'introduction de l'aluminium dans la chaîne de vie et l'apparition de ses effets néfastes sur les organismes.

Les différentes compositions des sols et des roches sont la cause des différences de concentration en aluminium dissous qui varient de 10 µg/l à 1000 µg/l dans certains lacs et rivières de Suède. De nombreuses études concernant l'acidification des lacs (Driscoll, 1979) ont montré que ce n'était pas la diminution de pH qui était la cause première de la mort des jeunes poissons mais l'augmentation de la concentration en aluminium soluble dans l'eau. Il y a même des indications montrant que les taux élevés d'aluminium soluble dans les lacs sont la cause d'intoxications sérieuses, voire létales chez les oiseaux vivant dans l'environnement immédiat des lacs.

En ce qui concerne l'alimentation humaine, l'aluminium n'y est présent qu'en très petite quantité. De petites quantités d'aluminium sont également relarguées à partir des ustensiles de cuisine et se retrouvent dans la nourriture. Par conséquent, pour un régime alimentaire normal, la consommation d'aluminium est de 1 à 20 mg/jour (Lione, 1983).

4.2 / Métabolisme de l'aluminium

4.2.1 / Forme sous laquelle l'aluminium se trouve à l'intérieur de l'organisme

A la vue des similarités qui existent entre le fer et l'aluminium, le modèle métabolique décrit pour le fer a été étendu à l'aluminium.

Selon ce modèle, les ions existeraient sous quatre formes différentes: les ions libres, les complexes de faible poids moléculaire (P.M.), les complexes macromoléculaires réversibles et les complexes macromoléculaires irréversibles. Les ions libres sont présents en très

faible concentration. Les complexes de faible P.M. réalisés avec des acides organiques, des acides aminés, des nucléotides, des phosphates ou des hydrates de carbone sont parfois chélatés et peuvent être très stables. Ensuite, vu que l'aluminium possède une grande affinité pour un grand nombre de protéines, de polynucléotides, de glycosaminoglycans, etc., il se retrouve en grande partie sous forme de complexes macromoléculaires réversibles (métaboliquement, ces complexes sont moins actifs que les plus petits et cela pourrait contribuer à la lenteur du métabolisme de l'aluminium). Enfin, certaines liaisons de l'aluminium avec des structures macromoléculaires peuvent être si stables qu'elles sont irréversibles (au moins jusqu'à ce que la structure soit détruite). Si l'aluminium forme de tels complexes, cela pourrait conduire à une accumulation de celui-ci. Des arguments tenderaient à prouver que le noyau et la chromatine sont les destinations finales de l'aluminium dans les cellules et que des complexes irréversibles se retrouvent dans ces structures sans qu'il n'y ait d'effets mutagènes.

4.2.2 / Absorption et contenu corporel

Le contenu total en aluminium pour un individu en bonne santé est de 30 à 50 mg dont à peu près la moitié est localisée dans le squelette et un quart dans les poumons. A l'exception des poumons, l'origine de l'aluminium semble être l'alimentation.

4.2.3 / Distribution tissulaire

La concentration en aluminium la plus importante est probablement localisée dans les poumons: 20 mg/kg. Cette concentration importante pourrait être due à l'accumulation de composés insolubles d'aluminium pénétrant par les voies respiratoires.

Pour la plupart des autres tissus et organes, la concentration est de 0,3 à 0,8 mg/kg (100 à 300 fois moins que la concentation plasmique). Des concentrations importantes ont été décelées dans la peau, les conduits alimentaires, les nodules lymphoïdes et dans la glande parathyroïde. La concentration cervicale serait quant à elle de l'ordre de 0,25 à 0,75 mg/kg et la concentration osseuse serait de l'ordre de 5 à 10 mg/kg.

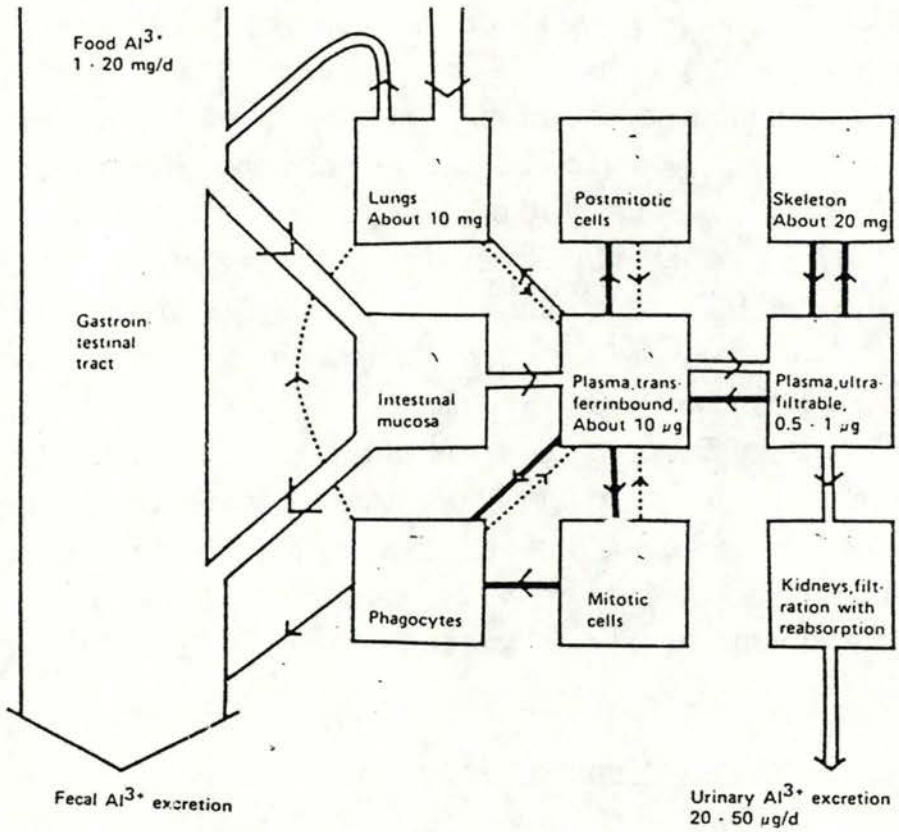


Figure 7: Modèle hypothétique du métabolisme de l'aluminium chez l'homme (d'après P.O. Ganrot, 1986). Pour les détails, voir le texte.

4.2.4 / Métabolisme général

Le modèle hypothétique du métabolisme de l'aluminium est représenté schématiquement à la figure 7.

1°/ Au niveau de la muqueuse intestinale : l'aluminium présente une faible absorption intestinale mais il semblerait qu'il y ait une grande fraction de l'aluminium qui soit localisée dans la muqueuse. En effet, l'aluminium se lie aux cellules de la muqueuse et retourne dans la lumière de l'intestin lorsque les cellules meurent. L'absorption intestinale serait au maximum de 2 µg/jour. Vu que l'excrétion urinaire journalière est d'au moins 20 µg/jour, une grande partie de l'aluminium absorbé serait excrétée par les urines, et cela expliquerait le problème d'accumulation d'aluminium en cas de déficience rénale.

2°/ Les poumons reçoivent continuellement de l'aluminium surtout sous forme de silicate d'aluminium ou d'autres composés faiblement solubles. Une partie de ces particules serait prise en charge par les macrophages alvéolaires par phagocytose et serait alors transportée au sein du système respiratoire où elle serait absorbée.

3°/ Dans le sang, l'aluminium serait uniquement présent dans le plasma où il serait lié à la transférine, probablement au même site de fixation que le fer. Il est probable que l'aluminium soit fortement lié à la transférine du fait de la faible dimension de l'ion Al^{+++}. De 25 à 200 µg/l d'aluminium plasmique sont ultrafiltrables par jour, cette fraction augmentant avec la concentration en aluminium. La concentration normale est comprise entre 1 et 5 mg/l.

4°/ Au niveau des reins, il y a une résorption tubulaire de l'aluminium et cet aluminium résorbé aurait tendance à se lier aux cellules tubulaires.

5°/ Excrétion fécale : une partie de l'excrétion gastro-intestinale s'effectuerait via la muqueuse de l'intestin grêle. Il semblerait que la voie métabolique d'élimination par le tractus gastro-intestinal serait plus lente que la voie conduisant à l'élimination par les reins, mais vu que l'élimination y est plus importante, les possibilités d'excrétion par les deux voies seraient similaires. Aucune certitude n'existe en ce qui concerne le mode d'excrétion fécale mais il existe une tentative d'explication via les granulocytes et les macrophages. Tout comme les

autres cellules, celles-ci seraient capables d'accumuler l'aluminium et donc de permettre son élimination. Cette hypothèse reposerait également sur le fait qu'il existe une très grande vitesse de turn-over de ces cellules et que certaines vont vers la muqueuse intestinale pour y mourir.

6°/ Au niveau des tissus conjonctifs et du squelette : l'aluminium est en grande partie lié au squelette et ces liens apparaîtraient surtout au niveau des parties métaboliquement actives du tissu osseux. Il se lierait également aux tissus conjonctifs vu qu'il semble avoir une grande affinité pour le collagène et les glycoaminoglycans (GAGS). En effet, les organes possédant beaucoup de tissus conjonctif comme la peau, possèdent un taux élevé d'aluminium. Cela s'expliquerait par le fait que le collagène possède un très lent turn-over qui ralentit encore au cours du vieillissement des tissus. Cette diminution de turn-over résulterait d'une diminution de la capacité de la protéine à être dégradée par la collagénase. Il serait donc possible que l'aluminium contribue au vieillissement du tissus en stabilisant le collagène vis-à-vis de la dégradation enzymatique. Par conséquent, si des tissus riches en collagène sont capables d'accumuler de l'aluminium, cela explique l'accumulation observée dans les parois des petits vaisseaux sanguins.

4.2.5 / métabolisme intracellulaire

L'absorption cellulaire a probablement lieu via les récepteurs à la transférine (la densité de ces récepteurs variant d'un organe à l'autre). Une fois fixé aux récepteurs, l'aluminium entrerait par endocytose et les vésicules fusionneraient alors avec les lysosomes, ce qui provoquerait une diminution de pH et donc la libération de l'aluminium. L'aluminium se retrouverait alors à l'intérieur de la cellule et, à ce moment, une partie resortirait par exocytose et le reste se lierait à diverses structures.

Les études qui ont révélé des mécanismes d'absorption de l'aluminium par les cellules ont été notamment réalisées avec l'isotope Al ^{28} à durée de vie de 2 à 8 minutes. En ce qui concerne la localisation intracellulaire, l'aluminium est en grande partie lié au noyau mais également aux lysosomes et aux autres structures.

4.3 / Biochimie et effet sur le métabolisme cellulaire

4.3.1 / Effet sur les enzymes et sur leurs substrats et produits

L'effet le plus étudié semble être l'inhibition de l'hexokinase (Harrison, 1972) qui est causée par la tendance de l'ATP à former des complexes très stables avec l'aluminium au lieu du magnésium. Le complexe ATP-Al^{3+} agit comme un inhibiteur compétitif puissant par rapport au substrat ATP-Mg^{2+}. L'interaction entre l'aluminium et l'ATP pourrait expliquer l'effet de l'aluminium sur un grand nombre d'enzymes où l'ATP agit comme substrat tel par exemple, les ATPases sodiques et potassiques. Parmi les autres enzymes inhibées, on trouve l'adénylate cyclase (Sternweis,1982), la phosphodiestérase 3',5'-AMP_c (Siegel, 1983), la phosphatase alcaline (Bamberger, 1968), l'acétylcholinestérase (Patocka, 1971), la cholinestérase plasmique (Marquis, 1983), la Catéchol-O-méthyltransférase (Mason, 1983), la ferroxidase (Huber, 1970) et la superoxyde dismutase (Shaikin-Kestenbaum, 1989).

L'inhibition de la phosphodiestérase est probablement le résultat de la grande affinité de l'aluminium pour la calmoduline, qui est l'activateur habituel de l'enzyme. L'aluminium a en effet été montré comme étant lié stéréochimiquement à la calmoduline et induit des changements conformationnels (Siegel, 1983). De plus, au niveau cellulaire, vu le rôle régulateur important que joue la calmoduline sur beaucoup d'enzymes, cet effet de l'aluminium semblerait aussi important que celui réalisé sur l'ATP.

Certaines enzymes ont également été décrites comme étant activées par l'aluminium, il s'agit de l'ALA-déhydratase, de la phosphoglucomutase et de la trypsine.

4.3.2 / Effet sur l'ADN et sur la division cellulaire

L'aluminium sous sa forme ionique semble avoir une grande affinité pour l'ADN ainsi que pour l'ARN et d'autres mononucléotides. Le type de liaison de l'aluminium à l'ADN est inconnu, mais il serait possible qu'il ne se lie qu'aux groupements phosphates et formerait alors un complexe Al/ADN-P (Karlik, 1980).

Des études *in vitro*, portant sur l'ajout d'histones ont montré un blocage de près de 80 % des possibilités de fixation de l'aluminium sur la chromatine (les histones étant liés aux groupements phosphates). Dans la

chromatine, les histones et les cations bivalents (Ca^{++} et Mg^{++}) réduisent les charges négatives de l'ADN et diminue donc les forces répulsives qui existent entre les brins d'ADN. Son effet sur la stabilité de la structure en double hélice a été étudié en mesurant le 'melting point' de l'ADN (par exemple en mesurant la température à laquelle les ponts hydrogènes entre les bases se rompent). Si on ajoute de l'aluminium à de l'ADN, il se retrouve probablement lié uniquement à une partie de l'ADN et cette portion est alors fortement stabilisée. A pH neutre, on peut observer une stabilisation de la structure de l'ADN, alors qu'à pH acide, il y a déstabilisation.

De plus, si *in vivo*, la concentration en aluminium est augmentée, le rapport Al/ADN-P atteint 0,006 et, à ce moment, la synthèse d'ARN est réduite de moitié par rapport au cas d'absence d'aluminium. Les effets sont fortement dépendants de la dose. Par contre la synthèse de l'ADN ne semble pas altérée par la présence de l'aluminium.

4.3.3 / Effet sur les microtubules et les filaments

Les intoxications expérimentales avec l'aluminium peuvent causer des dégénérescences neurofibrillaires (NFD) chez le chat (Crapper, 1973) et chez le lapin (DeBoni, 1976). Chez d'autres espèces, tel l'homme, l'aluminium semble ne pas produire des NFD *in vivo*, mais cela a été induit sur des cultures de cellules du cortex cérébral de foetus humain (Miller, 1974). La NFD est caractérisée par un dépôt fibreux autour du noyau des cellules nerveuses, et ce dépôt est constitué de filaments protéiniques de 10 nm superposés. Des NFD induites par l'aluminium ont pû être observées dans un grand nombre de neurones, de cellules pyramidiques géantes et de cellules de Purkinje. En corrélation avec l'augmentation du dépôt fibreux, on constate une diminution (de plus ou moins 20 fois) du nombre de microtubules dans les neurones affectés (Crapper, 1973).

L'analyse structurale des fibres accumulées suite à un traitement à la colchicine ou à l'aluminium montre que les protéines constitutives des neurofilaments normaux sont dominantes (Dahl, 1980).

On sait que les microtubules sont dans un état dynamique caractérisé par un assemblage et un désassemblage continuel, et ce processus est probablement essentiel à leur fonction. La colchicine empêche la polymérisation de la tubuline des microtubules et inhibe un grand nombre des fonctions intracellulaires de transport. En ce qui concerne

l'aluminium, il semblerait qu'il inhibe également la polymérisation de la tubuline ainsi que la division cellulaire chez certaines plantes.

4.3.4 / Effet sur les lipides membranaires

L'aluminium provoque une diminution de la fluidité des lipides membranaires, probablement en remplaçant le calcium et le magnésium comme contre-ion sur les phospholipides. Cet effet augmenterait avec l'augmentation de pH lorsque l'aluminium devient insoluble.

Chapitre2: Objectifs du travail

Dans l'introduction, nous avons décrit brièvement un modèle théorique du vieillissement cellulaire considérant l'évolution d'une cellule au cours du temps comme un passage par différents états stationnaires. Ce modèle prévoit que d'un état stationnaire à un autre, le niveau intracellulaire d'erreurs deviendra de plus en plus nuisible au maintien de l'homéostasie cellulaire pour atteindre finalement un seuil critique au-delà duquel la survie cellulaire devient impossible. La théorie ne prédit pas le nombre possible d'états stationnaires stables et, il est probable que ce nombre varie en fonction de l'état de différenciation et de l'espèce d'origine du type cellulaire considéré.

Nous avons ensuite expliqué pourquoi les fibroblastes en culture constituent un bon modèle expérimental pour tester cette théorie. En effet, au cours du vieillissement en culture, sept types successifs ont été mis en évidence par des critères morphologiques et biochimiques. D'après le modèle théorique, des cellules ayant subi un stress important devraient quitter leur état stationnaire pour ensuite en rechercher un nouveau caractérisé par un niveau d'erreurs plus élevé. Des travaux expérimentaux réalisés dans ce laboratoire ont montré que des stress réalisés avec un peroxyde lipidique organique, le tert-butylhydroperoxyde (TBHP) et l'éthanol ont bien pour effet un passage de fibroblastes de stades jeunes vers des stades âgés.

Pour compléter l'argumentation expérimentale en faveur d'une réorganisation globale de la cellule suite à un stress intense, nous avons décidé de tester l'effet d'un stress de nature totalement différente du TBHP ou de l'éthanol. Pour des raisons que nous avons citées dans l'introduction, nous avons choisi de tester l'effet des sels d'aluminium sur le vieillissement cellulaire dans le cadre du modèle théorique expliqué.

Ne connaissant pas la toxicité de l'aluminium sur des cellules en culture, il nous fallait commencer par une étude de toxicité afin de pouvoir déterminer une durée de stress et une concentration qui seraient utilisées par la suite pour l'étude du vieillissement.

Il est important de noter que l'aluminium n'est facilement soluble qu'à pH acide et en absence de groupements phosphates et sulfates qui le font

précipiter, c'est pourquoi nous avons choisi le tampon Puck qui n'en contient pas comme milieu salin pour les stress. De plus, vu que la mise à pH est impossible sous peine de faire précipiter l'aluminium, nous savions dès le départ que nous ne pourrions pas travailler à une concentration en aluminium supérieure à $2x10^{-4}$ M .

Une fois la toxicité de l'aluminium établie, la durée et le temps de stress déterminés, l'étude de l'effet de l'aluminium sur le vieillissement cellulaire se révèlait possible. A cette fin, nous avons utilisé le modèle de vieillissement des fibroblastes WI-38 qui passent successivement par sept états morphologiquement et biochimiquement distincts (Bayreuther et al., 1988).

Ce modèle étant établi, il nous était alors possible de tenter de trouver des agents protecteurs vis-à-vis du stress, de tenter de caractériser le mécanisme d'action du stress en utilisant des agents protecteurs déjà utilisés pour des stress de nature différente et surtout de tirer des conclusions quant à l'effet des stress d'aluminium sur le vieillissement cellulaire.

Chapitre 3: Matériels et méthodes

1 / Culture de fibroblastes

1.1 / Fibroblastes WI-38

Les fibroblastes utilisés proviennent de poumon d'embryon humain. Ces cellules sont mises en culture selon la méthode classique décrite par Hayflick en 1965. Nous les avons reçues de l'American Type Culture Collection.

1.2 / Décongélation et mise en culture

Les fibroblastes sont conservés dans une ampoule scellée, placée dans l'azote liquide (-196°C). Ceci permet une conservation des cellules sans qu'il n'y ait de modification du nombre de divisions après décongélation.

Dans l'ampoule, les cellules sont placées dans un petit volume de milieu de culture contenant 20 % de sérum et 10 % de diméthyl-sulfoxyde (DMSO) utilisé comme agent cryoprotecteur.

La décongélation est une étape rapide devant se dérouler en moins d'une minute. L'ampoule provenant de l'azote liquide est plongée dans un bain à 40°C. L'ampoule est ensuite centrifugée à 900 rpm pendant 10 minutes. Le milieu de congélation est décanté et les cellules sont reprises dans un milieu de culture additionné de 10 % de sérum. On les place alors dans une boîte de culture Cel-Cult (Angleterre) de 75 cm^2. Le lendemain, le milieu est changé.

1.3 / Milieu de culture

Le milieu de culture est essentiellement constitué du milieu de base de Eagle (13 acides aminés et 8 vitamines) et des sels de Earle. On y ajoute 1,6 g/l de $NaHCO_3$ et on ajuste le milieu au pH adéquat avant filtration. Ce milieu est stérilisé sur un appareil de filtration SM 162,98 Sartorius (filtre 0,22 µm) préalablement autoclavé à 120 °C pendant 20 minutes. Avant l'emploi, on y ajoute 10 % de sérum de veau foetal stérile (ICN-Flow, Angleterre) , qui apporte à la culture les facteurs de croissance nécessaires.

1.4 / Méthode de culture

Lorsque les cellules sont arrivées à confluence, elles sont détachées du support à l'aide de trypsine 0,25 % en solution saline (Gibco, Ecosse), tamponée par du tampon Tris et repiquées dans 2 ou 4 autres boîtes de culture. Ce travail est réalisé sous une hotte à flux laminaire et avec du matériel stérile afin d'éviter toute contamination.

Les fibroblastes WI-38 ont été cultivés dans un milieu BME (ICN-Flow, Angleterre) contenant 10 % de sérum de veau foetal (ICN-Flow, Angleterre) dans des boîtes de culture d'une surface de 75 cm^2 (Cel-Cult, Angleterre) et dans une atmosphère contenant 5 % de CO_2 et à 37°C.

2 / Mesure de la toxicité par dosage de protéines

Dans le cadre de la mesure de toxicité, les cellules sont repiquées dans des boîtes multi-compartimentées de 24 puits (Cel-Cult, Angleterre). Lorsque les cellules sont à confluence, après un rinçage dans du tampon Puck (solution saline composée de chlorure de sodium (8 g/l) (Janssen Biochimica, Belgique), d'hydrogénocarbonate de sodium (0,35 g/l) (Merck, Allemagne Fédérale), et chlorure de potassium (0,40 g/l) (Merck, Allemagne Fédérale)), les cellules sont soumises à différentes concentrations du produit à tester dilué dans le même tampon et laissé en présence durant un temps déterminé. Une fois le stress terminé, les cellules sont rinçées deux fois dans du Puck avant de remettre du milieu de culture. Deux jours après l'arrêt du stress, les protéines cellulaires sont dosées en reprenant les cellules dans 0,6 ml de NaOH 0,5 N (après avoir rincé 2 fois avec du pBS) duquel on reprend 0,4 ml pour un dosage de protéines suivant la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Lowry *et al.*.(1951).

3 / Détermination des types morphologiques

Pour la détermination des types morphologiques, les cellules sont cultivées à faible densité dans des boîtes de pétri de 6 cm de diamètre (Falcon, Angleterre) préalablement quadrillées, soit une densité d'environ 7

cellules/mm^2 (20000 cellules/boîte). Trois jours après leur repiquage, ces cellules sont fixées dans une solution aqueuse de formaldéhyde à 3,7 % (Merck, Allemagne Fédérale) pendant 10 minutes après deux rinçages des cellules avec du PBS (Phosphate Buffer saline). Ensuite, les cellules baignent dans un mélange éthanol-H_2O distillée (7:3 v/v) pendant 10 minutes et on les laisse ensuite sécher. La coloration cellulaire est réalisée au Bleu de Coomassie (50 mg de ce colorant (Janssen Biochimica, Belgique) est dilué dans 4,7 ml d'acide acétique (Janssen Biochimica, Belgique), 22,7 ml d'éthanol (Merck, Allemagne Fédérale) et 22,7 ml d'eau distilée) pendant 30 secondes. On rince ensuite à l'eau distillée et on laisse sécher à 40°C. Les comptages des différents types morphologiques sont effectués en microscopie de phase à deux reprises.

4 / Détermination de l'effet des stress uniques sur le type morpholgique

Avant la réalisation des stress uniques, les cellules sont repiquées à faible densité comme expliqué ci-dessus. Les stress consistent à remplacer le milieu de culture par du Puck contenant des concentrations variables d'$Al(NO_3)_3$ (nitrate d'aluminuim, Merck, Allemagne Fédérale) pendant un temps déterminé. Deux rinçages au Puck seul sont effectués avant de remettre du milieu frais. Les cellules témoins baignent dans le Puck seul pendant la durée de stress. Les types morphologiques des cellules sont ensuite déterminés après fixation et coloration ou après un suivi photographique.

5 / Stress successifs

Les stress successifs sont effectués comme suit: le premier stress est appliqué sur des boîtes à confluence. Le stress consiste à remplacer le milieu de culture par du Puck contenant de l'$Al(NO_3)_3$ (nitrate d'aluminuim, Merck, Allemagne Fédérale) pendant un temps déterminé. Deux rinçages avec du Puck seul ont lieu avant de remettre du milieu frais. Deux boîtes témoins sont incubées dans du Puck seul pendant la durée du stress. Les cellules sont ensuite repiquées en deux après le temps de récupération qui suit le stress. Les cellules étant de nouveau à confluence, on les stresse pour la

seconde fois et ainsi de suite. Lors de chaque repiquage, un petit échantillon de cellules est prélevé et repiqué à faible densité comme expliqué ci-dessus. Trois jours plus tard, ces cellules sont fixées et colorées et on calcule alors le pourcentage des différents types morphologiques. On photographie les boîtes de culture avant, juste après le stress et le lendemain du stress pour contrôler la mortalité cellulaire.

6 / Comptage de cellules survivantes

Les cellules attachées sur le support sont comptées individuellement chaque jour et considérées comme cellules survivantes. Cette méthode de comptage des cellules a été testée ailleurs (Michiels *et al.*, 1990) en utilisant le test de vialibilité utilisant le principe d'exclusion du colorant (acridine orange- bromure d'éthidium) (Parks *et al.*, 1979).

7 / Dosage de l'aluminuim en absorption atomique (Price, 1979)

La spectroscopie d'absorption atomique est une méthode analytique utilisée pour la détermination d'éléments et qui est basée sur la mesure de radiations produites par les atomes libres excités.

7.1 / Principes de base

7.1.2 / Spectre d'absorption

Dans les conditions pour lesquelles on utilise la spectrométrie atomique, l'énergie introduite au sein de la population des atomes peut être thermique, électromagnétique, chimique et même électrique.

Lorqu'il s'agit de l'absorption de l'énergie luminueuse, on parlera d'un spectre d'absorption lumineux constitué de l'absorption par les atomes de radiations de longueurs d'onde bien déterminées et correspondant donc à des quantités d'énergies précises. Par contre, si après excitation des atomes, on mesure de la lumière réémise par ceux-ci lors de leur désactivation, on parlera d'un spectre d'émission.

L'absorption et l'émission de photons dépendent de processus atomiques divers qui sont fonction de l'énergie mise en oeuvre. Ainsi, l'absorption pourra provoquer des modifications de l'énergie cinétique, de

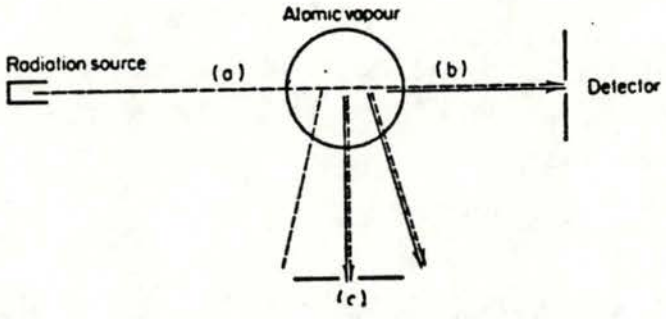


figure 8: Le rayonnement primaire (a) est atténué par l'absorption (b) et cause de la fluorescence, détectée en (c), (d'après Price, 1979).

rotation, de vibration ou d'excitation électronique. Lorsque les molécules sont en solution, les spectres sont peu étroits du fait de la dissipation de l'énergie par les collisions entre les molécules. Par contre, les spectres sont beaucoup mieux délimités (raies) pour des molécules ou atomes en phase gazeuse.

7.1.2 / Radiation de résonance

Dans la méthode analytique d'absorption atomique, le principe fondamental est l'absorption de radiations de résonance qui sont définies comme des radiations caractéristiques d'un élément correspondant au transfert d'un électron de son état fondamental à un état énergétique supérieur. Afin d'appliquer cette méthode analytiquement, il faut mesurer le coefficient d'absorption. La validité analytique des mesures d'absorption dépend de la relation entre l'absorption et la concentration en atomes ou de la mesure partielle des atomes absorbants, l'énergie absorbée étant proportionelle au nombre d'atomes en état d'absorbance. Vu la petite quantité d'énergie absorbée, un spectromètre de haute sensibilité est donc nécessaire.

Afin de mesurer la quantité d'énergie absorbée par les atomes d'un élément donné, on utilise un procédé semblable à celui présenté à la figure 8. Un appareil de mesure de la lumière placé en (b) est capable de détecter une différence entre la quantité d'energie absorbée par la vapeur atomique et l'énergie qui est développée par la lampe de radiation spécifique de l'élément que l'on désire quantifier (a). Lorsque l'on place l'appareil de mesure dans une autre position comme par exemple en (c), on peut mesurer la lumière qui est réémise en fluorescence.

7.2 / Formation de la vapeur atomique

7.2.1 / Production d'atomes libres

C'est de la production d'atomes non-ionisés et non-associés au sein de la vapeur que dépend la réussite du processus d'absorption atomique.

La solution contenant l'échantillon que l'on veut tester est aspirée et ensuite soumise à une température de 2000 à 3000°K. Dans ces conditions, le solvant s'évapore en laissant de petites particules solides qui vont alors fondre et se vaporiser. La vapeur est composée d'un mélange de

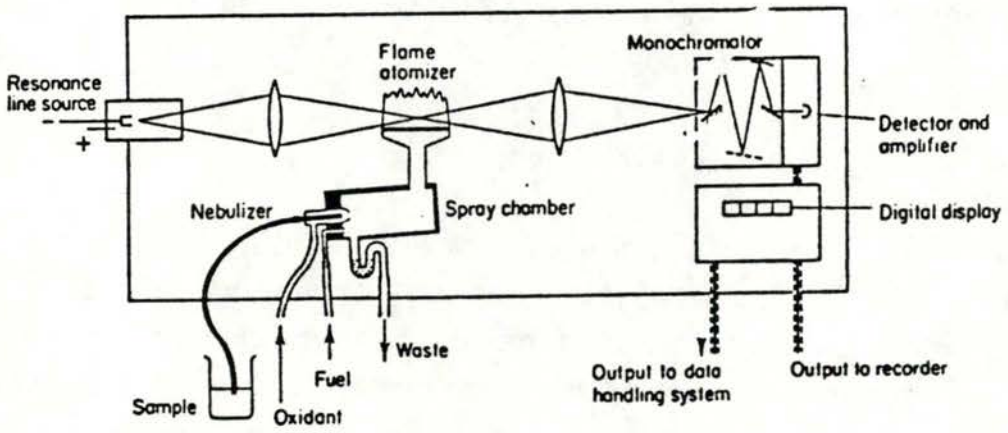


Figure 9: Système pratique pour le spectromètre d'absorption atomique à la flamme. L'échantillon est nébulisé à la flamme. Le monochromateur permet l'analyse du signal reçu après la traversée de la flamme. (d'après Price, 1979)

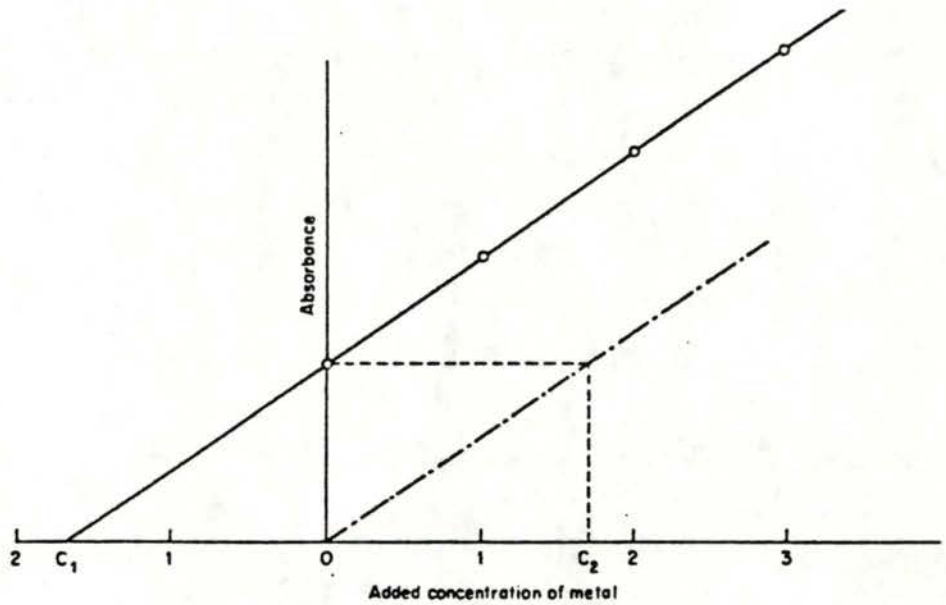


Figure 10: Méthode d'addition de standards (d'après Price, 1979). Pour des explication, voir le texte.

constituants qui ont tendance à se décomposer en atomes individuels. Les atomes libres existent bien entendu dans ces conditions et absorbent l'énergie par des collisions et deviennent alors excités ou ionisés.

7.2.2 /Système de base en absorption atomique

Le système est représenté à la figure 9. La lumière de la lampe source qui génère une ligne de spectre pointue caractéristique de l'élément que l'on désire mesurer passe au travers de la flamme dans laquelle la solution à tester est vaporisée. La région du spectre dans le voisinage immédiat de la ligne de résonance que l'on veut mesurer est sélectionnée à l'aide du monochromatographe. Cette lumière passe alors dans le détecteur qui est muni d'un photomultiplicateur permettant une amplification de la réponse de sortie.

7.3 / Technique analytique de mesure utilisée

Nous avons appliqué la méthode d'addition de standard interne qui est principalement utilisée lorsque la composition totale des échantillons n'est pas connue.

La solution échantillon est divisée en un nombre défini d'aliquots (au moins trois aliquots sont nécessaires). Dans chacun des aliquots, on ajoute une quantité connue de l'élément à mesurer, cette quantité en élément augmentant d'un aliquot à l'autre. Les solutions sont vaporisées à la flamme, ce qui permet la lecture des points d'absorbance.

Les résultats sont obtenus comme présenté à la figure 10. Le graphe obtenu constitue une ligne et l'absorbance des échantillons non modifiés est due à la concentration en élément recherché. La droite de calibration qui est constituée à l'aide des standards internes sans ajout de la solution à tester est parallèle à l'autre droite mais passe par l'ordonnée à l'origine. La concentration recherchée peut donc être lue en C2 (C2 étant égale à C1 par symétrie).

7.4 / Méthode

Au départ, nous avons une boîte de fibroblastes de 75 cm^2 (T 75) ayant subi ou non un stress sous aluminium à une concentration de $2x10^{-4}$ M durant 6 heures. Le milieu de culture est retiré et on effectue alors deux

rinçages successifs avec du tampon Puck. Ensuite les cellules sont récupérées par raclage de la T 75 dans 2 ml de Puck. Ces 2 ml sont alors transférés dans des creusets et mis à l'étuve à 80 °C pendant 2 à 3 heures afin d'obtenir une poudre qui pourra alors être mise dans le four à moufle à une température de 450 °C toute une nuit. Une fois cette opération terminée, les cellules ont été minéralisées et les cendres contenant l'aluminium sont resolubilisées afin de pouvoir le doser.

Afin de resolubiliser l'aluminium, on a préparé une solution acide contenant du HNO_3 1 N (Merck, Allemagne Fédérale), du $CaCl_2$ 1mM (Merck, Allemagne fédérale), et du KH_2PO_4 1mM (Merck, Allemagne Fédérale).Une fois l'aluminium resolubilisé, on dilue 2 fois chaque échantillon avec l'étalon interne (30, 60 et 90 ppm en aluminium ou le blanc ne contenant pas d'aluminium),pour chaque échantillon, on a donc quatre aliquots dont le contenu en aluminium sera mesuré en absorption atomique par la méthode d'addition de standard et l'on pourra donc en déduire la quantité d'aluminium contenue dans l'échantillon donné.

8 / Tests statistiques

La signification des résultats a été déterminée par un test t de student.

Les valeurs expérimentales sont exprimées en moyennes ± 1 écart type.

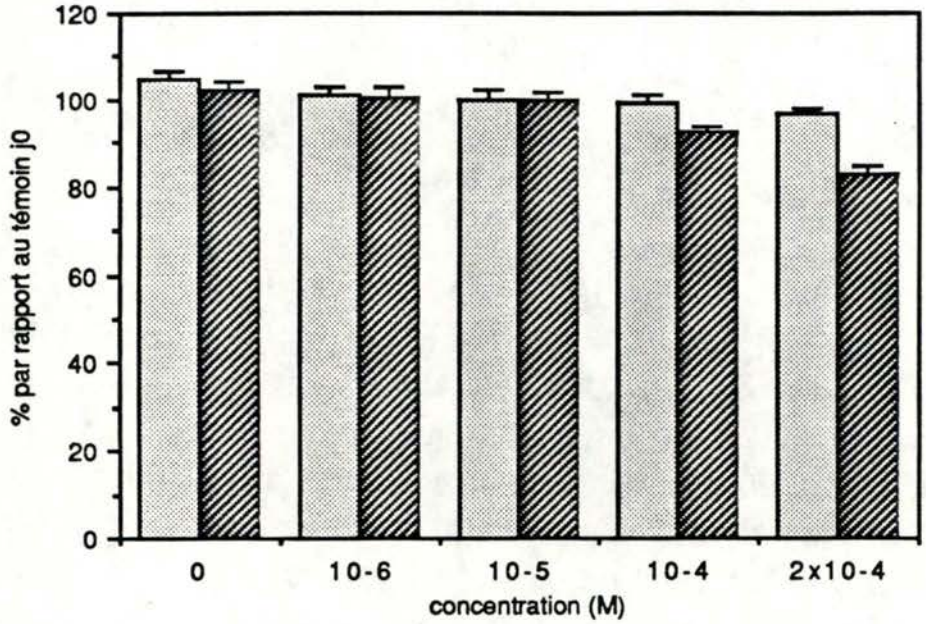


Figure 11: Toxicité du nitrate d'aluminium en fonction de sa concentration pour des temps de stress de 2 heures (pointillés) et de 4 heures (hachurés). Les résultats sont exprimés en % par rapport au témoin du jour 0 (avant stress).

de cellules ?

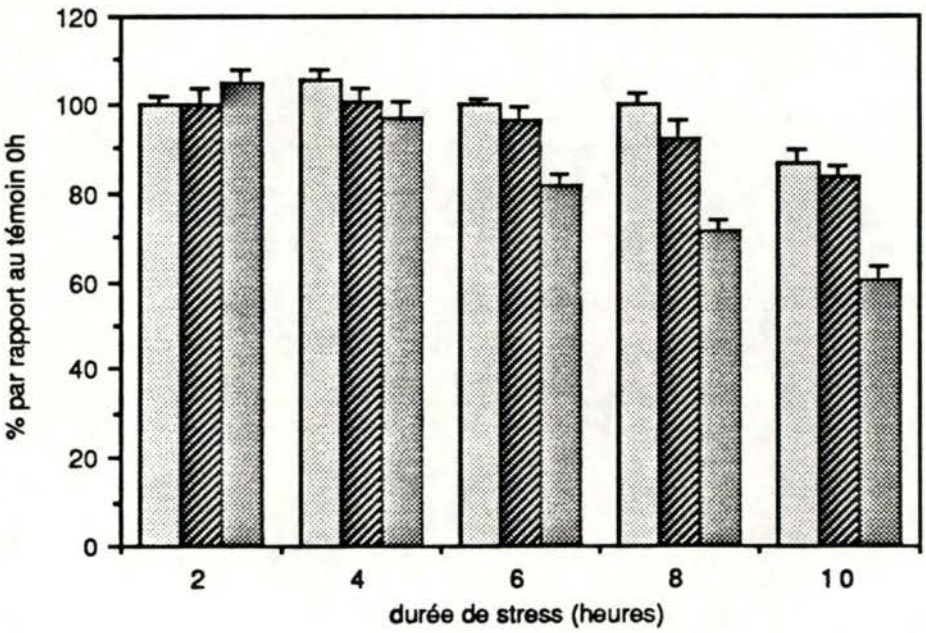


Figure 12: Toxicité du nitrate d'aluminium en fonction du temps en heures pour des concentrations en aluminium de 10^{-4} M (hachures foncées) et de $2x10^{-4}$ M (pointillés). Pointillés clairs: cellules incubées en présence du tampon Puck. Les résultats sont exprimés en % par rapport au témoin du jour 0 (avant stress).

Chapitre 4: Résultats

1 / Etude de la toxicité de l'aluminium

Le premier point était bien entendu de tester la toxicité possible de l'aluminium sur les cellules en culture. Nous avons estimé la toxicité en dosant les protéines cellulaires et ce en fonction de la concentration en aluminium et en fonction du temps de stress.

1.1 / Toxicité en fonction de la concentration

Nous avons commencé par une étude de toxicité en fonction de la concentration en aluminium. Nous savions que nous ne pourrions pas travailler à une concentration supérieure à $2x10^{-4}$ M pour des raisons de solubilité des sels d'aluminium à pH neutre. Nous avons testé l'effet de l'aluminium sous forme de nitrate d'aluminium à cette concentration ainsi qu'à trois autres (10^{-4} M, 10^{-5} M, et 10^{-6} M) pendant des temps de deux heures et quatre heures de stress.

En analysant les résultats représentés à la figure 11, nous pouvons constater que, dans les deux cas, nous avons bien une augmentation de la toxicité aux plus fortes concentrations en aluminium. Cet effet est le plus marqué à 4 heures avec une toxicité de 18 % pour une concentration en aluminium de $2x10^{-4}$ M.

A partir de ces résultats, nous avons donc décidé de garder des concentrations de $2x10^{-4}$ M et de 10^{-4} M pour l'étude de toxicité en fonction de la durée de stress.

1.2 / Toxicité en fonction de la durée de stress

Afin de choisir un temps de stress, nous avons effectué une étude de la toxicité pour des temps de 2 à 10 heures de stress.

En examinant la figure 12, nous pouvons constater, pour une concentration en aluminium de $2x10^{-4}$ M, une toxicité de 20 % pour des temps de six heures et pouvant atteindre 40 % pour un temps de stress de 10 heures. Tandis que pour une concentration en aluminium de 10^{-4} M, on ne

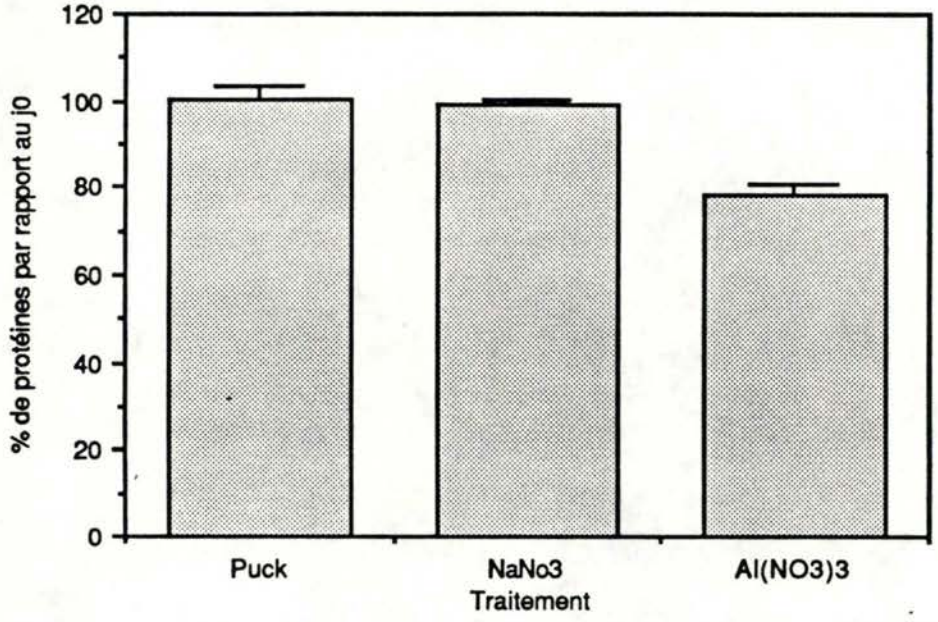


Figure 13: Test de spécificité de la toxicité de l'aluminium. Ces résultats ont été obtenus après comptage du nombre de cellules. Les résultats sont exprimés en % de cellules au lendemain du stress (jour 1) par rapport au nombre de cellules présentes avant le stress. Le stress fut réalisé par une incubation de 6 heures soit dans le tampon Puck seul, ou en présence de $NaNO_3$ à $6x10^{-4}$ M ou $Al(NO_3)_3$ à $2x10^{-4}$ M (n=3).

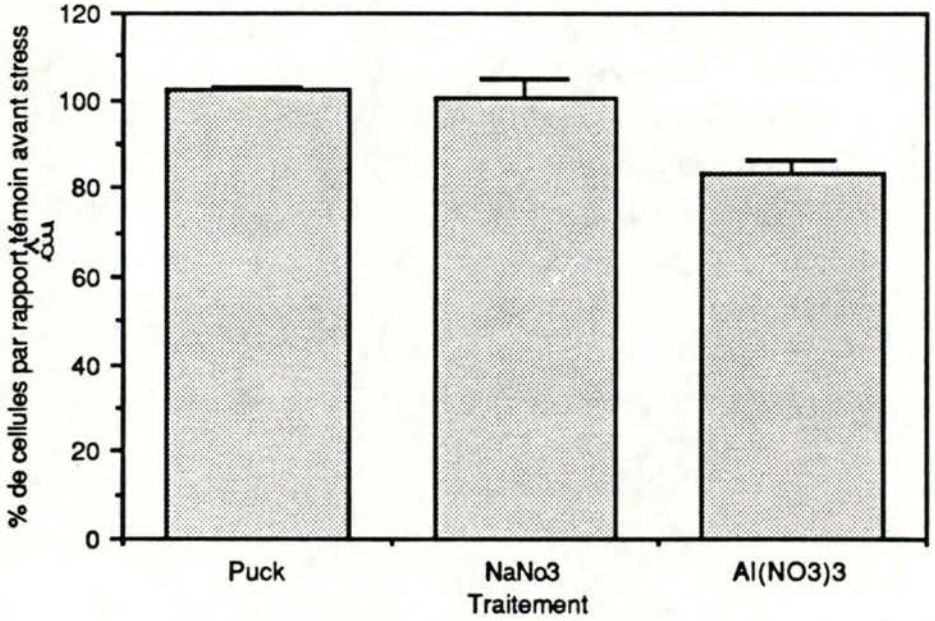


Figure 14: Test de spécificité de la toxicité de l'aluminium. Ces résultats ont été obtenus après dosage des protéines cellulaires 2 jours après le stress. Les résultats sont exprimés en % de protéines par rapport au jour 0 (avant stress).

peut pas constater de différence significative par rapport au témoin qui présente une toxicité de 15 % après dix heures.

Nous avons décidé d'effectuer les stress durant un temps de six heures vu qu'à ce moment, la toxicité est pratiquement inexistante pour le témoin mais est voisine de 20 % pour le stress en présence d'aluminium à une concentration de $2x10^{-4}$ M.

1.3 / Tests de spécificité de la toxicité de l'aluminium

Une fois notre modèle expérimental de toxicité établi, il nous fallait vérifier que la toxicité constatée était bien due à la présence d'aluminium et non à un autre effet tel par exemple un effet simple de charge ionique dû à la présence d'électrolytes dans le milieu.

Dans ce but, nous avons effectué un test en utilisant du nitrate de sodium ($NaNO_3$) à une concentration de $6x10^{-4}$ M afin de garder une concentration identique à celle du nitrate d'aluminium ($2x10^{-4}$ M). Ces tests furent effectués en dosant les protéines cellulaires et en comptant le nombre total de cellules toujours fixées à la boîte de culture. En examinant les figures 13 et 14, nous pouvons constater que dans les deux cas, on a un effet toxique du stress en présence de nitrate d'aluminium et pas d'effet toxique pour le stress en présence de nitrate de sodium.

Nous avons ensuite effectué un test de T de student afin de déterminer si la différence était significative.

Méthode	Signification des résultats
Dosage de protéines	SS (P>0,995) (n=4)
Comptage de cellules	SS (P>0,995) (n=2)

Etant donné que l'aluminium semblait bien être toxique par lui-même, nous avons alors vérifié si l'aluminium se retrouvait bien au niveau des cellules et cela grâce à un dosage de l'aluminium en absorption atomique après minéralisation des cellules. Nous avons en même temps décidé d'effectuer une courbe de dosage de l'aluminium au cours du temps après le stress afin de connaître l'évolution du relargage de l'aluminium par les

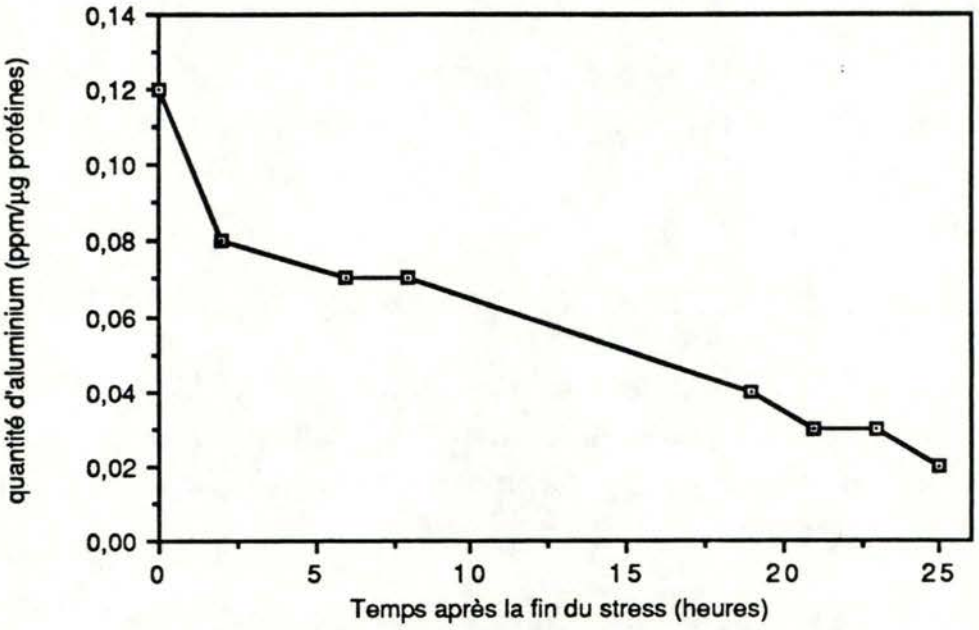


Figure 15: Dosage de la quantité d'aluminium en absorption atomique en fonction du temps après le stress. Les résultats sont exprimés en ppm par µg de protéines et par ml d'échantillon (la valeur obtenue suite à la mesure au spectromètre est divisée par la quantité de protéines cellulaires mesurée avant la minéralisation des cellules).

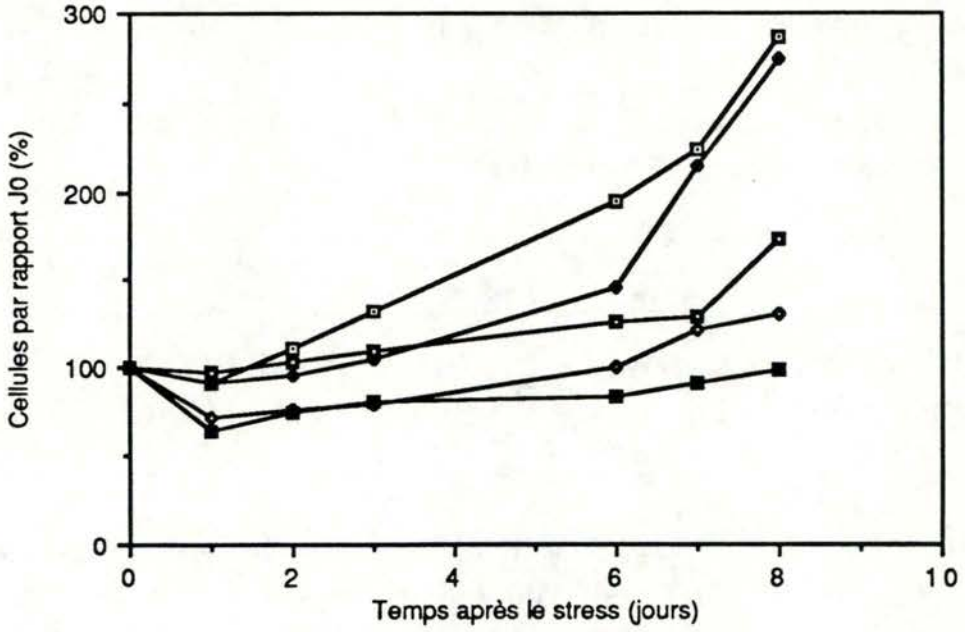


Figure 16: Pourcentage de cellules après un stress sous aluminium de 6 heures à des concentrations de 10^{-6} M (losanges noirs), 10^{-5} M (carrés noirs pointés blancs), 10^{-4} M (losanges blancs), de $2x10^{-4}$ M (carrés noirs) et (carrés blancs pointés noirs) pour des cellules contrôles qui sont restées en présence de la solution saline Puck durant 6 heures. Les résultats ont été obtenus après comptage du nombre de cellules durant 8 jours. Les résultats sont exprimés en % de cellules par rapport au jour 0 (avant le stress).

cellules au cours du temps. Les résultats exprimés à la figure 15 montrent que l'on a effectivement une augmentation de la quantité d'aluminium au niveau des cellules puisque l'on retrouve une valeur de 0,12 ppm par µg de protéines cellulaires; on peut également voir qu'il y a une diminution de cette quantité d'aluminium au cours du temps suivant l'arrêt du stress pour atteindre après 25 heures une valeur de 0,02 ppm par µg de protéines cellulaires. Cette valeur est toujours supérieure à celle d'une même culture n'ayant pas subi de stress puisque dans ce cas l'on ne peut pas détecter l'aluminium.

1.4 / Effet de l'aluminium sur les mitoses

L'aluminium ayant un effet négatif sur la survie des cellules, il nous paraissait aussi intéressant de regarder si l'aluminium pouvait bloquer la mitose. Dans cette perspective, nous avons effectué un suivi au cours du temps sur des boîtes préalablement quadrillées afin de pouvoir compter le nombre de cellules dans chacun des quadrillages.

Si nous examinons les résultats de la figure 16, nous constatons que:

- pour les cellules témoins ayant été incubées pendant 6 heures avec la solution saline, il y a une reprise de mitose après un jour.
- pour une concentration en aluminium de 10^{-6} M, nous avons une reprise de la mitose mais qui est légèrement décalée de 1 ou 2 jours par rapport au témoin.
- pour une concentration de 10^{-5} M, nous avons une reprise de mitose après un temps beaucoup plus long, environ 6 jours.
- pour des concentrations de $2x10^{-4}$ M et 10^{-4} M, nous n'avons pas de reprise importante de la mitose 8 jours après le stress.

Afin de visualiser plus précisément les résultats, nous avons exprimé les résultats en pourcentage de cellules au jours 8 après le stress par rapport au nombre de cellules présentes avant le stress c'est-à-dire au jour 0 en fonction de la concentration en aluminium. Ces résultats sont représentés à la figure 17. Nous pouvons constater que l'effet négatif sur le taux de mitose est d'autant plus marqué que le stress sous aluminium a été intense. D'autre part, il est remarquable que l'on obtienne un ralentissement du taux de mitose à des concentrations en aluminium (10^{-5} M et 10^{-6} M) où l'on observe aucune mortalité cellulaire. le taux de mitose

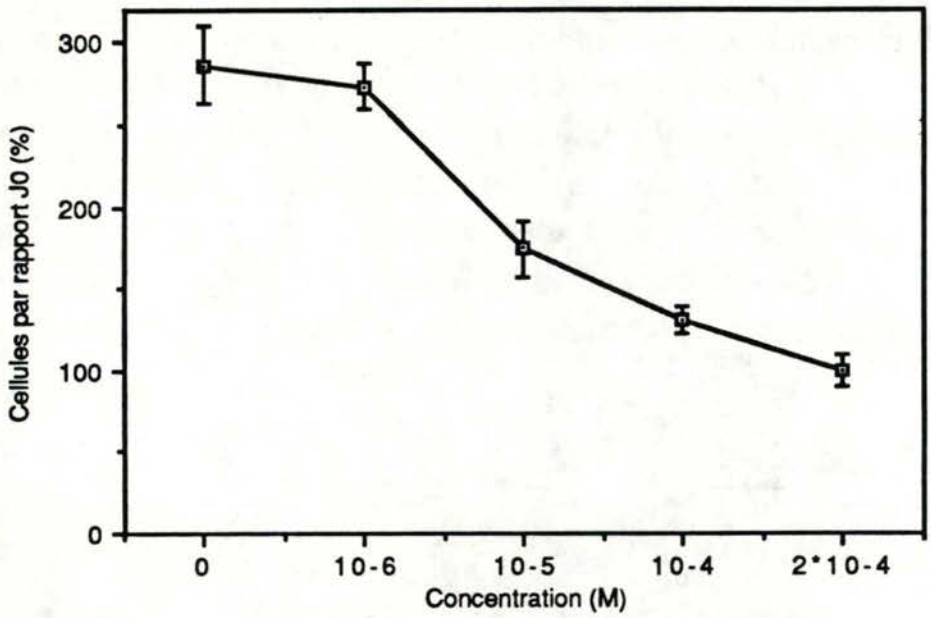
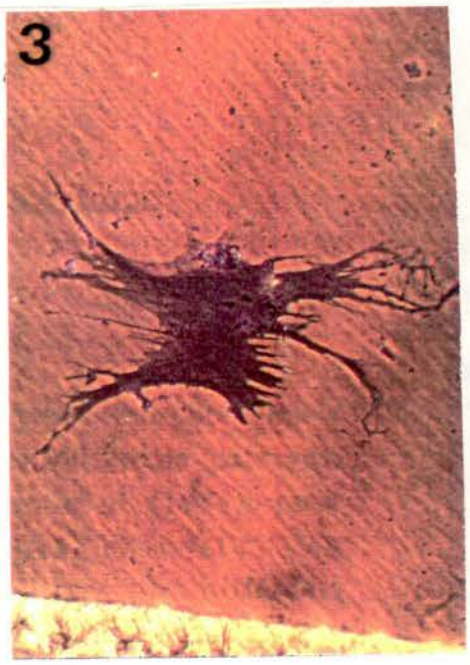


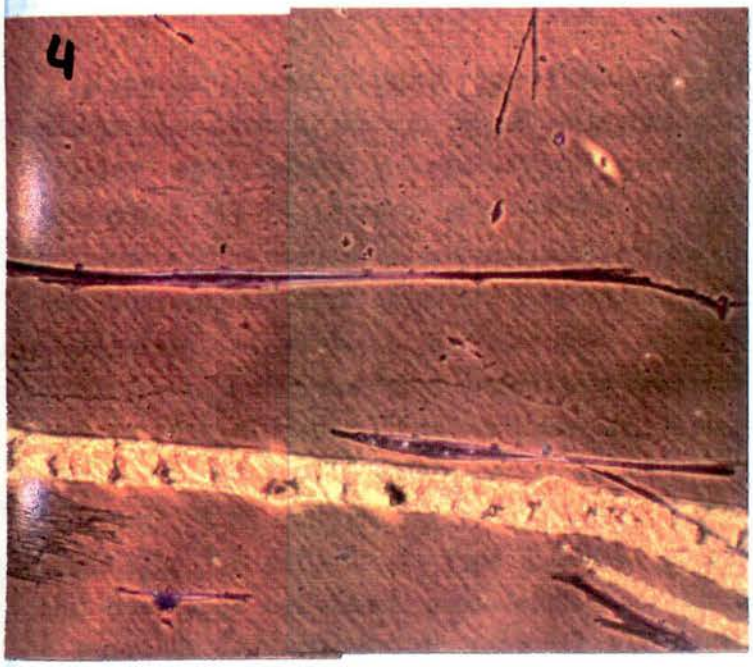
Figure 17: Pourcentage de cellules comptées au jour 8 par rapport au jour 0 (avant stress) en fonction des concentrations en aluminium (n=3).

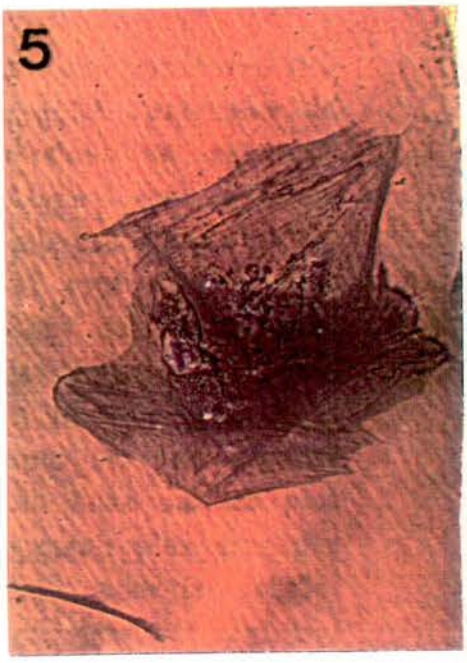
Figure 18: Les différents types morphologiques au cours du vieillissement *in vitro* des fibroblastes WI-38. Type I (fig. 18-1), II (fig. 18-2), et III (fig. 18-3) pour les cellules mitotiques et type IV (fig. 18-4), V (fig. 18-5), VI (fig. 18-6), et VII (fig. 18-7) pour les cellules post-mitotiques. Coloration des cellules au bleu de Coomassie après fixation. Grossissement 250x.

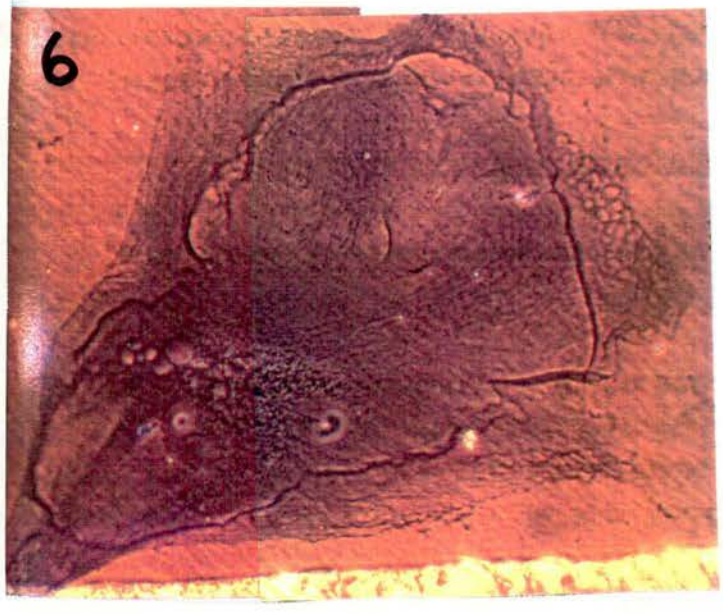

1


2


3


4


5


6


7

semble donc être un moyen plus sensible pour déterminer un effet des stress sur les cellules. Par exemple, le nombre de cellules est réduit de 50 % par rappport au témoin après 8 jours pour une concentration en aluminium de l'ordre de 10^{-5} M alors que la toxicité n'atteint qu'environ 30 % pour une concentration 20 fois supérieure ($2x10^{-4}$ M).

2 / Effet de stress uniques et successifs sur le vieillissement

2.1 / Présentation des types morphologiques

Nous avons commencé par la détermination des types morphologiques présents dans une culture de fibroblastes au cours des différents passages. Les sept types morphologiques décrits par Bayreuther *et al.* (1988) pour des fibroblastes de peau ont été recherchés après observation en microscopie de phase de cellules provenant de cultures de différents passages. La figure 18 montre les sept types morphologiques pour les fibroblastes WI-38.

Rappelons tout d'abord que l'analyse biochimique des protéines des cellules de chacun de ces types morphologiques a montré l'existence de peptides spécifiques à ces types morphologiques dans le cas des fibroblastes WI-38 (Francz *et al* ,1989). Les cellules de type I sont en forme de fuseaux très effilés et souvent très réfringentes en microscopie de phase. Leur contour est très régulier. Les cellules de type II sont d'aspect plus rectangulaire et ramassé. Les cellules de type III sont de formes plus variées, leur taille est plus importante que les cellules de type II et leur pourtour est effiloché. Les cellules de type IV sont très longues et le rapport largeur sur longueur est très faible. Leur contour est plus régulier et dentelé. Les cellules de type V sont polygonales et d'une surface plus grande que les cellules de type I à III. Leur noyau apparaît plus gros que celui des types cellulaires précédents. Ceci est aussi valable pour les cellules de type VI. Les cellules de type VI sont surtout caractérisées par leur très grande surface. Nous avons en effet calculé que la surface d'une cellule de type VI peut contenir 50 ou 60 fois celle d'une cellule de type I. La dégénérescence donne lieu au type VII: cellules d'aspect effiloché avec de très larges crénaux irréguliers dans leur pourtour.

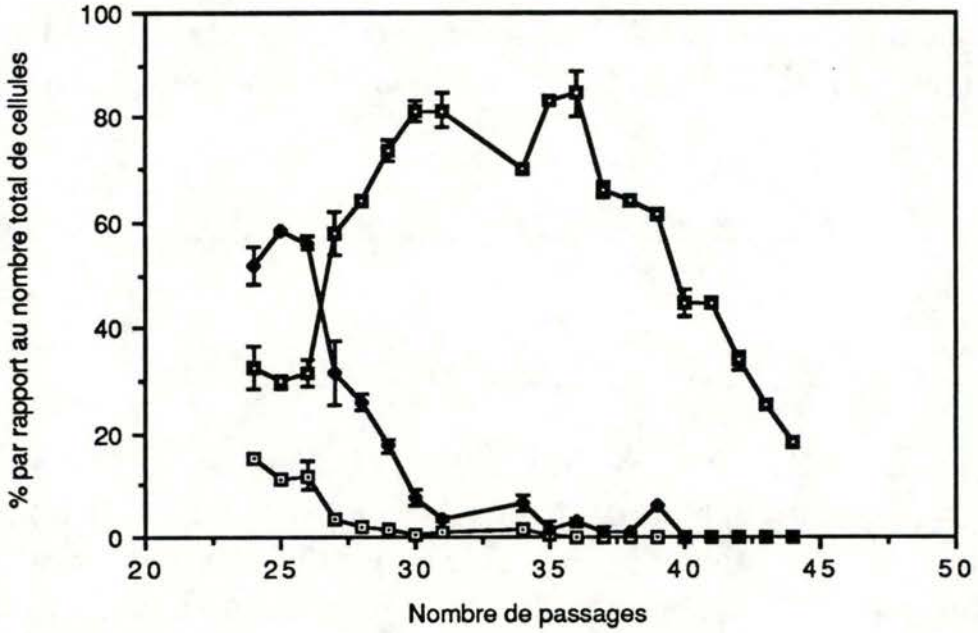


Figure 19: % des cellules de type morphologique I, II, et III au cours des passages des cellules WI-38 en culture. Carrés ouverts: % de cellules de type I, losanges fermés: % de cellules de type II et carrés fermés: % de cellules de type III (n=4).

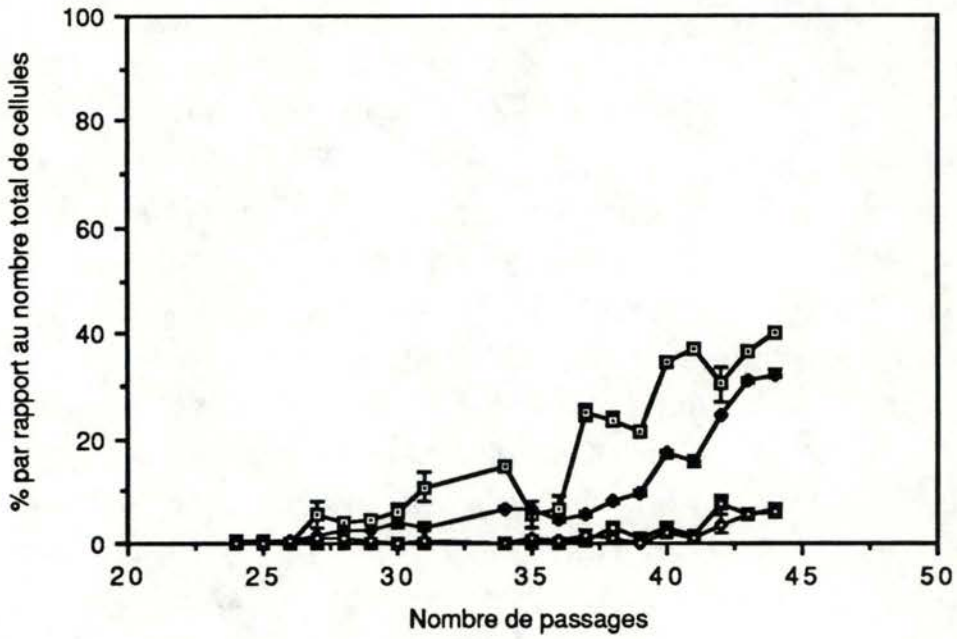


Figure 20: % des cellules de type morphologique IV, V, VI, et VII au cours des passages des cellules WI-38 en culture. Carrés ouverts: % de cellules de type IV, losanges fermés: % de cellules de type V, carrés fermés: % de cellules de type VI, et losanges ouverts: % d cellules de type VII (n=4).

2.2 / Proprotions des types morphologiques

Nous avons ensuite calculé les proportions des types morphologiques présents au cours du vieillissement *in vitro* des fibroblastes WI-38.

La figure 19 présente la proportion des cellules de type I,II,III (cellules mitotiques) au cours des passages. L'interprétation des graphes est aisée. La proportion des cellules de type I diminue pour atteindre une valeur nulle: le type cellulaire le plus jeune diminue en premier lieu. Cela entraîne l'augmentation de la proportion des cellules de type II. Cette dernière proportion atteint un maximum et dimine ensuite pour laisser la place aux cellules de type III dont la proportion augmente nettement.

La figure 20 présente les proportions de cellules de type IV, V, VI et VII (types post-mitotiques) au cours des passages. Nous retrouvons ici l'ordre logique des proportions des différents types cellulaires, par ordre décroissant: IV, V, VI, et VII. Les comptages étant réalisés sur des cultures contenant toujours des cellules mitotiques, il est normal que le nombre de cellules de type IV à VII soit assez faible par rapport à celui des cellules mitotiques I, II, et III. Ce rapport augmente lors des derniers passages de la culture puisque la culture contient alors de plus en plus de cellules.

Chaque point des figures 19 et 20 représente la moyenne de comptages effectués sur deux quadrillages de 1 cm^2 séparés dans des boîtes différentes. Cette expérience a donc été réalisée sur un total de 10000 cellules.

Les courbes de ces figures nous serviront de témoin pour les expériences où des stress uniques ou successifs seront appliqués au cours des passages et où nous déterminerons les proportions des différents types morphologiques après les stress.

2.3 / Effet des stress uniques

D'après le modèle théorique, un stress de n'importe quelle nature peut avoir un effet d'accélération sur l'évolution des cellules de types jeunes vers des cellules de types plus âgés. Les stress ont été effectués avec une

Jour 0

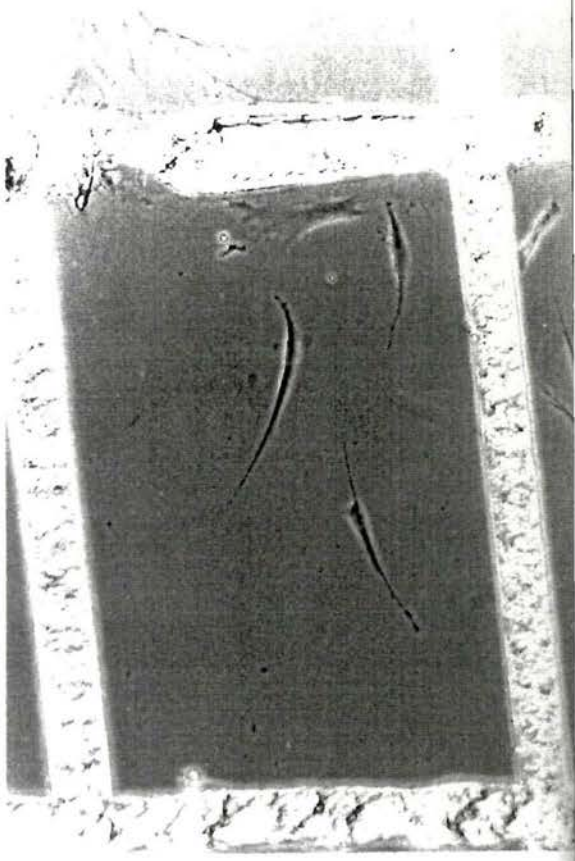


Figure 21: Effet d'un stress sous aluminium de 2x10-4 M de 6 heures. De gauche à droite, croissance des cellules, qui vieillissent, au jour 0, 5, et 9.



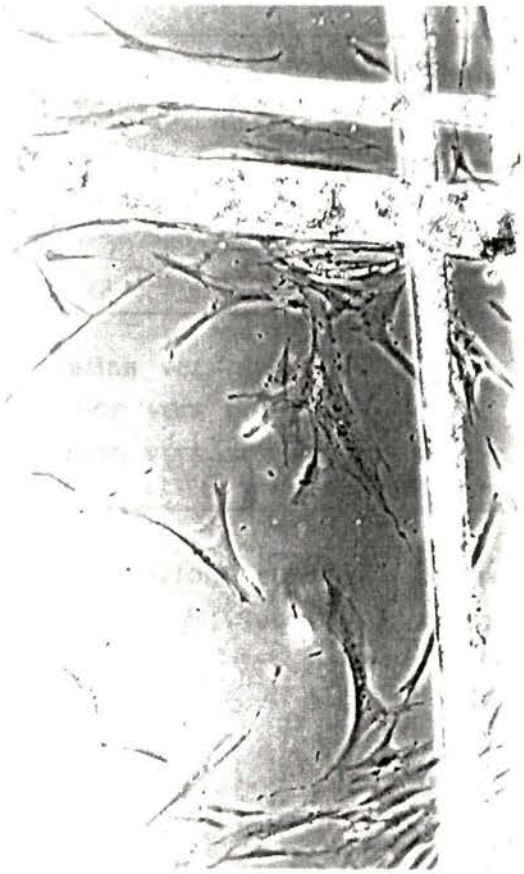
Figure 22: Effet d'un stress sous aluminium de 2x10-4 M de 6 heures. De gauche à droite, croissance des cellules, qui forment des clones lents, au jour 0, 5, et 9.

Jour 5



Jour 9





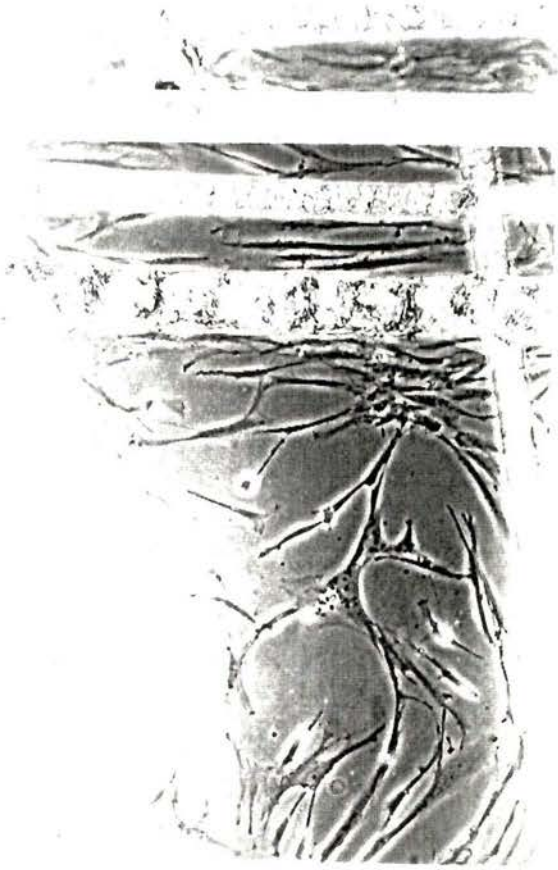
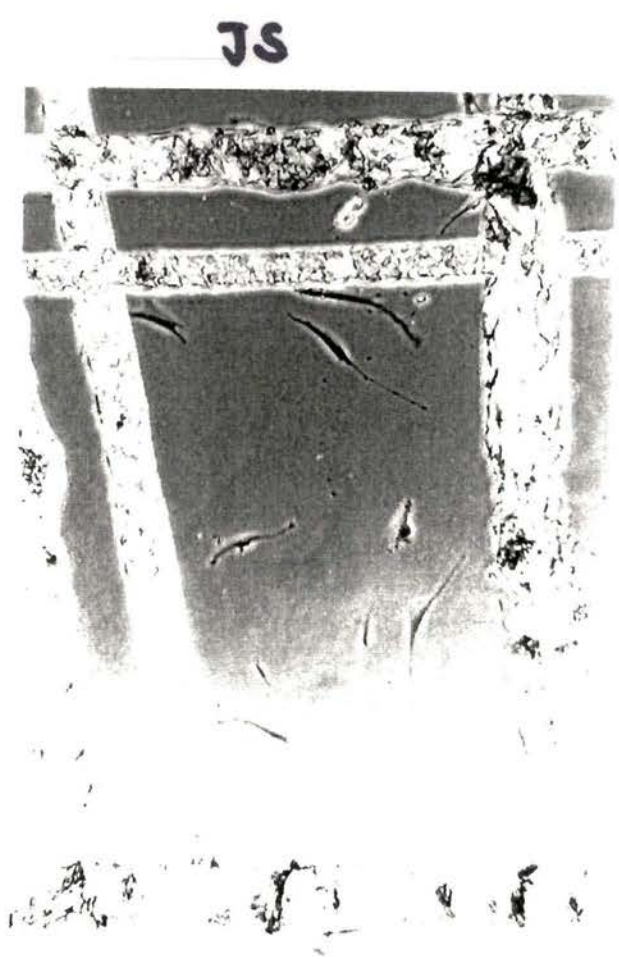




Figure 23: Effet d'un stress sous aluminium de 2x10-4 M de 6 heures. De gauche à droite, croissance des cellules, qui forment des clones rapides, au jour 0, 5, et 9.





concentration en aluminium de $2x10^{-4}$ M et un temps de 6 heures. Afin de voir si la sensibilité aux stress augmente avec le vieillissement et donc, s'il y avait un effet de passage d'un type à un autre plus important avec une culture de cellules plus âgées, nous avons effectué une étude sur des cellules provenant de culture de passages 25, 35 et42.

2.3.1 / Effet du stress sur des cellules de culture de passage 25

Nous avons repiqué des cellules à faible densité dans des boîtes quadrillées et nous les avons suivies en microscopie de phase 10 jours après le stress. Nous avons également effectué des photos de 10 cases prises au hasard dans la boîte que nous avons suivies également afin de montrer que l'on avait bien un passage d'un type à un autre.

a/ Aspects qualitatifs

En plus de la mortalité cellulaire qui suit le stress, trois phénomènes différents ont lieu et nous les avons illustrés par trois séries de photos. La première série de photos (figure 21) montre l'évolution des cellules de départ, de types jeunes, vers des cellules de types âgés. De la première à la dernière photo, 9 jours se sont écoulés. La seconde série de photos (figure 23), montre que les cellules jeunes de la même boîte peuvent récupérer après le stress et se diviser normalement, formant des clones à division rapide. Enfin, sur la troisième série de photos, figure 22, nous avons des cellules jeunes qui, elles, ont des difficultés à récupérer après le stress et se multiplient beaucoup plus lentement formant des clones à division lente. Les cases qui étaient remplies de cellules de type jeune après 9 jours ont été considérées comme contenant des clones à division rapide, tandis que celles qui contenaient peu de cellules ont été considérées comme contenant des clones à division lente.

Après les séries de photos, nous avons fixé et coloré les boîtes afin de dénombrer la proportion de chacun des trois phénomènes. Ces proportions sont représentées dans le tableau I (page suivante).

Nous constatons donc que la proportion de cellules qui évoluent vers des types âgés est quand même conséquente mais que le cas le plus fréquent est celui des cellules qui restent très longtemps en inhibition de division. La proportion des clones rapides peut s'expliquer par le fait que

Figure 24

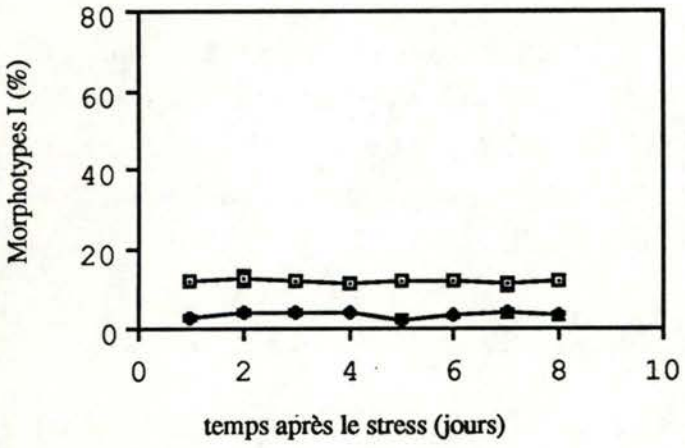


Figure 25

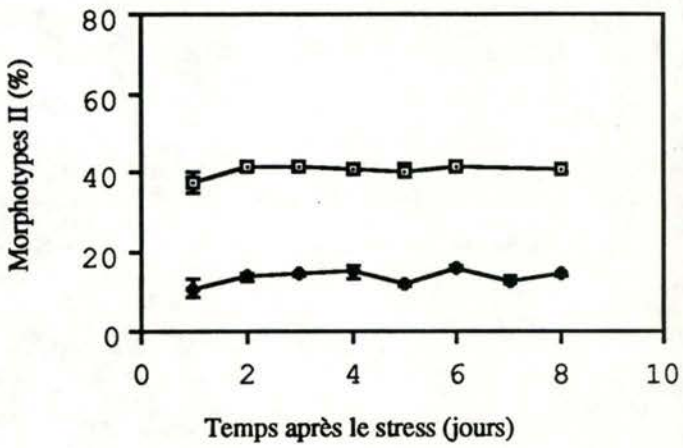


Figure 26

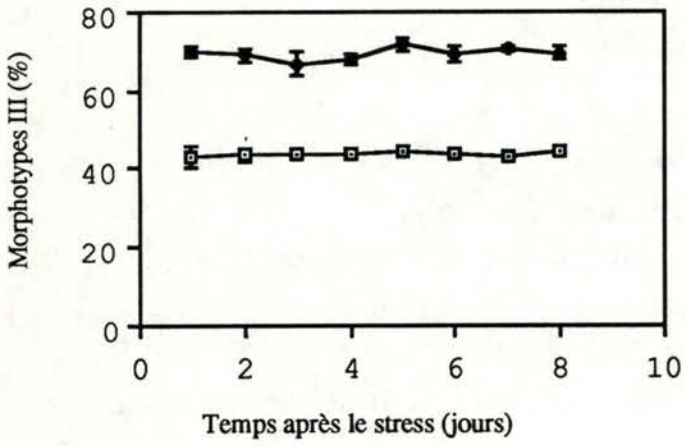


Figure 27

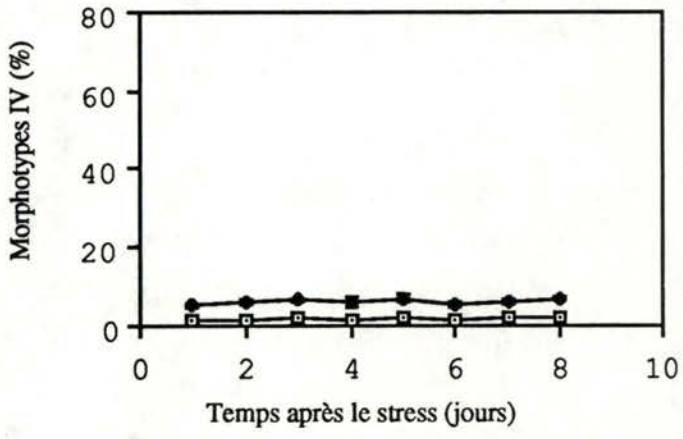


Figure 28

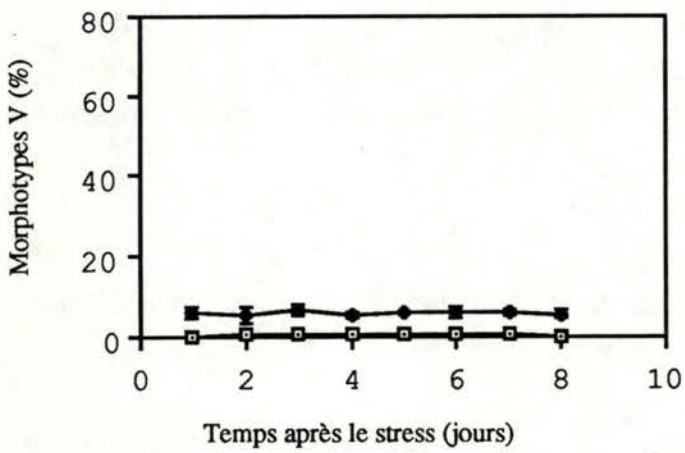


Figure 29

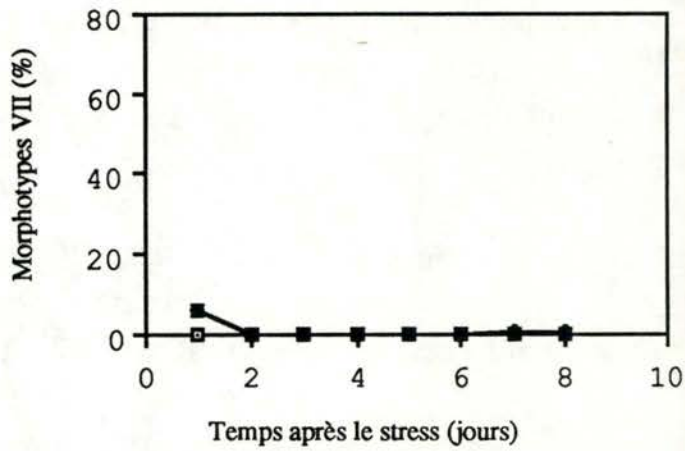


Figure 24 à 29: Effet d'un stress sous aluminium à une concentration de 2×10^{-4} M et durant un temps de 6 heures, réalisé sur une subculture à passage 25, sur les types morphologiques I (fig. 24), II (fig. 25), III (fig. 26), IV (fig. 27), V (fig. 28), et VII (fig. 29). Pour chacune des figures, les résultats sont exprimés en % de types morphologiques en fonction du temps de stress. Carrés ouverts: témoin, et, losanges fermés; stress sous aluminium.

les stress sont effectués sur des cellules de type jeune qui résistent bien au stress.

Tableau I: Proportion de cases où les cellules de type jeune soit évoluent vers des types âgés, soit se divisent activement, soit très lentement après un stress, par rapport au nombre total de cases présentes dans la boîte.

Phénomène	Pourcentage de cases
évolution vers types âgés	18,7 %
évolution vers des clones lents	47,3 %
évolution vers des clones rapides	34,0 %

b/ Aspects quantitatifs

Nous avons également effectué une étude de l'effet d'un stress sur les proportions de chaque type morphologique. Ne sachant pas si l'évolution serait rapide après le stress, nous avons fixé une boîte ayant subi un stress chaque jour pendant les 8 jours suivants afin de déterminer les proportions de types morphologiques.

En examinant les figures 24 à 29, après 8 jours, nous pouvons constater:

- que la proportion de cellules de type I diminue de 12% avant le stress à 3% après le stress (fig. 24).
- la proportion de cellules de type II diminue de plus ou moins 40% avant le stress à plus ou moins 15% après (fig. 25).
- la proportion de cellules de type III passe de 45% avant le stress à 70% après le stress (fig. 26).
- la proportion de cellules de type IV passe de 2% avant le stress à 6% après le stress (fig. 27).
- la proportion de cellules de type V passe de 0,5% avant le stress à 6% après le stress (fig. 28).
- qu'aucune cellule de type VI n'apparaît (non représenté).
- Les cellules de type VII apparaissent le lendemain du stress uniquement (plus ou moins 6%), il s'agit des cellules qui sont en train de mourir suite au stress (fig. 29) .

Globalement, on observe donc très bien une diminution de la proportion de cellules de types jeunes (I, II) en faveur d'une augmentation de la proportion des cellules de types âgés.

Afin de se rendre compte de la proportion totale de variations de type morphologique après un stress, nous avons repris les variations de chaque type (la valeur calculée étant la moyenne des 8 jours avec l'intervalle de confiance) dans le tableau II et avons cumulé les valeurs obtenues, ce qui nous a servi de critère pour évaluer l'effet global du stress sur l'évolution des types morphologiques.

Tableau II: Proportions de chaque type morphologique avant et après le stress et pourcentage de modification de chaque type.

Type	% avant	% après	% de modifications
I	11,8±0,7	3,3±1,4	-8,5±1,4
II	41,9±2,9	14,1±1,9	-27,8±2,9
III	44,5±1,3	69,3±2,9	+26,8±2,9
IV	1,4±0,9	6,1±1,2	+5,4±1,2
V	0,5±0,2	5,9±1,9	+5,4±1,9
VI	0	0	0
VII	0	0,9±0,4	+0,9±0,4
			Modification totale: 72,1±1,8 (valeurs absolues)

On observe d'après ce tableau que le pourcentage total de modifications de types morphologiques suite à un stress est élevé et est principalement dû à une diminution des deux premiers types dont 27% de cellules de type II et à une augmentation des autres types dont également 27% de cellules de type III .

Figure 30

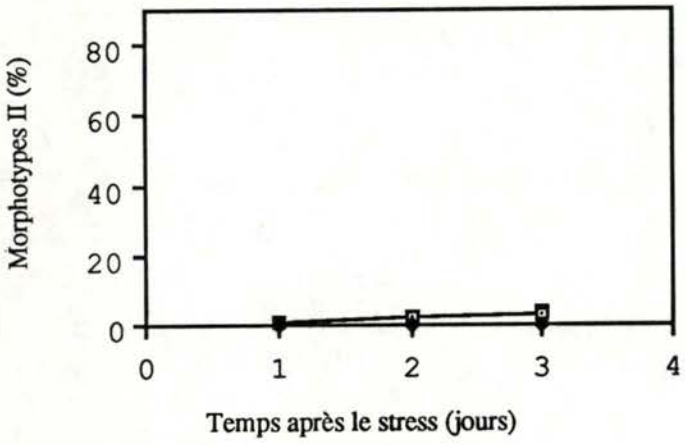


Figure 31

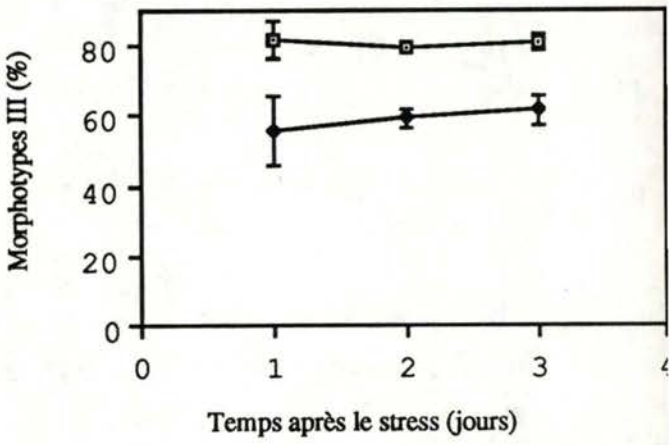


Figure 32

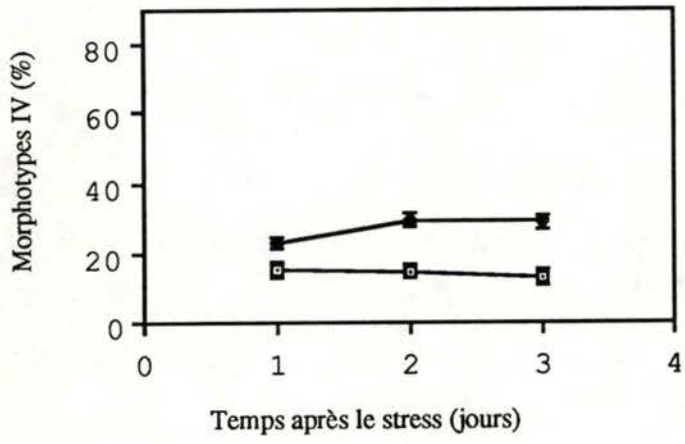


Figure 33

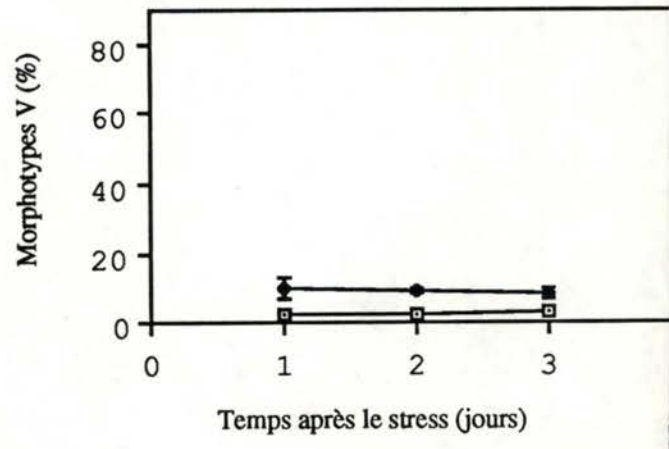


Figure 34

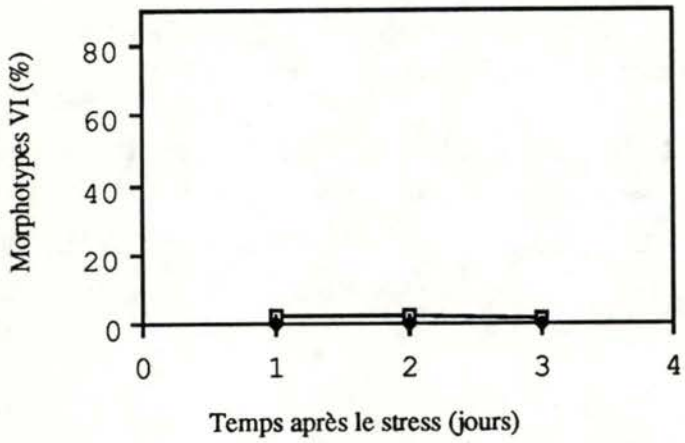


Figure 35

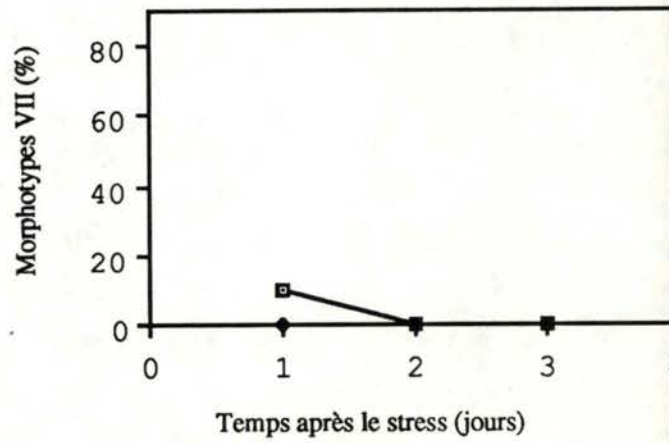


Figure 30 à 35: Effet d'un stress sous aluminium à une concentration de $2x10^{-4}$ M et durant un temps de 6 heures, réalisé sur une subculture à passage 35, sur les types morphologiques II (fig. 30), III (fig. 31), IV (fig. 32), V (fig. 33), VI (fig. 34), et VII (fig. 35). Pour chacune des figures, les résultats sont exprimés en % de types morphologiques en fonction du temps de stress. Carrés ouverts: témoin et, losanges fermés: stress sous aluminium.

2.3.2 / Stress sur des cellules de culture de passage 35

Etant donné que, suite à un stress, les proportions des types morphologiques sont stables après 3 jours, nous avons décidé de ne faire le suivi que durant les 3 premiers jours après le stress (fixation d'une boîte chaque jour).

Si nous examinons les figures 30 à 35, nous pouvons constater:

- les cellules de type I ne sont déjà plus présentes avant le stress car nous avons une culture qui est plus âgée (non représenté).
- que les cellules de type II qui sont encore présentes à près 2% avant le stress disparaissent complètement suite au stress (fig. 30).
- que les cellules de type III passent de 80 % avant le stress à 57 % après le stress (fig. 31).
- que les cellules de type IV passent de 13 % avant le stress à 27 % après le stress (fig. 32).
- que les cellules de type V passent de 3,8 % avant le stress à 9 % après le stress (fig. 33).
- que les cellules de types VI qui ne sont pas présentes avant le stress apparaissent après le stress à raison de plus ou moins 2% (fig. 34).
- comme pour le stress sur cellules de passage 25, les cellules de type VII ne présentent qu'un pic le lendemain du stress (fig. 35).

A nouveau, nous avons des passages de types morphologiques vers d'autres caractéristiques d'une culture plus avancée, mais ces variations ne concernent pas les mêmes types que pour les cultures jeunes. Nous avons représenté les proportions de changements dans le tableau III (page suivante).

On constate donc que les proportions de morphotypes d'une culture de passage 35 semblent plus stables que dans le cas de passage 25 vu qu'il y a un plus faible pourcentage de changements suite à un stress. Cela peut s'expliquer par le fait que la culture est composée à 80,6 % de cellules de type III qui pourraient être assez stables face à un stress de cette nature. Une autre explication pourrait être que, à passage 35, la majorité des cellules sont passées au type III depuis peu de temps et n'ont donc pas encore accumulé suffisamment d'erreurs que pour être proche d'un passage naturel de type IV. Elles passeraient donc moins facilement au type IV

Figure 36

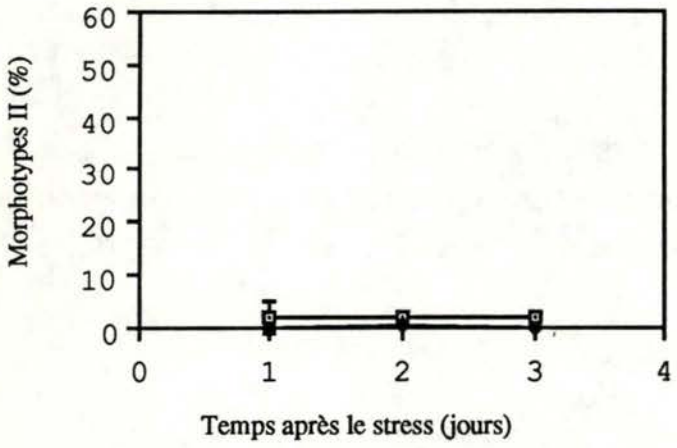


Figure 37

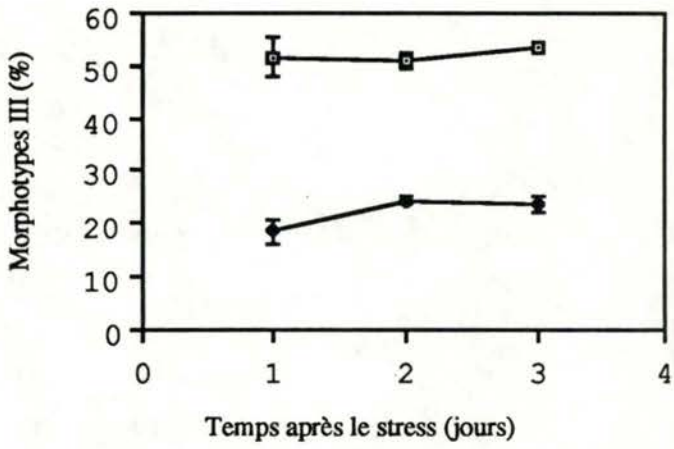


Figure 38

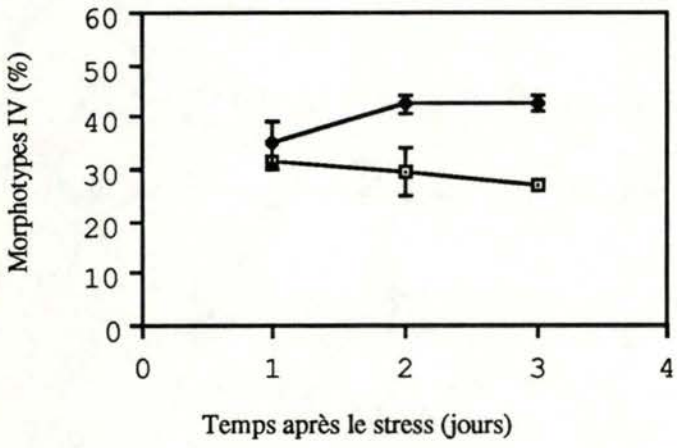


Figure 39

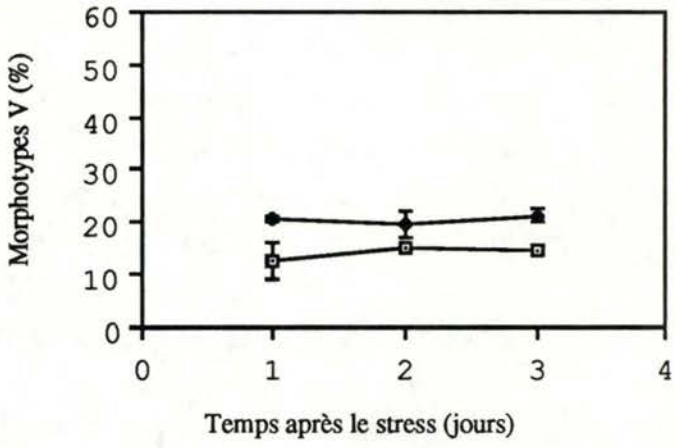


Figure 40

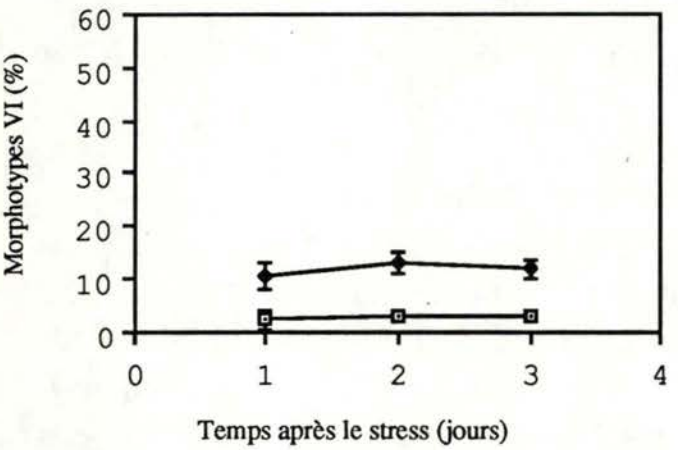


Figure 41

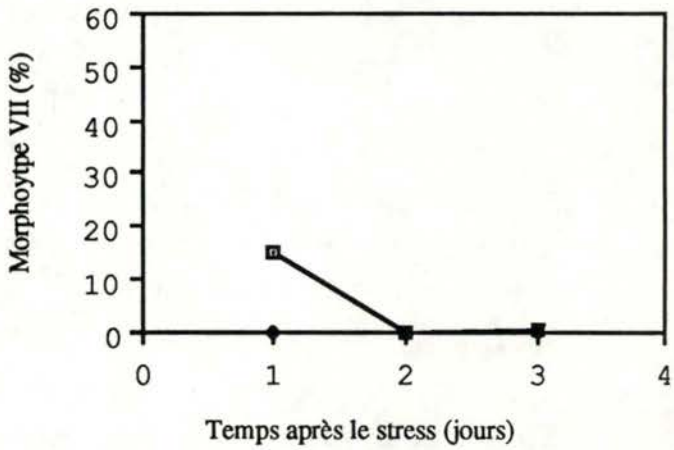


Figure 36 à 41: Effet d'un stress sous aluminium à une concentration de $2x10^{-4}$ M et durant un temps de 6 heures, réalisé sur une subculture à passage 42, sur les types morphologiques II (fig. 36), III (fig. 37), IV (fig. 38), V (fig. 39), VI (fig. 40), et VII (fig. 41). Pour chacune des figures, les résultats sont exprimés en % de types morphologiques en fonction du temps de stress. Carrés ouverts: témoin et, losanges fermés: stress sous aluminium.

suite à un stress que dans le cas de cellules d'une culture plus avancée. Les résultats obtenus suite à un stress sur des cellules plus âgées provenant d'une culture de passage 42 vont dans le sens de cette hypothèse (voir ci-dessous).

Tableau III: Proportion de chaque type morphologique avant et après le stress et pourcentage de modifications de chaque type.

Type	% avant	% après	% de modifications
I	0	0	0
II	2,0±1,7	0	-2,0±1,7
III	80,6±1,4	58,8±3,2	-21,9±3,2
IV	14,2±1,1	27,0±3,5	+12,7±3,5
V	2,6±0,4	9,2±0,8	+6,5±0,8
VI	0	1,9±0,3	+1,9±0,3
VII	0	0	0
			Modification totale: 45±1,9 (valeurs absolues)

2.3.3 / Stress sur des cellules de culture de passage 42

Nous avons donc également effectué le même stress sur les cellules provenant d'une culture de passage 42 afin de voir si celles-ci étaient plus sensibles que dans les deux cas précédents.

Si nous examinons les figures 36 à 41, nous pouvons constater :

- qu'aucune cellule de type I n'est plus encore présente dans cette culture âgée (non représenté).
- que la proportion de cellules de type II présentes en très petite quantité (plus ou moins 1,9 %) disparaissent pratiquement suite au stress (fig. 36).

- que la proportion de cellules de type III qui représentent près de 52 % avant le stress passe à près de 20 % après le stress (fig. 37).
- que la proportion de cellules de type IV passe de 29% avant le stress à 40 % (fig. 38).
- que la proportion de cellules de type V passe de 14 % avant le stress à 20 % après le stress (fig. 39).
- que la proportion de cellules de type VI passe de 2,7% à 11,8 % (fig. 40).
- et que la proportion de cellules de type VII ne présente à nouveau qu'un grand pic que le lendemain du stress et devient pratiquement nulle les autres jours suivant le stress (fig. 41).

Nous avons donc encore une fois un passage par différents types morphologiques qui se manifeste suite à un stress et pour voir à nouveau les proportions de changements, nous pouvons nous rapporter au tableau récapitulatif (tableau IV).

Tableau IV: proportions de chacun des types morphologiques avant et après le stress, et pourcentage de changements pour chaque type.

Types	% avant	% après	% de modifications
I	0	0	0
II	1,9±0,2	0,1±0,2	-1,8±0,2
III	51,9±1,4	21,1±3,7	-30,8±3,7
IV	29,3±2,9	40,2±4,3	-10,3±4,3
V	14,2±1,3	20,4±0,9	+6,3±1,3
VI	2,7±0,3	11,8±1,3	+9,1±1,3
VII	0	9,5±5,5	+9,5±5,5
			Modification totale: 68,5±2,7 (valeurs absolues)

Comme nous en avons fait l'hypothèse plus haut, les cellules venant de culture de passage plus avancé seraient donc plus sensibles à un stress en

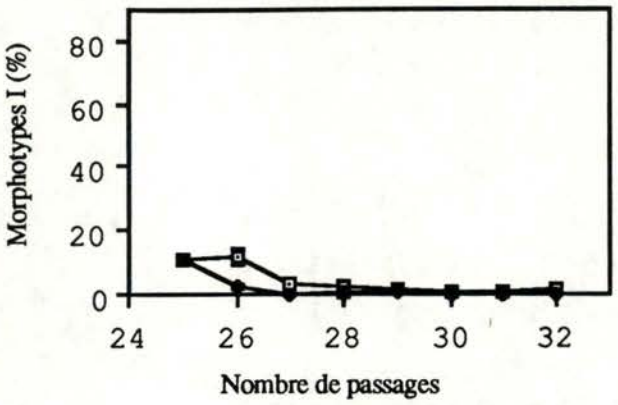


Figure 42

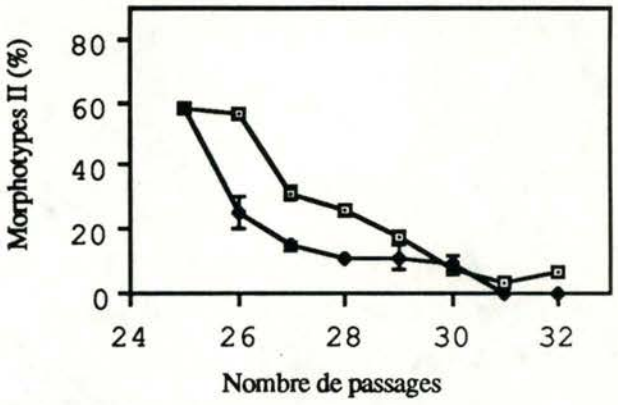


Figure 43

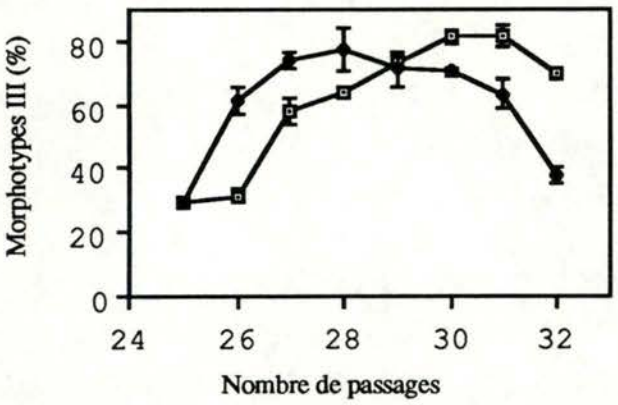


Figure 44

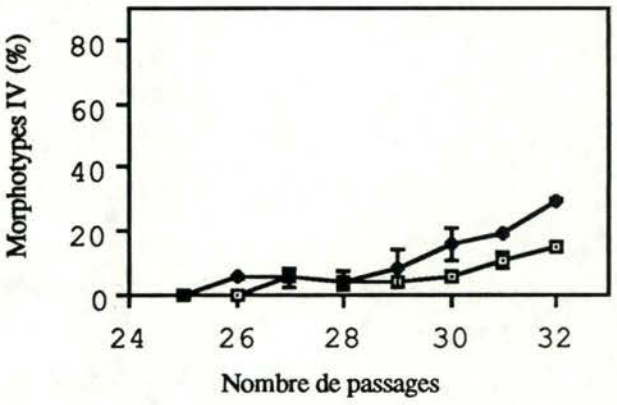


Figure 45

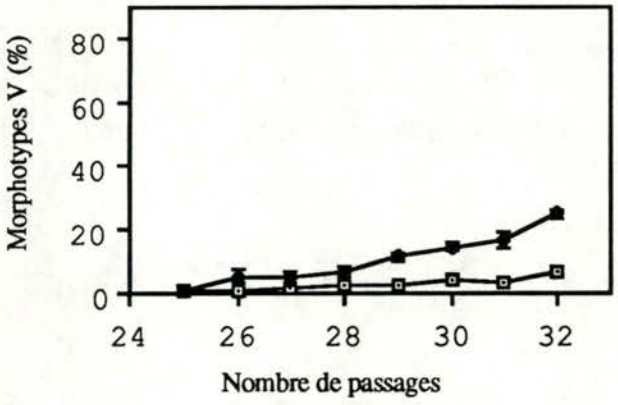


Figure 46

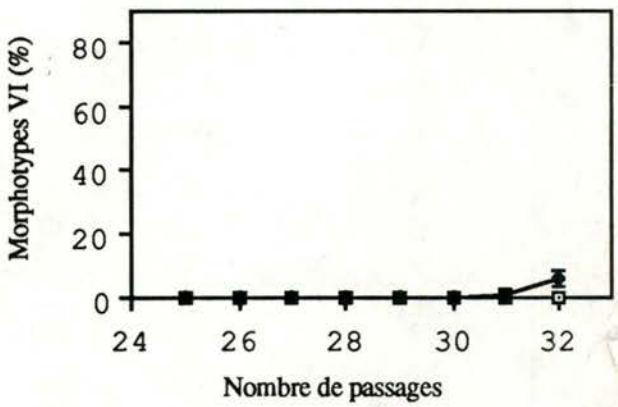


Figure 47

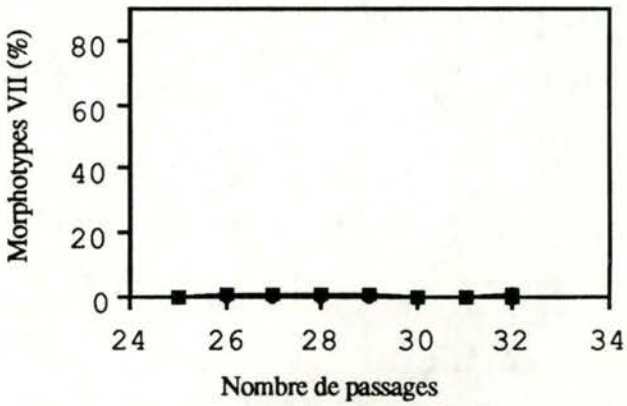


Figure 48

Figure 42 à 48: Effet des stress successifs sous aluminium à une concentration de 10-4 M et durant un temps de 6 heures, ces stress ont été effectués au cours des subcultures successives sur les types morphologiques I (fig. 42), II (fig. 43), III (fig. 44), IV (fig. 45), V (fig 46), VI (fig. 47) et VII (fig. 48). Carrés ouverts: témoin Puck et, losanges fermés: stress sous aluminium (n=4).

ce qui concerne le pourcentage total de variations dans les types morphologiques que dans le cas de cellules d'une culture moins avancée mais contenant cependant une grande proportion de cellules de type III.

2.4 / Effet des stress successifs

Après ce premier travail quantitatif montrant que les stress avaient bien un effet sur le passage des cellules d'un type à l'autre, nous voulions examiner des questions plus précises. En fonction du modèle, nous voulions vérifier si des stress plus faibles mais répétés avaient bien un effet sur les passages par les différents types morphologiques. Pour réaliser des stress multiples, nous avons tout d'abord attendu que les cellules récupèrent après le premier stress. Ensuite, nous les avons repiquées en deux en prenant soin de prélever une faible partie des cellules pour pouvoir déterminer l'évolution des proportions des types morphologiques après ce premier stress (voir matériels et méthodes). Pour les stress ultérieurs, nous avons suivi la même procédure en les effectuant chaque fois sur des subcultures à confluence provenant du repiquage effectué après le stress précédent.

Nous avons choisi d'effectuer des stress successifs à une concentration en aluminium plus faible que pour les expérience réalisées en incubant les cellules 6 heures en présence de nitrate d'aluminium 10^{-4} M. Les figures 42 à 48 présentent l'évolution des proportions de chaque type au cours des stress multiples en fonction des passages. Chaque point représente la moyenne de deux comptages effectués chacun sur un quadrillage de 1 cm^2 à une densité cellulaire moyenne de 7 cellules par mm^2. Pour interpréter les graphes, il faut comparer les courbes obtenues à partir de cellules stressées à celles obtenues à partir de cellules du témoin. Le premier stress a été effectué sur des cellules d'une culture de passage 25.

On constate une diminution de la proportion de cellules de type I après le premier stress (figure 42), cette diminution se poursuit après les stress suivants jusqu'à ce que les cellules de type I disparaissent complètement au 3 ème stress.

La figure 43 présente l'évolution de la proportion de cellules de type II en fonction des générations pour des cellules stressées ou non. Nous pouvons observer que la proportion des cellules de type II connait également une chute relativement brutale après le premier stress et diminue ensuite progressivement au cours des stress suivants jusqu'à leur disparition complète après 6 stress.

La figure 44 montre l'évolution de la proportion de cellules de type III en fonction des passages pour des cellules stressées ou non. Dès le premier stress, cette proportion augmente d'environ 30%; cette forte augmentation proviendrait de la brusque diminution des cellules de type II qui passeraient ainsi au stade III suite à l'accumulation d'erreurs survenant après le stress. On observe ensuite une augmentation régulière des cellules de type III pour atteindre un maximun après le 3 ^{ème} stress alors que les cellules non stressées présentent un maximun de proportion en cellules de type III au niveau des passages 30 et 31, ce qui correspond aux passages auxquels sont effectués les stress 5 et 6.

La figure 45 reprend l'évolution de la proportion de cellules de type IV en fonction des passages pour des cellules stressées ou non. On ne constate pas beaucoup de différences entre les courbes de cellules stressées ou non, excepté une accumulation plus rapide au cours des dernières.générations

La figure 46 reprend l'évolution de la proportion des cellules de type V en fonction des passages. Dans ce cas, nous pouvons constater une augmentation plus marquées dans le cas des cellules stressées pour atteindre une proportion quatre fois supérieure pour les cellules stressées par rapport aux non stressées.

Les figures 47 et 48, qui représentent respectivement les proportions des cellules de type VI et de type VII en fonction des passages ne montrent pas de modifications si ce n'est une faible augmentation pour les cellules de type VI après le septième stress.

L'expérience a dû être arrêtée pour des raisons techniques mais manifestement, les cultures sous stress tendaient vers des cellules post-mitotiques (cfr. fig.45 et 46).

3 /Hypothèse énergétique

Nous avons fait, au début de ce travail, l'hypothèse qu'un stress intense quelle que soit sa nature a pour effet de faire évoluer les cellules de types jeunes vers des types morphologiques caractéristiques d'une culture plus avancée. Les données expérimentales que nous venons de présenter confortent cette hypothèse.

Dans la suite du travail, nous avons voulu tester des facteurs qui pourraient jouer un rôle dans cette évolution. Nous avons principalement testé l'effet du facteur énergétique sur le vieillissement des cellules en culture en présence d'un agent stressant. On sait en effet que la cellule a besoin d'énergie pour résister efficacement aux stress (induction de la synthèse de molécules, destruction des molécules altérées, ...) et survivre. Nous voulions savoir si la dépendance énergétique existait aussi en ce qui concerne le passage prématuré des cellules de types jeunes vers des cellules de types âgés.

Pour rappel, les fibroblastes en culture possèdent trois voies métaboliques qui leur fournissent de l'énergie à partir de l'extérieur de la cellule: la glycolyse, la glutaminolyse et la respiration mitochondriale. Nous avons donc trois voies métaboliques différentes sur lesquelles nous pouvons agir en utilisant par exemple un inhibiteur de l'une des voies afin de voir si cela aurait un effet sur l'évolution des cellules en présence ou en absence d'un stress sous aluminium.

3.1 / Effet du découplage partiel des phosphorylations oxydatives de la respiration

Il nous paraît en effet intéressant d'examiner l'effet de la présence dans le milieu d'un découplant des phosphorylations oxydatives de la respiration, que nous appellerons découplant mitochondrial dans la suite du texte, en plus de l'aluminium. Cela pourrait provoquer une mortalité supérieure à celle observée dans le cas d'un stress en présence d'aluminium seul ainsi qu'une proportion plus importante de passages à des types

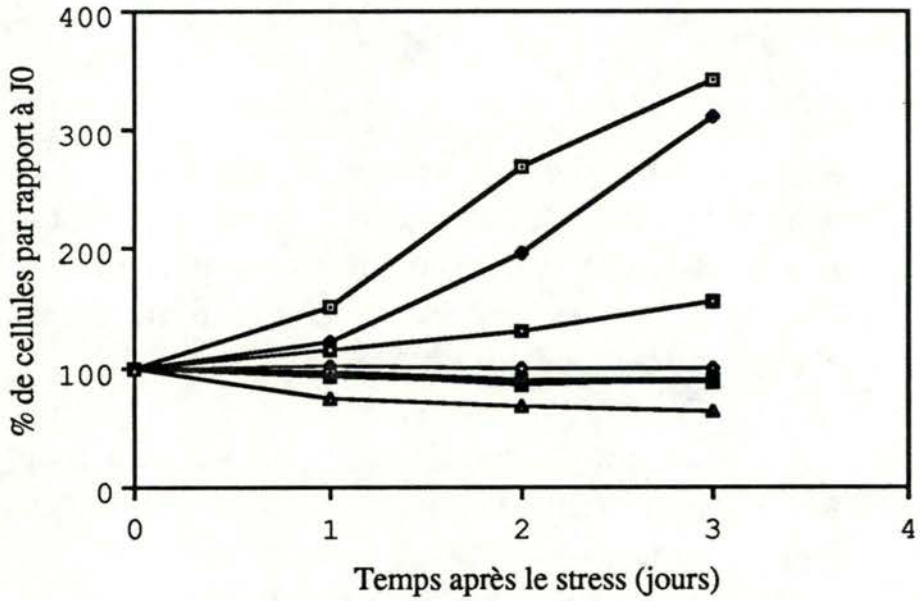


Figure 49: Effet du mCCCP en fonction du temps en jours. Carrés ouverts pointés noirs: témoin sans mCCCP, losanges fermés: 5µM mCCCP, carrés fermés: 10µM µCCCP, losanges ouverts: 20µM mCCCP, carrés ouverts: 25 µM mCCCP, triangles fermés: 30 µM mCCCP, et triangles ouverts: 40 µM mCCCP. Les résultats sont obtenus en comptant le nombre total de cellules et exprimés en % de cellules par rapport au jour 0 avant l'ajout de l'agent découplant, celui-ci restant en contact des cellules tout au long de l'expérience (n=4).

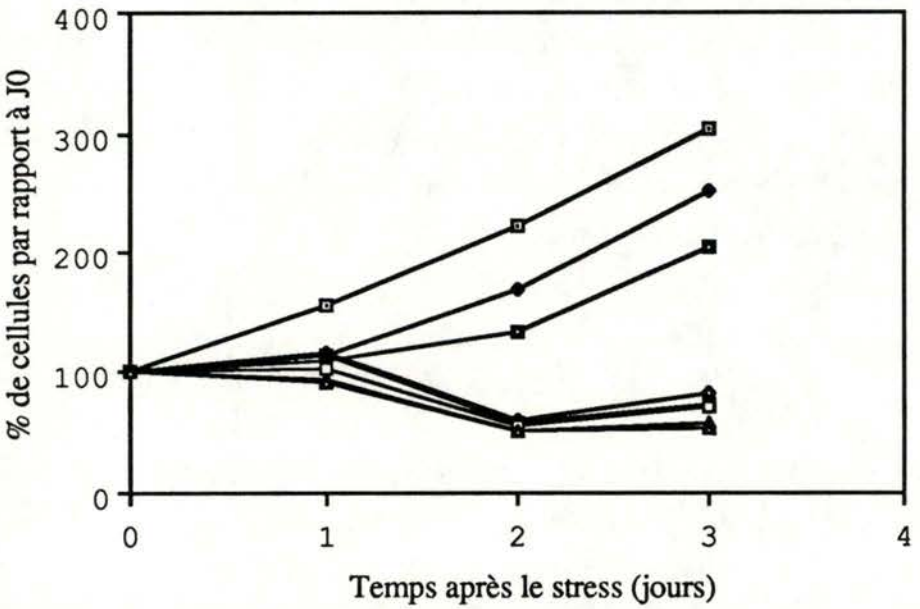


Figure 50: Effet du mCCCP en fonction du temps en jours. Carrés ouverts pointés noirs: témoin sans stress, losanges fermés: 5µM mCCCP, carrés fermés: 10µM µCCCP, losanges ouverts: 20µM mCCCP, carrés ouverts: 25 µM mCCCP, triangles fermés: 30 µM mCCCP, et triangles ouverts: 40 µM mCCCP. Les résultats sont obtenus en dosant les protéines cellulaires à partir du jour 0 et les jours qui suivent, et exprimés en % de cellules par rapport au jour 0 avant l'ajout du découplant, celui-ci restant en contact avec les cellules tout au long de l'expérience (n=4).

morphologiques plus âgés. Dans cette optique, nous aurions alors un argument en faveur de l'importance de l'effet du niveau énergétique sur le vieillisement des cellules suite à un stress sous aluminium.

3.1.1 / Effet du mCCCP sur la croissance des fibroblastes en culture

Le carbonyl cyanide m-chlorophényl hydrazone (mCCCP, Sigma, Etats-Unis) est un découplant puissant des mitochondries. Des fibroblastes WI-38 ont été cultivés en présence de concentrations croissantes en mCCCP et la croissance des cellules a été suivie au cours du temps en comptage de cellules et en dosage de protéines. L'expérience avait aussi pour but de pouvoir déterminer une concentration en mCCCP qui pourraît être utilisée en même temps qu'un stress à l'aluminium.

En examinant les figures 49 (comptage de cellules) et 50 (dosage de protéines), nous pouvons constater en effet une mortalité progressive des fibroblastes en fonction de la concentration en mCCCP (5 à 40µM) dans le milieu de culture. Cet effet se manifeste principalement pour des concentrations en mCCCP supérieures à 10 µM avec une toxicité très importante (près de 45% par rapport au jour 0) au jour 3 à une concentration de 40 µM.

Nous avons donc bien un effet important du découplage des mitochondries sur la survie des cellules. Pour la suite, nous avons décidé de travailler à une concentration en mCCCP de 10 µM afin que le mCCCP seul n'ait qu'un faible effet sur le taux de mitose, comme observé à la figure 49. Vu que nos travaux concernant la toxicité de l'aluminium avait été réalisés en dosant les protéines cellulaires, nous avons préféré continuer avec cette méthode.

3.1.2 / Etude de toxicité d'un stress d'aluminium couplé à la présence de mCCCP dans le milieu

Nous avons effectué un stress en présence de mCCCP 10 µM et de concentrations en aluminium de 10^{-5} M, 10^{-4} M, et $2x10^{-4}$ M (soit deux concentrations en aluminium toxiques (10-4 M et 2x10-4 M) et une non-

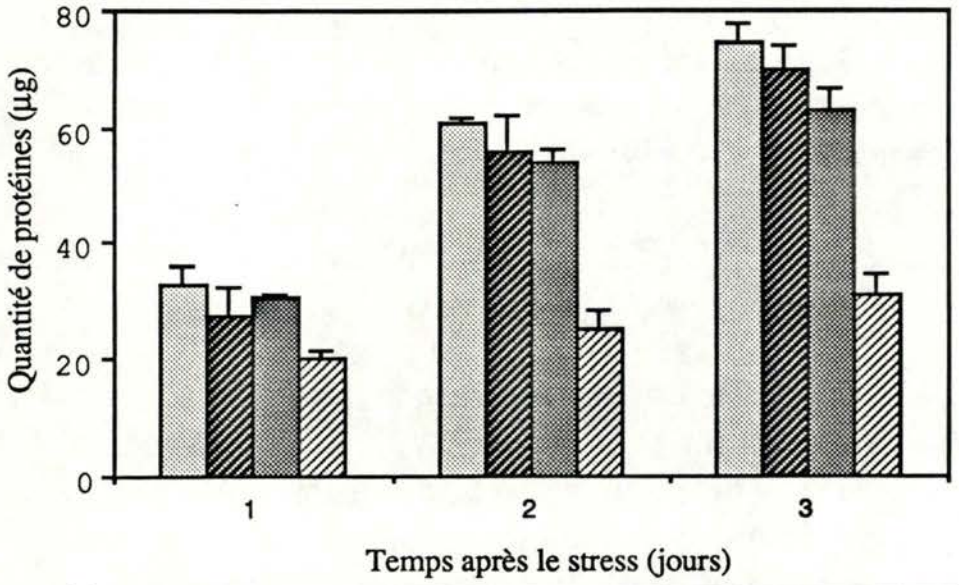


Figure 51

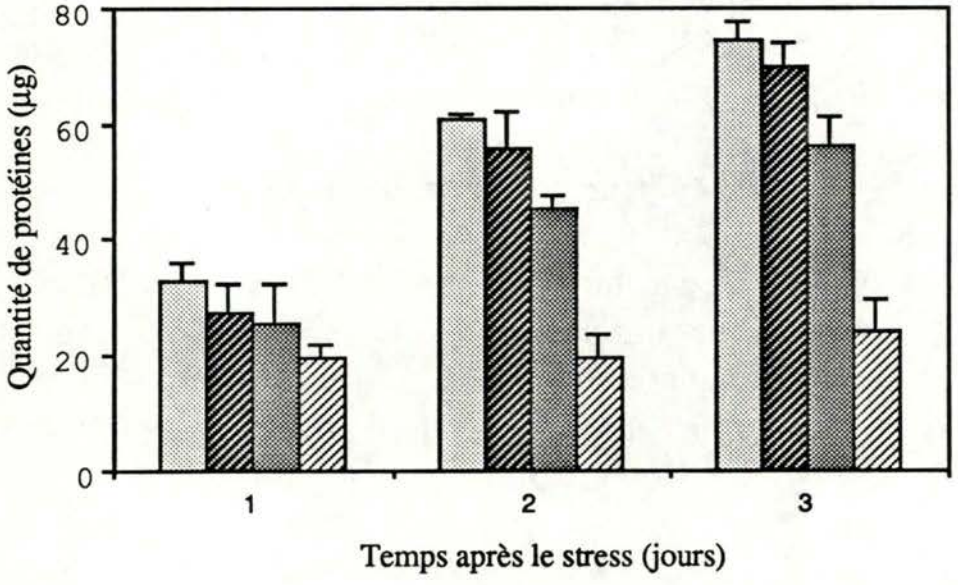


Figure 52

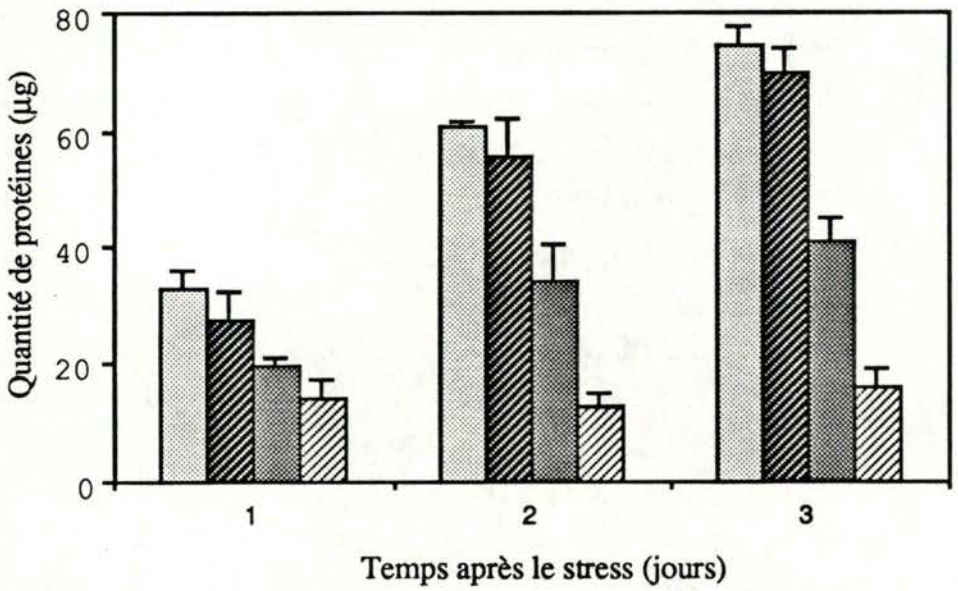


Figure 53

Figure 51 à 53: Quantité de protéines en fonction du temps après une incubation de 6 heures dans du Puck seul (pointillés clairs), du Puck+mCCCP 10 µM (hachurés foncés), du Puck+Al^{3+} (pointillés foncés) et du puck+Al^{3+}+mCCCP 10 µM (hachurés clairs). Les concentrations en aluminium utilisées sont de 10^{-5} M (fig. 51), 10^{-4} M (fig. 52), et de $2x10^{-4}$ M (fig. 53) (n=4).

toxique). Une fois le stress terminé, les cellules restent en présence de mCCCP dans le milieu de culture pendant les jours suivant le stress. Trois témoins sont également réalisés: tampon Puck, mCCCP seul, et aluminium seul. Les figures 51 à 53 montrent les différences observées pour chaque concentration d'aluminium (respectivement 10^{-5} M, 10^{-4} M et 2x 10^{-4} M), les résultats sont à comparer au valeurs du témoin tampon Puck qui n'a subi aucun stress.

Le tableau V reprend les pourcentages de protéines cellulaires au troisième jour dans chacun des cas. Les résultats sont exprimés en pourcentage de protéines exprimé par rapport au témoin Puck.

Tableau V: Comparaison des toxicités de l'aluminium seul ou en présence de mCCCP. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin Puck.

Conc.Al	Al seul (1)	mCCCP seul (2)		cumul (1)+(2)	mCCCP+Al (3)	Différence (3)-(1)-(2)
10^{-5} M	11,5 %	+ 6 %	=	17,2 %	58,2 %	41 %
10^{-4} M	24,6 %	+ 6 %	=	30,6 %	67,5 %	36,9 %
2x10^{-4} M	44,7 %	+ 6 %	=	50,7 %	78,7 %	28 %

L'effet sur le taux de mitose obtenu en comparant les valeurs obtenues au jour 3 (tableau V) ou 2 (non représenté) lorsque l'on cumule les deux types de stress (aluminium + découplage mitochondrial) est supérieur à la somme des effets des deux stress pris séparément. En effet, dans le cas du stress aluminium plus mCCCP, cet effet synergique est de 41% pour une concentration de 10^{-5} M, de 36,9 % pour une concentration en aluminium de 10^{-4} M et de 28 % pour une concentration en aluminium de 2x10^{-4} M. Nous pouvons donc remarquer que plus la concentration en aluminium est importante, moins la synergie se marque. Cela peut expliquer par le fait que l'effet de l'aluminium devient si importante que l'effet dû à la cumulation des deux stress est beaucoup moins observable.

Pour comparer des effets de mortalité cellulaire, il faut comparer les valeurs obtenues pour les cellules ayant été en contact de Puck + mCCCP, Puck + Al^{3+} et Puck+mCCCP+Al^{3+} pendant 6 heures à celles obtenues pour les cellules ayant été en contact de Puck seul également pendant 6 heures. Cependant, seules les comparaisons effectuées au jour 1 sont valables si l'on se limite au phénomène de mortalité. En effet, aux jours suivants, on risque de mesurer plutôt un effet sur la croissance vu la croissance des témoins et l'absence de croissance des tests. On n'a pas ce problème au jour 1 vu qu'après 6 heures en contact de Puck et Puck+mCCCP, les témoins ont leur mitose inhibée pour au moins 24 heures (voir figure 16 pour témoin Puck 6 heures)

3.1.3 / Effet des stress sous aluminium sur le vieillissement des cellules en présence de mCCCP

Nous avons déterminé l'effet du découplage mitochondrial sur le passage des types morphologiques en présence de nitrate d'aluminium à une concentration de $2x10^{-4}$ M et durant un temps de 6 heures. Nous avons effectué ce test sur des cellules d'une culture de cellules de passage 28.

Le tableau VI reprend les valeurs des proportions des types morphologiques suite aux différents stress.

Type	Tampon Puck	mCCCP	Al	Al+mCCCP
I	5,6±1,2	4,3±1,6	0	0
II	45,6±2,3	41,1±0,2	10,9±0,5	0
III	47,0±1,9	50,4±2,4	73,1±2,5	64,8±2,6
IV	3,1±0,4	3,0±0,5	11,3±0,1	22,5±1,1
V	0,9±0,4	1,1±0,3	4,7±0,8	9,8±0,7
VI	0	0	0	1,7±0,5
VII	0	0	0	1,1±0,4

A partir de ce tableau, nous pouvons constater un passage vers des types plus âgés dans le cas du stress en présence d'aluminium et peu de changements dus au mCCCP seul. Afin de voir si le pourcentage de

changements de types morphologiques est supérieur à la somme des changements de types morphologiques suite au stress mCCCP seul et aluminium seul, nous avons calculé les différences de pourcentage de types morphologiques entre les différents types de stress et le témoin Puck (tableau VII).

Tableau VII: Changements des pourcentages des différents types cellulaires en fonction du stress obtenus en retirant les valeurs obtenues pour le Puck seul (calculés à partir du tableau VI).

Type	mCCCP (1)	Al (2)	somme (1)+(2)	Al+mCCCP (3)	Différence (1)+(2)-(3)
I	-1,3 %	-5,6 %	-6,8 %	-5,6 %	-1,2 %
II	-4,5 %	-34,7 %	-39,3 %	-45,6 %	6,3 %
III	3,4 %	26,1 %	29,5 %	17,8 %	11,7 %
IV	0,1 %	8,2 %	8,3 %	19,4 %	-11,1 %
V	-0,2 %	3,7 %	4,7 %	8,8 %	-4,1 %
VI	0	0	0	1,7 %	-1,7 %
VII	0	0	0	1,1 %	-1,0 %
Modifications totales: (valeurs absolues)			88,5%	100,02 %	

Globalement, nous avons donc non seulement plus de changements de types morphologiques dans le cas du stress aluminium et mCCCP que pour la somme des changements du stress aluminium seul et mCCCP seul, mais aussi une diminution plus importante des pourcentages de types morphologiques jeunes (I, II et III) en faveur d'une augmentation plus importante des pourcentages de types morphologiques plus âgés (IV à VII). Il et intéressant par exemple de remarquer que le pourcentage de cellules de type III augmente bien après le stress Aluminium + mCCCP mais moins fortement que lors du stress aluminium seul puisque l'on a une apparition plus importante de cellules de type IV.

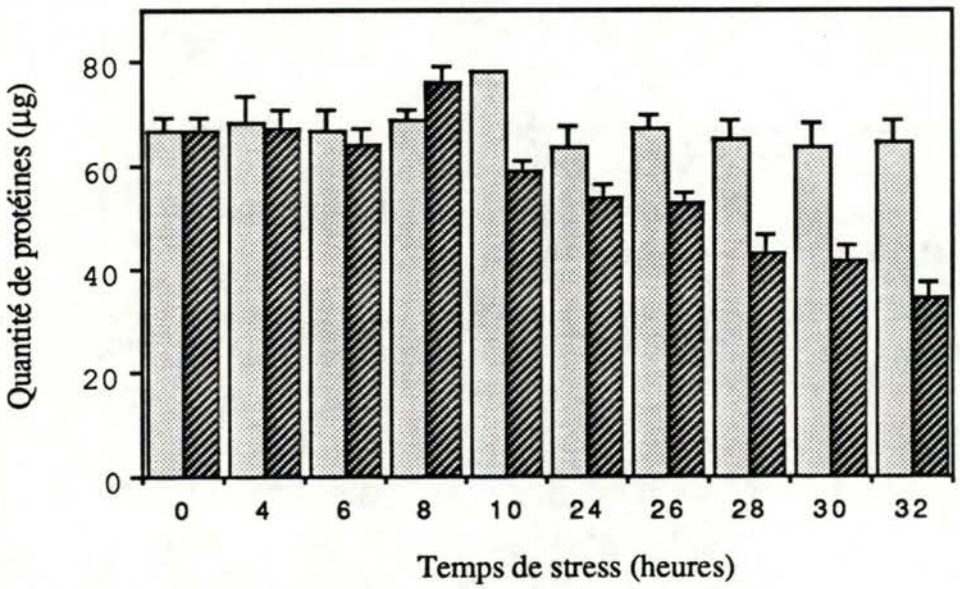


Figure 54: Toxicité d'un stress sous aluminium dans du Puck+. Les résultats sont exprimés en quantité de protéines (µg) en fonction du temps de stress. Pointillés: témoin Puck amélioré et, hachurés: stress sous aluminium $2x10^{-4}$ M. (n=4)

De ces résultats, on peut tirer que, dans le cas du stress aluminium et mCCCP, les cellules évoluent plus vers des stades plus âgés par rapport à la somme de l'effet des deux stress cumulés.

En conclusion, nous montrons donc que la diminution du potentiel énergétique de la cellule a bien pour effet une augmentation de la mortalité cellulaire et une résistance amoindrie au passage vers des stades plus âgés face à un stress sous aluminium.

Il existe d'autres moyens de tester l'hypothèse énergétique que nous avons explicitée plus haut. Nous pouvons en effet jouer sur d'autres paramètres.

3.2 / Effet d'un apport nutritif sur la toxicité et le vieillissement des cellules stressées

A côté de la diminution du potentiel énergétique de la cellule par un découplage mitochondrial, on peut agir en variant l'apport nutritif aux cellules. Rappelons aussi qu'il a été montré que l'ion aluminium peut se fixer beaucoup plus fortement sur l'ATP que l'ion magnésium. C'est ainsi que nous avons effectué des tests en améliorant le milieu de culture. Dans la solution saline Puck, nous avons ajouté les acides aminés non-essentiels (Eurobio, France), les acides aminés essentiels (Eurobio, France), des vitamines (Eurobio, France) et du glucose (Merck, Allemagne fédérale), et donc tous les constituants d'un milieu de culture classique BME et aux mêmes concentrations, à l'exception des sels susceptibles de faire précipiter l'aluminium.

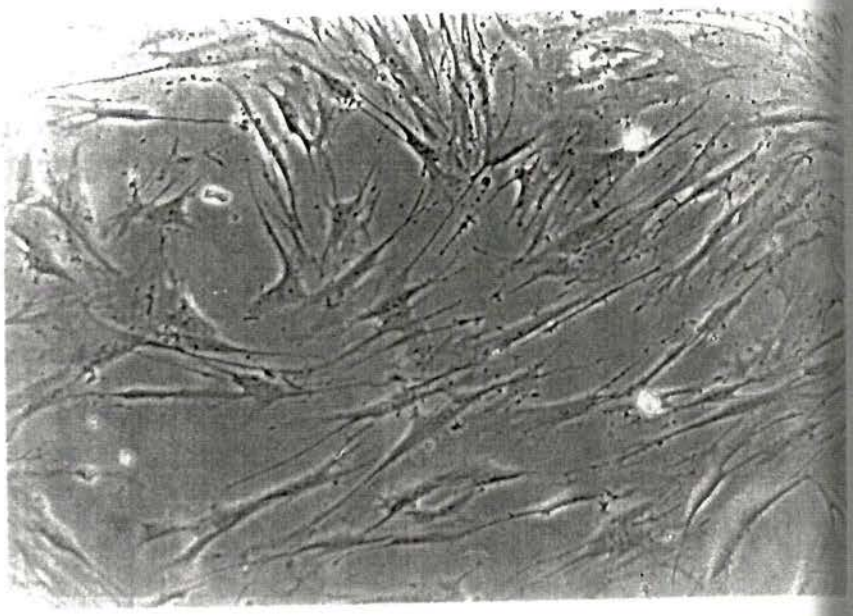
3.2.1 / Toxicité de l'aluminium dans un milieu plus riche

Nous avons commencé par refaire une étude de la toxicité de l'aluminium en fonction de la durée de stress, mais cette fois en mettant l'aluminium en solution dans ce nouveau milieu plus riche. Vu que nous pensions que les cellules resisteraient mieux au stress, nous avons pris des temps de stress s'étalant entre 2 heures et 32 heures.

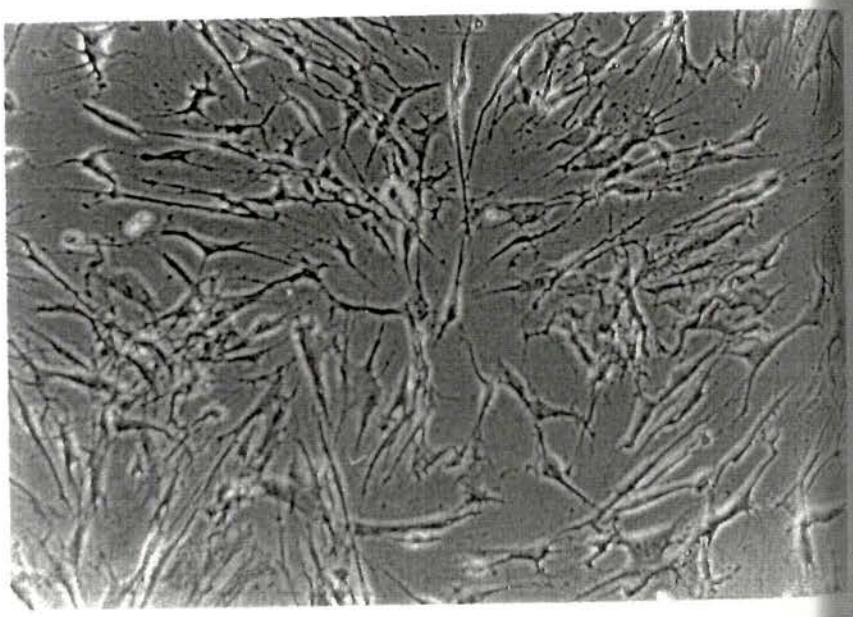
En examinant la figure 54, nous pouvons tirer deux conclusions:

Figure 55: Etat des cellules après 24 heures dans le BME+S (A), le Puck+ (B), et le Puck (C).

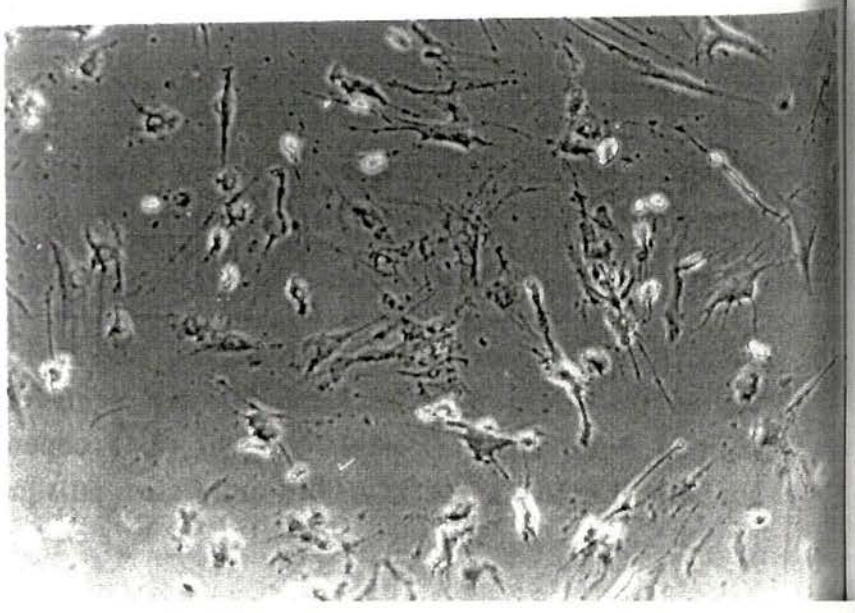
A/ BME+S



B/ Puck+



C/ Puck



- 1°/ Alors que l'on observait une toxicité proche de 15 % après 10 heures de stress dans le tampon Puck seul, on n'en observe plus dans le tampon Puck amélioré seul. Mais il reste cependant la possibilité d'un effet sur l'inhibition de la division cellulaire puisque le dosage est effectué 24 heures après le stress. Les photos de la figure 55 montrent également que les cellules survivent nettement mieux dans un tampon Puck amélioré que dans le tampon Puck. Il est a noté que dans le Puck+, les cellules sont en mauvais état énergétique (ce qui expliquerait l'inhibition de mitose) mais que le lendemain, elles ont récupéré le même état que les cellules dans le BME+S.

- 2°/ Un stress sous aluminium dans ce milieu plus riche doit durer beaucoup plus longtemps que dans le cas d'un stress dans le Puck pour atteindre une toxicité équivalente. En effet, pour atteindre une toxicité équivalente à un stress d'aluminium de 6 heures dans du Puck (figure 12), c'est-à-dire une toxicité de plus ou moins 20 %, il faut une durée de stress de 26 à 28 heures dans le milieu amélioré.

3.2.2 / Etude de l'effet sur le vieillissement

Nous avons également effectué une étude sur le passage d'un type à un autre suite au stress de 24 heures dans le tampon Puck amélioré (noté Puck+).

En examinant les figures 56 à 61, nous pouvons constater: - que les cellules de type I ne sont plus présentes dans la culture vu que nous sommes en présence d'une culture de passage 33 (non représenté).

- que la proportion des cellules de type II présentes à plus ou moins 3 % disparait complètement suite au stress (fig. 56).

- que la proportion des cellules de type III présentes à 67 % avant le stress passe à 58 % après le stress (fig. 57).

- que la proportion des cellules de type IV passe de 14,5 % avant le stress à 23 % (fig. 58).

- que la proportion des cellules de type V passe de plus ou moins 11 % avant le stress à plus ou moins 16 % après (fig. 59).

- que les cellules de type VI qui ne sont pas présentes avant le stress, apparaissent à raison de plus ou moins 3% (fig. 60).

Figure 56

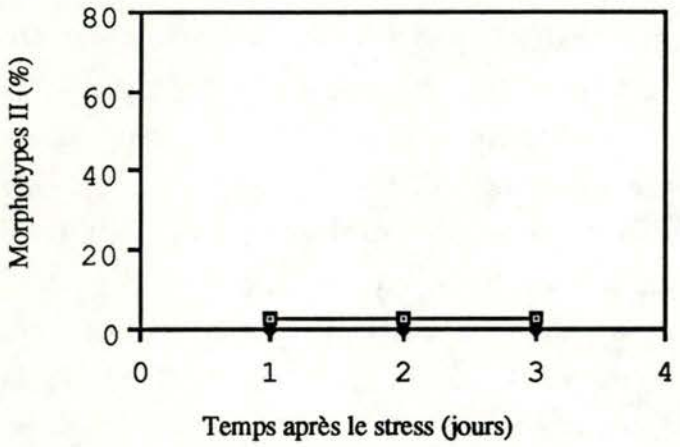


Figure 57

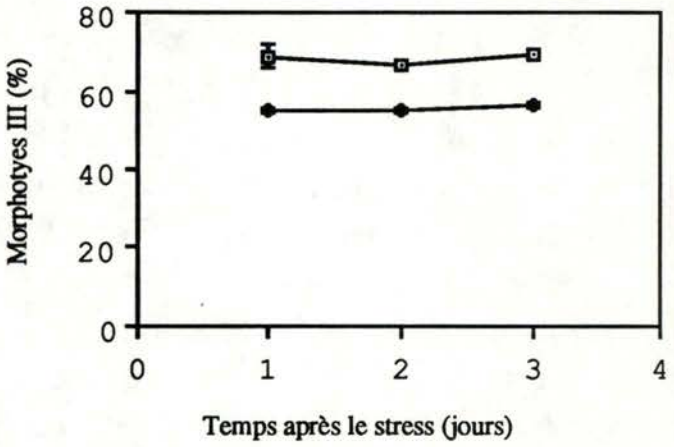


Figure 58

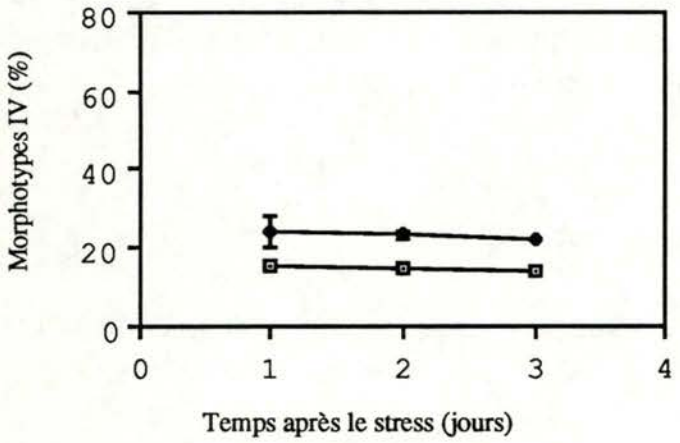


Figure 59

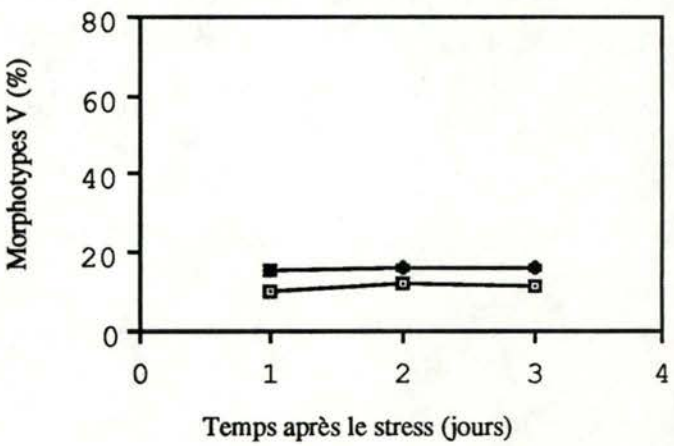


Figure 60

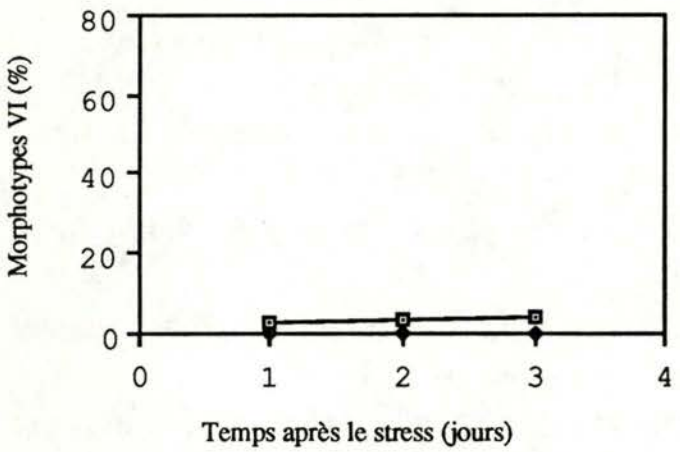


Figure 61

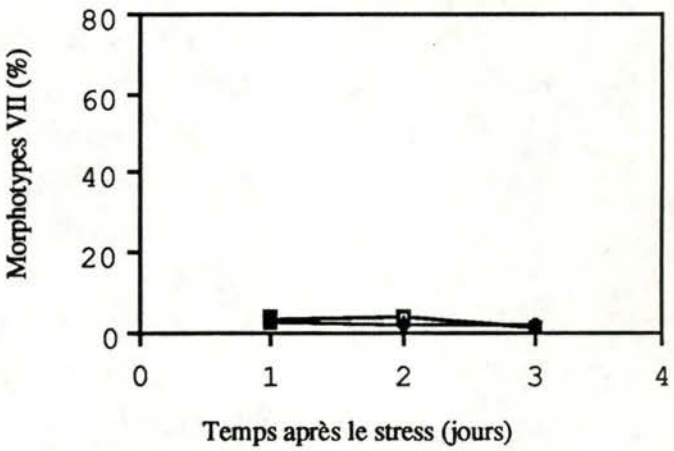


Figure 56 à 61: Effet du stress sous aluminium (réalisé sur des cellules à passage 33 dans du Puck+) à 2x10-4 M pendant 24 heures sur les proportions de types morphologiques II (fig. 55), III (fig. 56), IV (fig. 57), V (fig. 58), VI (fig. 59), et VII (fig. 60). Les résultats sont exprimés en % de type morphologique en fonction du temps après le stress en jours. Carrés ouverts: témoin sans stress et, losanges fermés: après un stress (n=4).

- comme dans les autres études, nous avons un léger accroissement du nombre de cellules de type VII uniquement le lendemain du stress (fig. 61).

Nous pouvons mieux visualiser les proportions de changements qui apparaissent suite au stress en nous référant au tableau VIII.

Tableau VIII: Proportions des modifications concernant chaque type morphologique et quantité totale de changements pour chacun des types suite au stress et calculés à partir des résultats des figures 56 à 61.

Type	% avant	% après	% de modifications en valeur absolue
I	0	0	0
II	2,7±0,4	0	2,7±0,4
III	68,1±1,5	55,4±1,3	12,7±1,5
IV	14,8±0,8	23,3±1,2	8,5±1,2
V	11,2±1,3	15,9±0,9	4,7±1,3
VI	0	0	0
VII	3±1,2	2,2±0,5	0,8±1,2

Modification totale: 29,4±1,1

Nous pouvons constater qu' un stress dans le milieu Puck+ a encore un effet au niveau du passage vers des types morphologiques plus âgés mais que les proportions de changements sont beaucoup moins importantes que dans le cas des stress dans le Puck pour une culture de cette génération (tableau III). En effet, n'oublions pas que ces valeurs ont été relevées après 24 h de stress dans du Puck+ alors que dans ces conditions, toutes les cellules seraient mortes dans le Puck. D'autre part, on peut comparer l'effet sur les proportions des types morphologiques de deux deux stress de durée différente mais ayant une toxicité égale (ici 20 %) l'une réalisée dans du Puck+ et l'autre dans du Puck (tableau III), et ceci pour des cellules

- comme dans les autres études, nous avons un léger accroissement du nombre de cellules de type VII uniquement le lendemain du stress (fig. 61).

Nous pouvons mieux visualiser les proportions de changements qui apparaissent suite au stress en nous référant au tableau VIII.

Tableau VIII: Proportions des modifications concernant chaque type morphologique et quantité totale de changements pour chacun des types suite au stress et calculés à partir des résultats des figures 56 à 61.

Type	% avant	% après	% de modifications en valeur absolue
I	0	0	0
II	2,7±0,4	0	2,7±0,4
III	68,1±1,5	55,4±1,3	12,7±1,5
IV	14,8±0,8	23,3±1,2	8,5±1,2
V	11,2±1,3	15,9±0,9	4,7±1,3
VI	0	0	0
VII	3±1,2	2,2±0,5	0,8±1,2
			Modification totale: 29,4±1,1

Nous pouvons constater qu' un stress dans le milieu Puck+ a encore un effet au niveau du passage vers des types morphologiques plus âgés mais que les proportions de changements sont beaucoup moins importantes que dans le cas des stress dans le Puck pour une culture de cette génération (tableau III). En effet, n'oublions pas que ces valeurs ont été relevées après 24 h de stress dans du Puck+ alors que dans ces conditions, toutes les cellules seraient mortes dans le Puck. D'autre part, on peut comparer l'effet sur les proportions des types morphologiques de deux deux stress de durée différente mais ayant une toxicité égale (ici 20 %) l'une réalisée dans du Puck+ et l'autre dans du Puck (tableau III), et ceci pour des cellules

provenant de culture de passages très rapprochés (ici, passages 33 et 35) (tableau IX).

Tableau IX: comparaison de l'effet du Puck et du Puck+ sur les changements de morphologie des cellules pour des stress donnant 20 % de mortalité obtenue pour le Puck+ après 24 heures de stress en présence de $2x10^{-4}$ M en aluminium et de 6 heures dans le Puck en présence de $2x10^{-4}$ M en aluminium.

Types morphologiques	% de modifications dans le Puck+	% de modifications dans le Puck
I	0	0
II	-2,7±0,4	-2,0±1,7
III	-12,7±1,5	-21,9±3,2
IV	+8,5±1,2	+12,7±3,4
V	+4,7±1,3	+6,5±0,8
VI	0	+1,9±0,3
VII	+0,8±1,2	0
Modifications totales	29,4±1,1	45,0±1,9

On voit sur ce tableau VII que la stabilité des cellules de type III face à un stress beaucoup plus fort mais qui donne la même toxicité entraine un passage plus faible dans le cas du Puck+. De même, l'augmentation des cellules de type IV à V est moins importante dans ces conditions. Ces résultats constituent donc un argument supplémentaire en faveur de notre hypothèse énergétique puisque en présence de Puck+, on a vu que les cellules survivaient mieux que dans le cas d'un stress dans le Puck seul.

3.2.3 / Ciblage de l'effet protecteur du Puck+

Nous avons donc voulu savoir quel était celui des constituants ajouté au Puck (glucose, acides aminés, et vitamines) qui conférait un tel effet protecteur. Il était aussi possible que l'ensemble de ces constituants soit nécessaire.

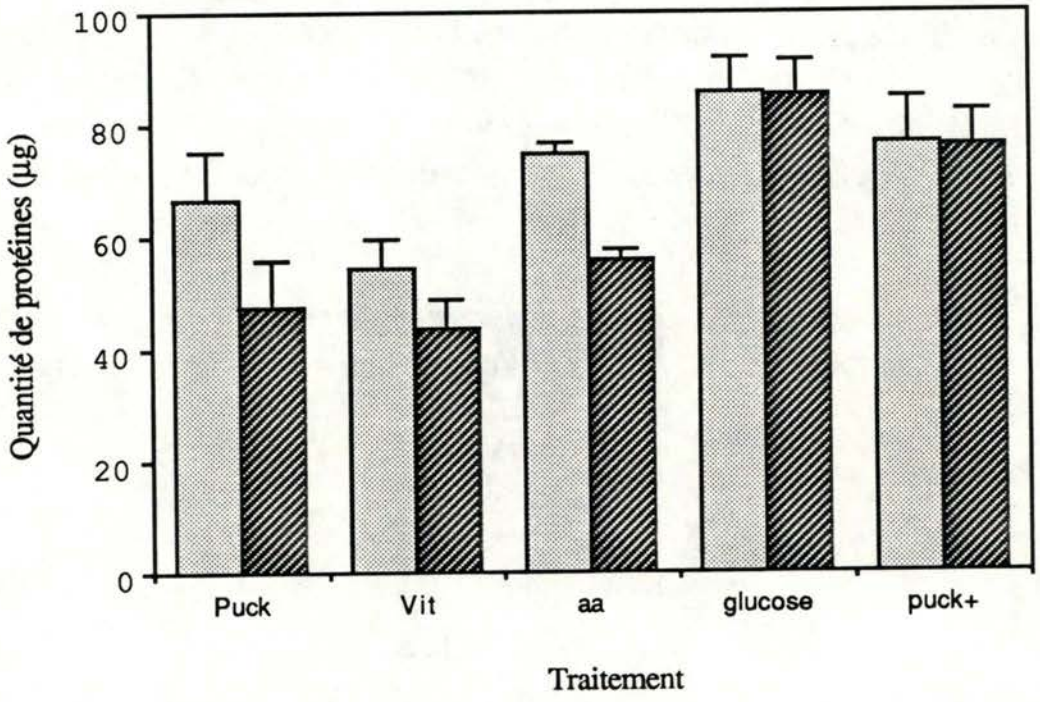


Figure 62: Quantité de protéines en µg en fonction du traitement (Puck, Puck+vitamines, Puck+acides aminés, Puck+glucose et Puck+). pointillés: témoin sans stress et, hachurés: stress sous aluminium $2x10^{-4}$ M de 6 heures (n=4).

Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé un stress de 6 heures en présence ou non d'aluminium pour chacun des cas exprimés à la figure 62 (Puck, Puck + acides aminés, Puck + vitamines, Puck + glucose, et Puck+). Nous pouvons voir en comparant les quantités de protéines à leur témoin correspondant sans stress que c'est le glucose qui apporte la plus grande amélioration au Puck et qui permet donc aux cellules d'avoir une plus grande résistance au stress sous aluminium. L'ajout dans la solution saline d'acides aminés et de vitamines permet également une amélioration de la résistance des cellules au stress mais dans des proportions moindres que pour le Puck+glucose, comme le montre le tableau X.

Tableau X: rapport entre les pourcentages de survie obtenus avec les cellules sous aluminium et celles non stressées.

traitement	rapport
Puck	70,7 %
Puck+vitamines	75,0 %
Puck+aa	80,0 %
Puck+glucose	99,4 %
Puck +	99,6 %

Le glucose semble donc bien être l'élément le plus important mais il apparaît aussi que les trois autres types de molécules confèrent déjà une meilleure résistance au stress sous aluminium.

4/ Essais de protection

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons cherché d'autres facteurs susceptibles de modifier d'une part la toxicité de l'aluminium et d'autre part son effet sur le vieillissement des cellules.

Nous avons donc essayé de trouver des effets protecteurs vis-à-vis du stress sous aluminium. Les molécules que nous avons testées sont les chélateurs EDTA et desferroxamine, les antioxydants glutathion, vitamine

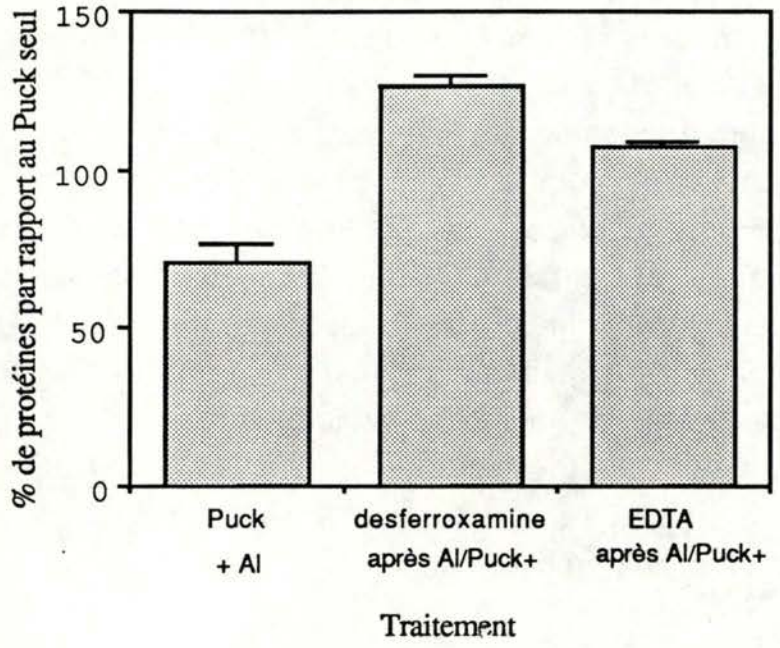


Figure 63: % de protéines par rapport au témoin Puck seul (100%) en fonction du traitement. Dans chacun des cas, les cellules ont été incubées 6 heures en présence d'une concentration en aluminium de 2x10-4 M. Une fois le stress arrêté (Puck+Al^{3+}), les cellules sont restées en contact de BME+S, desferroxamine (10^{-5} M) diluée dans le BME+S et EDTA (10^{-5} M)dilué également dans le BME+S. Le dosage de protéines a été effectué 2 jours après l'arrêt du stress sous aluminium (n=4).

C, et vitamine E, la glutamine, l'albumine, le glucose, l'insuline et le BOBA. Dans le cas des protections suite au stress, en présence d'EDTA et de desferroxamine, nous avons effectué des stress de $2x10^{-4}$ M dans le Puck pendant une durée de 6 heures, tandis que dans tous les autres cas, nous avons effectué les stress dans du puck+ durant 24 heures et à une concentration en aluminium de $2x10^{-4}$ M.

4 1 / Essai de chélation de l'aluminium après le stress

Afin d'aider les cellules à récupérer du stress, nous avons utilisé des chélateurs de métaux, tels l'EDTA et la desferroxamine (cette dernière est proposée pour la thérapeutique chez les patients sous dialyse qui ont développé des pathologies suite à l'accumulation d'aluminium, (Lione, 1985). Nous avons travaillé à une concentration en EDTA (Merck, Allemagne fédérale) et en desferroxamine (Ciba, Belgique) utilisée le plus souvent sur des cultures de cellules: 10^{-5} M (Michiels, 1989), ces molécules étant diluées dans le milieu de culture après un stress sous aluminium de 6 heures à $2x10^{-4}$ M. Les protéines sont dosées 2 jours après le stress.

Lorsque nous utilisons ces complexants à la suite d'un stress à l'aluminium dans le Puck, nous pouvons constater, comme nous le montre la figure 63, que nous obtenons une amélioration de 55,8 % pour l'EDTA et de 36,3 % pour la desferroxamine par rapport aux valeurs obtenues pour un stress sous aluminium dans le Puck sans ajout de chélatant après le stress. Afin de valider les résultats, nous avons effectué un test t de student.

Traitement	Signification des résultats (n=4)
EDTA	SS (P>0,995)
Desferroxamine	SS (P>0,995)

Vu que le test de T de student est hautement significatif, nous pouvons dire que les deux complexants protègent les cellules du stress sous aluminium, probablement en complexant l'aluminium, ce qui permet donc une meilleure récupération de celles-ci.

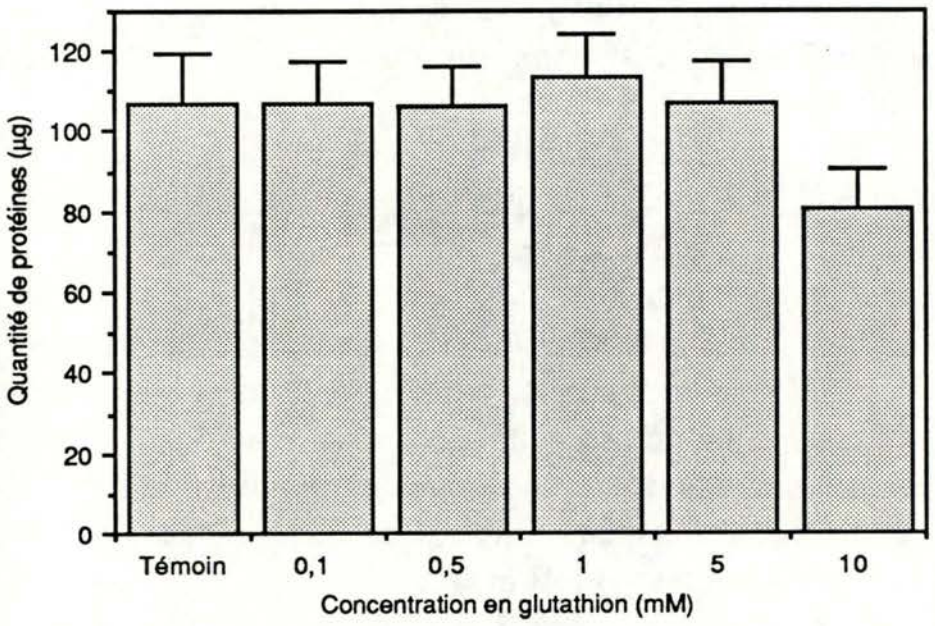


Figure 64: Effet du glutathion sur les cellules dans le Puck+. Les résultats sont représentés en quantité de protéines par rapport à la concentration en glutathion. Les concentrations utilisées sont 0; 0,1; 0,5; 1; 5; et 10 mM. Les cellules restent en contact avec le glutathion durant 2 jours et ensuite, on effectue le dosage de protéine (n=4).

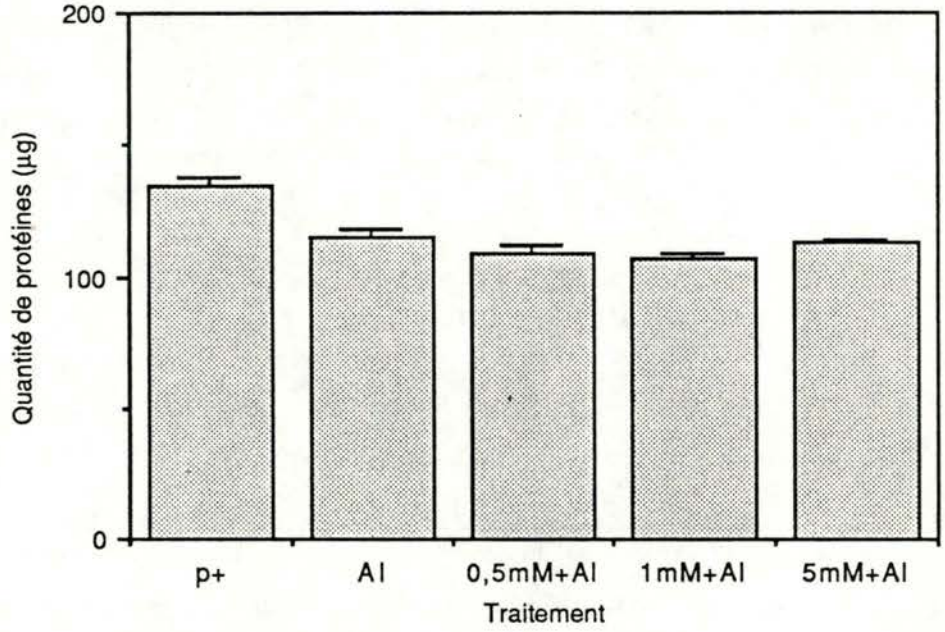


Figure 65: Quantité de protéines en fonction du traitement. Les cellules sont incubées durant 24 heures dans du Puck+, Al^{3+}/ Puck+, 0,5 mM en glutathion + Al^{3+}/Puck+, et 1 mM en glutathion + Al^{3+}/Puck+ et 5 mM en glutathion + Al^{3+}/Puck+ (la concentration en aluminium utilisée étant de $2x10^{-4}$ M). Le dosage de protéines est réalisé 2 jours après la fin du stress sous aluminium (n=4).

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons cherché d'autres facteurs susceptibles de modifier d'une part dans la toxicité de l'aluminium et d'autre part dans son effet sur le vieillissement des cellules.

4.2 / Antioxydants

Nous avons utilisé trois molécules communément acceptées comme protecteurs vis-à-vis des stress radicalaires: le glutathion, la vitamine E et la vitamine C. Dans chacun des cas, nous avons commencé par une étude de la toxicité de la molécule dans notre solution saline améliorée (Puck+) afin de choisir les concentrations qui seraient utilisées pour les tentatives de protection des cellules face à un stress sous aluminium.

4.2.1 / Le glutathion (GSH)(Sigma, Etats-Unis)

Le glutathion est un tripeptide, acide γ-glutamyl-cysteinyl-glycine L'oxydation de la fonction thiol de la cystéine de deux molécules GSH engendre la formation d'un pont disulfure donnant ainsi un GSSG (Halliwell et Gutteridge, 1985).

Nous avons d'abord examiné un effet toxique éventuel du GSH; pour ce faire, nous avons ajouté des concentrations en glutathion de 0,1mM, 0,5mM, 1mM, 5mM, et 10 mM dans le milieu Puck+. La quantité de cellules présentes après 2 jours est estimée par le dosage des protéines et est montré à la figure 64. Nous n'observons pas de toxicité si ce n'est un effet négatif pour une concentration en glutathion de 10 mM. Nous avons donc décidé, pour chercher une protection face à un stress sous aluminium, de travailler avec des concentrations en glutathion de 0,5 mM, 1mM et 5 mM. Comme le montrent les résulats à la figure 65, nous ne trouvons aucune protection avec cette molécule (test T de student non significatif)

4.2.2 / La vitamine E (Sigma, Etats-Unis)

La vitamine E ou α-tocophérol fait partie des vitamines liposolubles tout comme les vitamines A et K. L'action protectrice vis-à-vis des stress radicalaires vient du fait que la vitamine E, présente dans les bi-couches

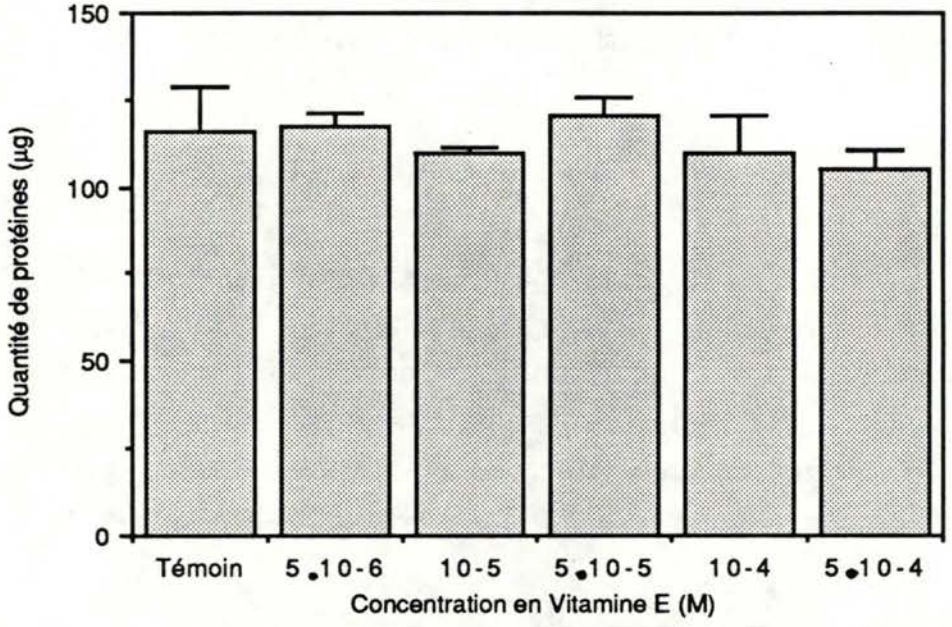


Figure 66: Effet de la vitamine E sur les cellules dans le Puck+. Les résultats sont représentés en quantité de protéines par rapport à la concentration en vitamine E. Les concentrations utilisées sont $5x10^{-6}$ M, 10^{-5} M, $5x10^{-5}$ M, 10^{-4} M, et $5x10^{-4}$ M. Les cellules restent en contact avec la vitamine E durant 2 jours et ensuite, on effectue le dosage de protéine (n=4).

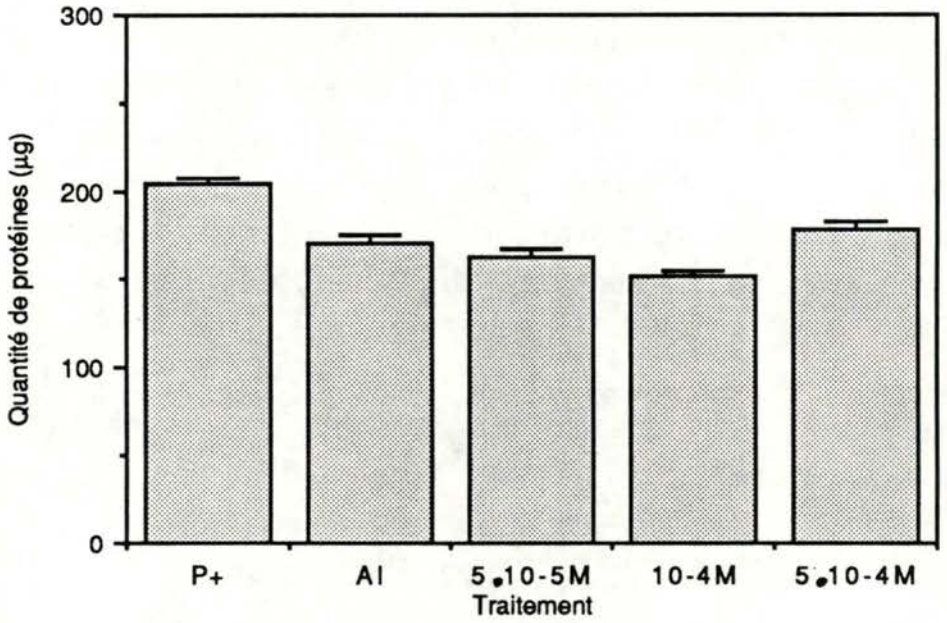


Figure 67: Quantité de protéines en fonction du traitement. Les cellules sont incubées durant 24 heures dans du Puck+, Al^{3+}/Puck+, $5x10^{-5}$ M en vitamine E + Al^{3+}/Puck+, 10^{-4} M en vitamine E + Al^{3+}/Puck+, et $5x10^{-4}$ M en vitamine E + Al^{3+}/Puck+ (la concentration en aluminium utilisée est $2x10^{-4}$ M). Le dosage de protéines est réalisé 2 jours après la fin du stress sous aluminium (n=4).

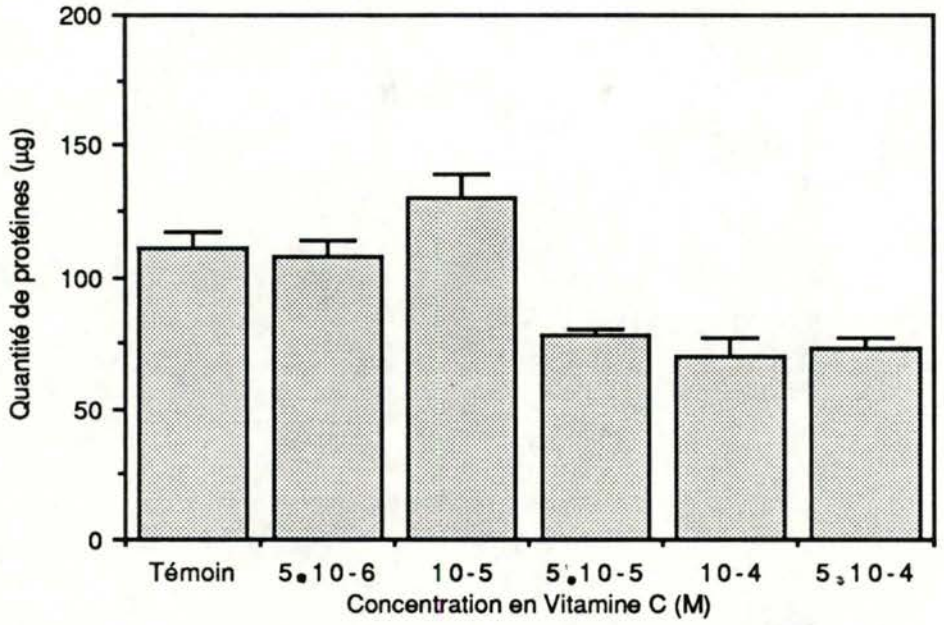


Figure 68: Effet de la vitamine C sur les cellules dans le Puck+. Les résultats sont représentés en quantité de protéines par rapport à la concentration en vitamine C. Les concentrations utilisées sont $5x10^{-6}$ M, 10^{-5} M, $5x10^{-5}$ M, 10^{-4} M, et $5x10^{-4}$ M. Les cellules restent en contact avec la vitamine C durant 2 jours et ensuite, on effectue le dosage de protéine (n=4).

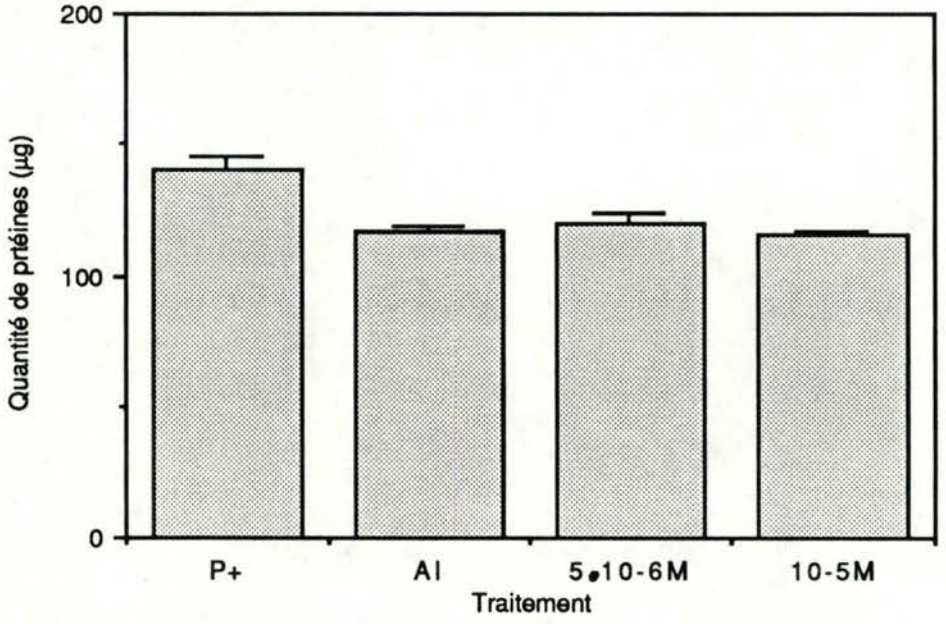


Figure 69: Quantité de protéines en fonction du traitement. Les cellules sont incubées durant 24 heures dans du Puck+, Al^{3+}/Puck+, $5x10^{-6}$ M en vitamine C + Al^{3+}/Puck+, et 10^{-5} M en vitamine C + Al^{3+}/Puck+ (la concentration en aluminium utilisée est $2x10^{-4}$ M). Le dosage de protéines est réalisé 2 jours après la fin du stress sous aluminium (n=4).

lipidiques des membranes biologiques, donne un hydrogène à un radical peroxyl issu de la peroxydation lipidique, l'empêchant ainsi de propager la réaction (Mason, 1980).

Nous avons également commencé par une étude de la toxicité de la molécule dans le Puck+. Comme le montre la figure 66, nous n'avons décelé aucune toxicité de la vitamine E aux concentrations utilisées qui sont $5x10^{-6}$ M, 10^{-5} M, $5x10^{-5}$ M, 10^{-4} M et $5x10^{-4}$ M. Nous avons alors choisi de travailler aux trois concentrations les plus élevées.

Comme le montre la figure 67, nous n'avons obtenu aucune protection avec la vitamine E vis-à-vis du stress sous aluminium (test T de student non significatif).

4.2.3 / Vitamine C (Merck, Allemagne Fédérale)

La vitamine C, ou acide ascorbique, est un agent hydrosoluble qui réduit directement les radicaux peroxyles hydrosolubles ou agit indirectement par réduction des radicaux α-tocophérols (Bendich, 1986).

Nous avons commencé par une étude de toxicité de la molécule seule dans le Puck+ en choisissant les mêmes concentrations en vitamine C que dans le cas de la vitamine E. En examinant la figure 68, on constate un effet négatif de la vitamine sur les cellules en culture. Il s'agit d'un effet pro-oxydant qui a déjà été décrit (Toussaint, 1988).

Pour le test de protection vis-à-vis d'un stress sous aluminium, nous avons utilisé deux concentrations en vitamine C: $5x10^{-6}$ M et 10^{-5} M. La figure 69 montre qu'aucune protection n'a été obtenue dans le cas du stress sous aluminium (test T de student non significatif).

4.2.4 / Conclusion

Dans chacun des trois molécules agissant comme anti-oxydants, nous n'avons pas observé de protection pour les stress sous aluminium. Ces résultats nous permettent de postuler que la toxicité des stress sous aluminium n'est pas médiée par les radicaux libres alors qu'on aurait pû le supposer au vu de la réaction de Fenton-Haber-Weiss. En effet, cette

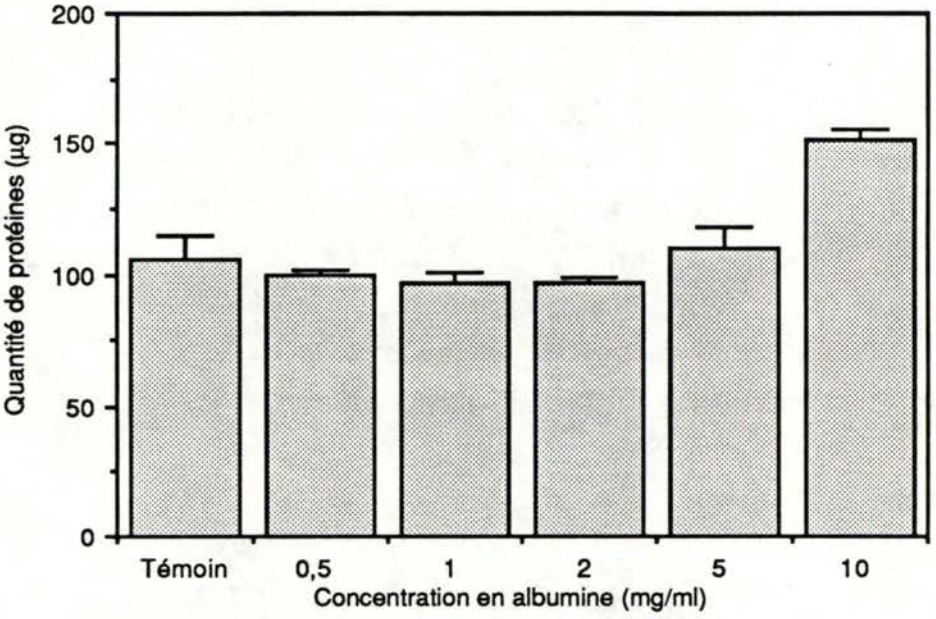


Figure 70: Effet de l'albumine sur les cellules dans du Puck+. Les résultats sont représentés en quantité de protéines par rapport à la concentration en albumine. Les concentrations utilisées sont de 0; 0,5; 1; 5; 10 mg/ml. Les cellules restent en contact avec l'albumine durant 2 jours et ensuite, on effectue le dosage de protéine (n=4).

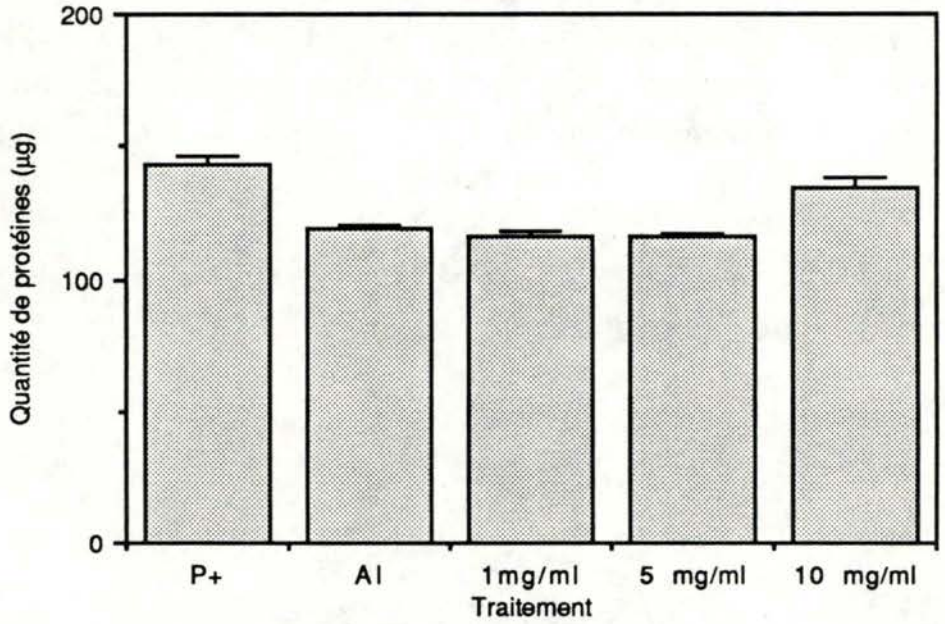


Figure 71: Quantité de protéines en fonction du traitement. Les cellules sont incubées durant 24 heures dans du Puck+, Al^{3+}/Puck+, 1 mg/ml d'albumine + Al^{3+}/Puck+, 5 mg/ml d'albumine + Al^{3+}/Puck+, et 10 mg/ml d'albumine + Al^{3+}/Puck+ (la concentration en aluminium utilisée est $2x10^{-4}$ M). Le dosage de protéines est réalisé 2 jours après la fin du stress sous aluminium (n=4).

dernière montre que les ions 3+ des métaux principalement le fer, entrent dans la réaction de formation des radicaux hydroxyles, qui sont en partie responsables de la peroxydation lipidique (Halliwell, 1987). On sait aussi que l'aluminium inhibe *in vitro* la superoxyde dismutase qui détruit les radicaux superoxydes en H_2O_2 et H_2O. Cependant, les résultats expérimentaux montrent que des anti-oxydants liposolubles ou hydrophiles classiques tels le glutathion et les vitamines E et C n'ont aucun effet protecteur lors de stress sous aluminium.

4.3 / Protection par des protéines extra-cellulaires

Etant donné que l'aluminium inhibe une grande variété d'enzymes, nous avons examiné si l'on pouvait réduire la toxicité de l'aluminium en ajoutant des protéines au milieu de culture de manière à ce que l'aluminium vienne s'y fixer. Nous avons testé l'effet de concentrations croissantes en albumine (Sigma, Etats-Unis) comprises entre 0,5 et 10 mg/ml.

En examinant la figure 70, nous pouvons voir qu'il n'y pas d'expression d'une toxicité mais bien un effet positif pour une concentration de 10 mg/ml. Cet effet est probablement dû à un effet sur la croissance et l'on sait en tout cas que celle-ci est légèrement inhibée par le Puck. On sait aussi que l'albumine permet un meilleur attachement des cellules sur leur substrat de plastique .

Pendant le stress sous aluminium, nous avons utilisé des concentrations en albumine de 1 mg/ml, 5 mg/ml, et 10 mg/ml. A la figure 71, nous pouvons voir que la quantité de protéines dans le test traité par 10 mg d'albumine par ml est plus élevée. On a vu cependant à la figure 70 que cette concentration en albumine provoquait un accroissement important des cellules qui peut expliquer cet effet. Il n'apparaît donc pas qu'il y ait un effet protecteur sur le stress sous aluminium. En conclusion, l'aluminium ne paraît pas protéger d'un stress sous aluminium.

4.4 / Protection du métabolisme énergétique

Nous avons montré plus haut que la mortalité cellulaire s'accroît lorsque le stress sous aluminium est associé à un découplage mitochondrial. Nous avons maintenant voulu tester l'effet de l'ajout de

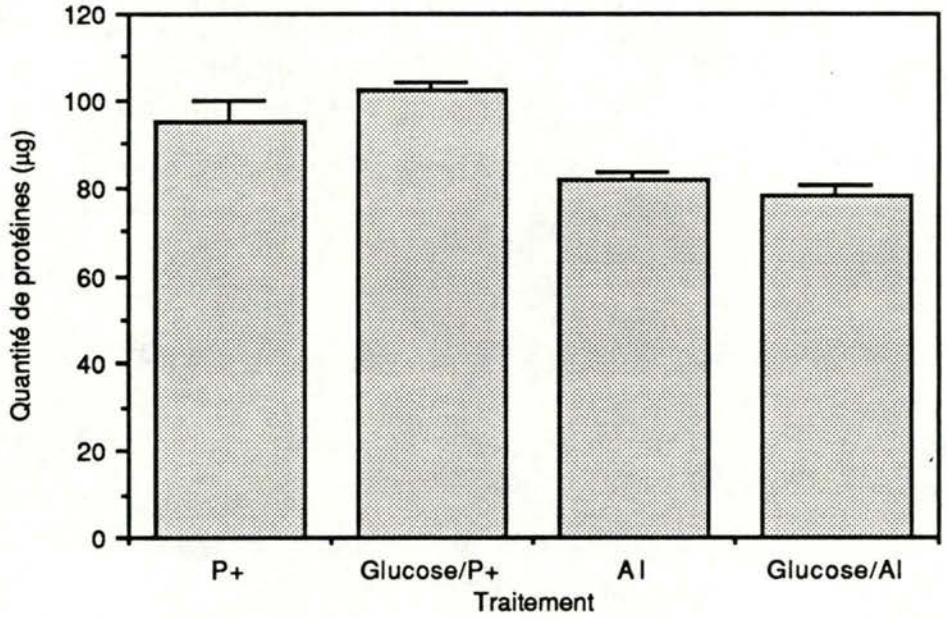


Figure 72: Quantité de protéines en fonction du traitement. Les cellules sont incubées 24 heures en présence de Puck+, Glucose/Puck+, Al^{3+}/Puck+, et glucose + Al^{3+}/Puck+ (la concentration en aluminium utilisée est $2x10^{-4}$ M) (n=4).

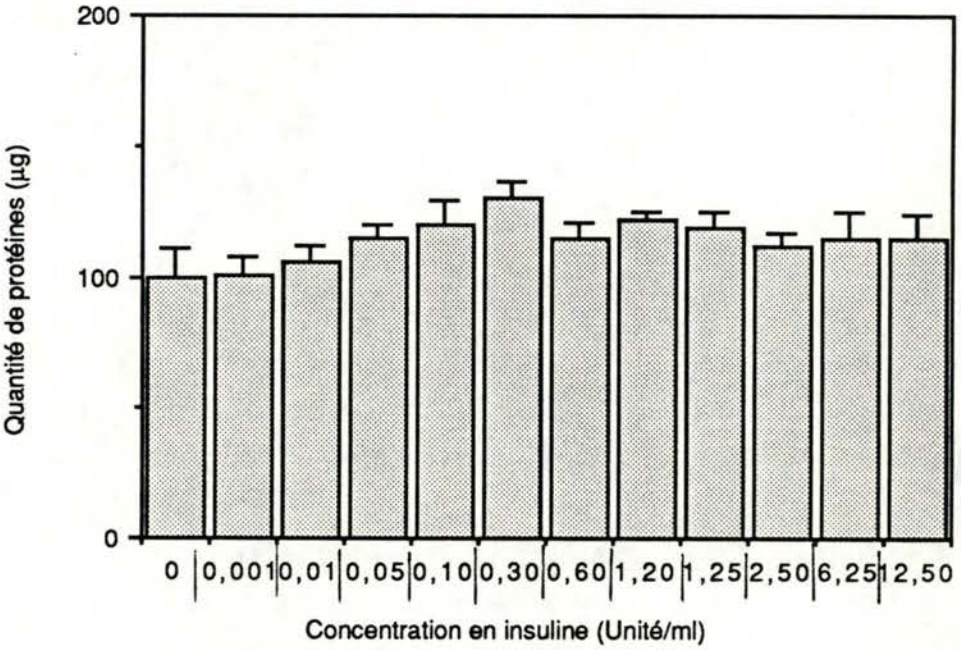


Figure 73: Effet de l'insuline sur les cellules dans du Puck+. Les résultats sont représentés en quantité de protéines par rapport à la concentration en insuline. Les concentrations utilisées sont de 0; 0,001;0,01; 0,05; 0,1; 0,3; 0,6; 1,2; 1,25; 2,50; 6,25; 12,5 Unité/ml. Les cellules restent en contact avec l'insuline durant 2 jours et ensuite, on effectue le dosage de protéine (n=4).

molécules qui entrent dans le métabolisme énergétique de la cellule pour déterminer si celles-ci avaient un effet protecteur face au stress sous aluminium. Nous avons testé l'effet d'un ajout de glucose, d'insuline en présence de glucose au Puck +, de β-hydroxybutyrate et de glutamine au Puck +.

4.4.1 / Glucose (Merck, Allemagne Fédérale)

Nous savons qu'en situation de stress, la cellule a besoin de suffisamment d'énergie pour résister efficacement au stress. La plupart de l'énergie cellulaire est fournie par la glycolyse et les phosphorylations oxydatives. Ces deux voies métaboliques étant de grandes consommatrices de glucose, nous avons testé l'effet d'une augmentation de la concentration en glucose. Nous avons porté cette dernière de 5 mM dans le Puck + à 10 mM.

La figure 72, nous donne les résultats obtenus, nous pouvons constater que le témoin Puck+ contenant 10 mM de glucose est légèrement supérieur au témoin Puck+ seul. Par contre, on ne note aucune différence significative entre l'effet du stress sous aluminium dans le Puck + et celui en présence de Puck + avec 5 mM de glucose, contrairement à ce qui se passe lorsque l'on ajoute 5 mM de glucose à du Puck qui n'en contient pas (fig.61). Cela peut se comprendre facilement puisque dans un cas on passe d'un milieu sans source d'énergie à un milieu contenant du glucose (fig.61) alors que dans l'autre cas, on augmente simplement la concentration de glucose si se trouvait déjà sans doute suffisance pour fournir une protection.

4.4.2 / Insuline (Sigma, Etats-Unis)

L'insuline, entre autres effets telle que la stimulation de la mitose et la stimulation du transport de glucose, possède une action intracellulaire de régulateur du métabolisme intermédiaire via la stimulation de la glycolyse (Bessman *et al.*, 1986). Cette voie étant une source d'ATP et surtout de pyruvate pouvant servir au cycle de Krebs, nous avons testé si l'insuline pouvait protéger la cellule confrontée à un stress sous aluminium.

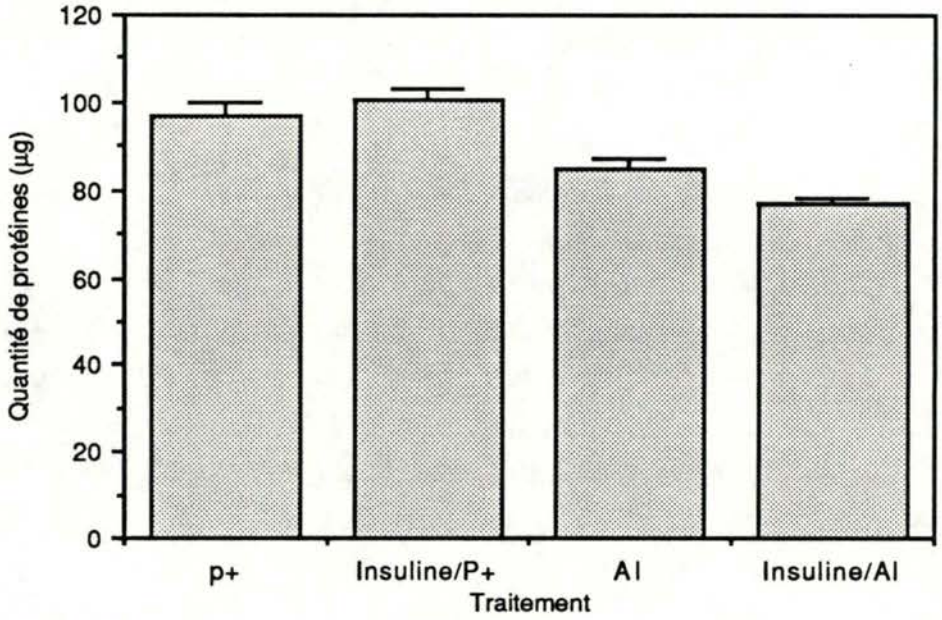


Figure 74: Quantité de protéines en fonction du traitement. Les cellules sont incubées 24 heures en présence de Puck+, insuline/Puck+, Al^{3+}/Puck+, et insuline + Al^{3+}/Puck+(la concentration en aluminium utilisée est $2x10^{-4}$ M). Le dosage de protéines est réalisé 2 jours après la fin du stress sous aluminium (n=4).

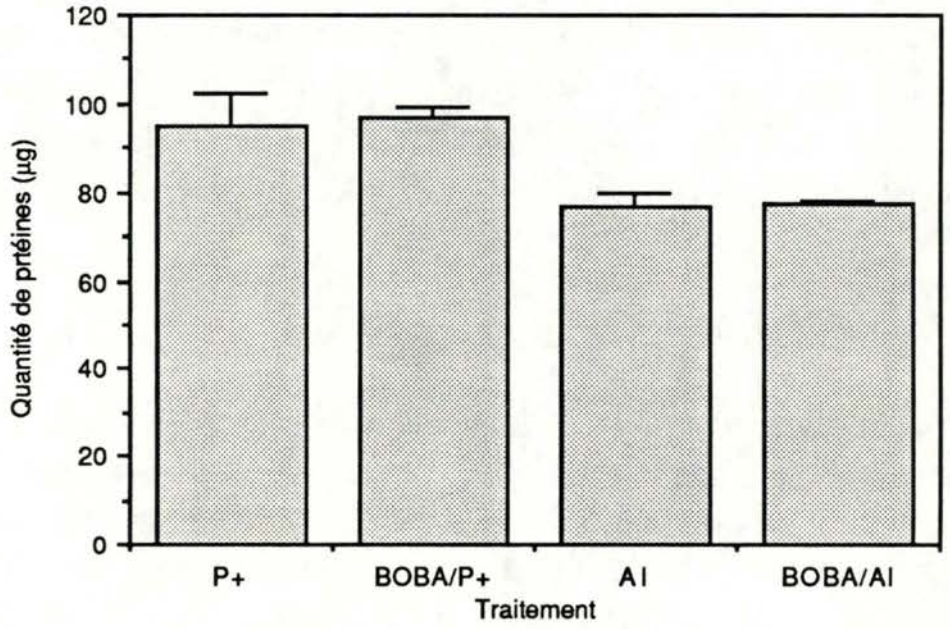


Figure 75: Quantité de protéines en fonction du traitement. Les cellules sont incubées 24 heures en présence de Puck+, BOBA/Puck+, Al^{3+}/Puck+, et BOBA + Al^{3+}/Puck+ (la concentration en aluminium utilisée est $2x10^{-4}$ M). Le dosage de protéines est réalisé 2 jours après la fin du stress sous aluminium (n=4).

Nous avons d'abord effectué une étude de l'effet de l'insuline sur la croissance des cellules en culture en fonction de la concentration en insuline. Nous pouvons voir, à la figure 73, que l'insuline a bien, dans des conditions normales un effet positif sur la croissance des cellules en culture après 3 jours en présence d'insuline.

Vu que l'effet est présent à pratiquement toutes les concentrations, nous avons décidé de travailler à une concentration de 2,5 unités/ml. La figure 68, nous montre que dans le cas du stress sous aluminium, nous n'avons pu déceler aucune protection (test de t de student non significatif) et que nous aurions même plutôt un léger effet négatif en présence d'aluminium.

4.4.3 / β-hydroxybutyrate (Sigma, Etats-Unis)

Le β-hydroxybutyrate (BOBA) est un corps cétonique qui peut être incorporé par les fibroblastes. Il est le substrat de réactions enzymatiques qui le font directement entrer dans le cycle de Krebs. Ainsi, il permet à la cellule de réduire du NAD^+ et du FAD^+ en NADH et $FADH_2$ sans l'intervention de la glycolyse et donc sans l'intervention de pyruvate et de glucose. L'aluminium étant un inhibiteur connu de nombreuses enzymes, dont l'hexokinase, il était possible que l'ion aluminium inhibe la glycolyse et donc qu'un supplément d'énergie sous forme de β-hydroxybutyrate se révèle protecteur face au stress. La forme D(-) du β-hydroxybutyrate, considérée comme étant l'isomère naturel est dirigée de préférence vers le cycle de Krebs, tandis que la forme L(+) est surtout orientée vers la biosynthèse des acides gras, de stérols et d'acides aminés. (Lehninger *et al*, 1953).

On sait que le BOBA n'est pas toxique sur culture pour autant que sa concentration soit inférieure à 0,5 mM (Corbisier, 1989). Nous avons testé l'effet d'une concentration en BOBA de 0,1 mM. Comme nous le montre la figure 74, nous n'avons pu montrer aucune protection face au stress en présence de cette molécule (test T de student non significatif).

4.4.4 / la glutamine (Sigma, Etats-Unis)

La glutamine peut entrer dans la cellule et notamment dans les mitochondries où elle peut avoir différents rôles. Parmi ceux-ci, on trouve

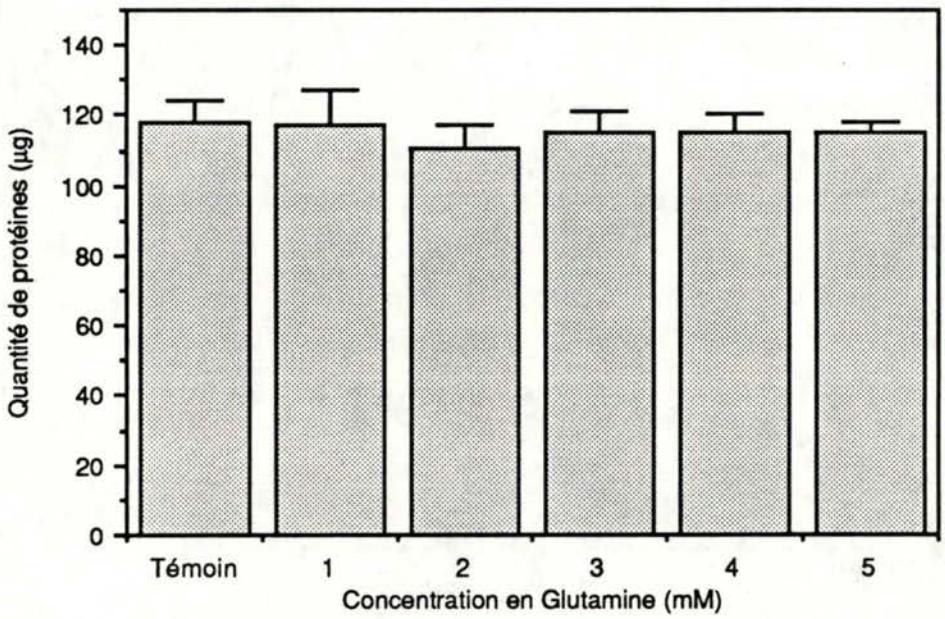


Figure 76: Toxicité de glutamine sur les cellules dans le Puck+. Les résultats sont représentés en quantité de protéines par rapport à la concentration en glutamine. Les concentrations utilisées sont de 0, 1, 2, 3, 4, et 5 mM. Les cellules restent en contact avec la glutamine durant 2 jours et ensuite, on effectue le dosage de protéine (n=4).

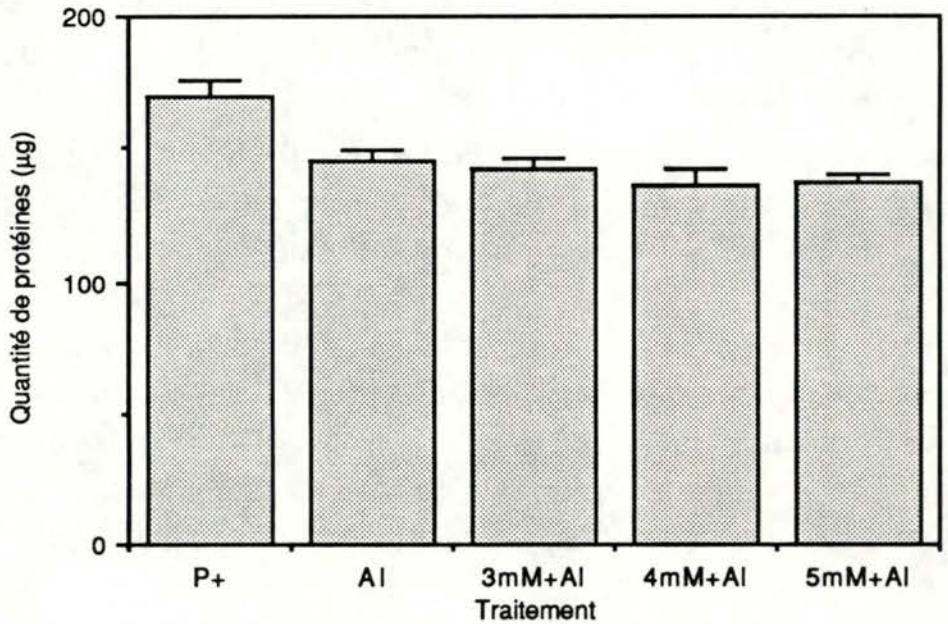


Figure 77: Quantité de protéines en fonction du traitement. Les cellules sont incubées durant 24 heures dans du Puck+, Al^{3+}/Puck+, 3 mM de glutamine + Al^{3+}/Puck+, 4 mM de glutamine + Al^{3+}/Puck+, et 5 mM en glutamine + Al^{3+}/Puck+ (la concentration en aluminium utilisée est $2x10^{-4}$ M). Le dosage de protéines est réalisé 2 jours après la fin du stress sous aluminium (n=4).

la synthèse des bases purines, de l'histidine, du NAD et des hexosamines. Notons aussi qu'en cas d'une diminution de la concentration en ATP, la glutamine peut être transformée en glutamate, et ce dernier peut être retransformé en α-cétoglutarate qui est un intermédiaire du cycle de Krebs.

L'étude de la toxicité de la glutamine dans le milieu des stress, figure 75, ne révèle aucune toxicité de la glutamine aux concentrations généralement utilisées: 1, 2, 3, 4, et 5 mM.

Nous avons ensuite effectué un stress sous aluminium en présence de 3, 4, et 5 mM en glutamine, et comme nous le montre la figure 76, nous n'avons obtenu aucune protection par la glutamine (test T de student non significatif).

4.5 / Effet sur le vieillissement en présence de chacune des molécules testées au niveau de la toxicité

Enfin, il est à noter que nous avons également effectué une étude de l'effet sur le passage des types morphologiques pour chacune des molécules citées ci-dessus, mais que nous n'avons pu constater aucune protection par ces molécules au niveau du passage des cellules d'un type à l'autre en culture. Ceci confirme l'absence d'effet de ces molécules au niveau de la toxicité.

Chapitre 5: Discussion

Nous avons présenté dans l'introduction de ce travail un modèle théorique décrivant les différents aspects du vieillissement cellulaire en considérant la cellule en tant que système ouvert loin de l'équilibre. Ce modèle prédit un passage graduel de la cellule par différents états stationnaires, chacun de ceux-ci étant caractérisé par un niveau basal de production d'entropie de plus en plus faible.

La théorie prévoit aussi que ce passage graduel peut se faire sous l'influence de deux facteurs classiquement cités dans les revues sur le vieillissement cellulaire: le génome, facteur totalement déterministe et l'altération moléculaire, pour sa part stochastique (Toussaint *et al.* , sous presse).

En plus de cet aspect théorique, nous nous sommes attachés à la mise au point d'un modèle expérimental permettant de tester les hypothèses qui découlent de cette théorie. Dans ce cadre, le vieillissement des fibroblastes humains WI-38 a été utilisé comme modèle expérimental de base. En effet, au cours de leur culture *in vitro* les fibroblastes des différentes lignées, dont les WI-38, passent par sept étapes successives et bien distinctes, caractérisées biochimiquement et morphologiquement (Francz *et al.*, 1989). Notons de suite, que ces différentes étapes se retrouvent dans le vieillissement *in vivo* des fibroblastes humains (Bayreuther *et al.*, 1988). Nous avons postulé que ces 7 étapes représentaient chacune un état stationnaire donné. Les cellules seraient en effet stables à un état donné assez longtemps que pour pouvoir être reconnues morphologiquement mais également au niveau de leur composition protéinique sur gel d'électrophorèse à deux dimensions.

Nous avons tout d'abord décrit morphologiquement les sept types de fibroblastes ainsi que leurs proportions au cours des passages en culture. Les trois premiers types sont mitotiques et sont appelés MF (mitotic fibroblast) I, II, et III. Les trois suivants sont post-mitotiques: PMF (post-mitotic fibroblast) IV, V, et VI. Enfin le dernier type (PMF VII) est constitué de cellules post-mitotiques qui dégénèrent et meurent. Typiquement, les cellules de type I qui sont abondantes au cours des premiers passages, diminuent en nombre assez rapidement. La proportion des cellules de type II augmente un peu et puis diminue également en faveur

des cellules de type III et finalement des cellules de type post-mitotiques (IV, V, VI, VII) que l'on peut observer en faibles proportions au cours des derniers passages. Des proportions plus fortes de ces cellules ne peuvent être observées que dans des cultures à long terme de cellules ayant épuisé leur potentiel de division (Bayreuther *et al.*, 1988).

Cette évolution "naturelle" à travers différents stades a souvent été considérée comme un argument puissant en faveur des théories déterministes du vieillissement cellulaire (Bayreuther *et al.*, 1988, 1990; Rodemann *et al.*, 1989; Francz *et al.*, 1989). D'après ces auteurs, cette évolution provient de modifications programmées dans la régulation de l'expression du génome.

Il est évident que le but de notre travail n'a pas été la remise en cause pure et simple de cette argumentation. Néanmoins, d'après notre modèle théorique, le génome ne serait pas le seul maître à bord en ce qui concerne cette évolution. Cette dernière pourrait en effet être conditionnée par d'autres facteurs dépendant de la prise en compte du système cellulaire dans sa globalité. En effet selon la théorie, tout stress intense, de quelque nature qu'il soit, à partir du moment où il altère suffisament le fonctionnement ou la structure cellulaire, pourrait déstabiliser l'état stationnaire dans lequel se trouve la cellule. Dans ce cas, le système cellulaire se réorganiserait dans un nouvel état stationnaire caractérisé par un niveau d'erreurs plus haut et une production d'entropie plus faible. Selon cette hypothèse, l'évolution du génome ne serait qu'une conséquence de la réorganisation globale du système cellulaire.

Pratiquement, cela signifie que si l'on fait subir des stress intenses mais non létaux à des cellules à un stade donné, celles-ci vont réagir au stress en passant à un stade ultérieur de leur évolution "naturelle".

Cette hypothèse a déjà été vérifiée après des stress sous peroxyde lipidique ou sous éthanol en montrant qu'après un stress intense sur des cultures de cellules jeunes, les proportions des différents types morphologiques évoluent vers des valeurs typiques de cultures de cellules âgées (Toussaint *et al.*, soumis pour publication).

Le but de ce mémoire était de tester l'effet des stress sous nitrate d'aluminium sur les proportions de types morphologiques et de tirer des informations quant aux causes possibles de cette évolution.

C'est l'importance que prend l'aluminium dans notre environnement surtout via les effets toxiques qu'on lui découvre sur différentes espèces et notamment sur l'homme qui nous a poussé à choisir cette molécule comme agent stressant. L'aluminium est en effet communément accepté comme étant la cause principale de maladies comme le syndrome d'encéphalopathie des dialysés et l'ostéomalacie des dialysés. Il est proposé comme une des causes possibles dans le cas des démences de type Alzheimer qui sont justement caractérisées par une mortalité précoce des cellules neuronales.

Lorsqu'un sel d'aluminium soluble est appliqué durant une longue durée sur les cellules en culture, l'aluminium présente un effet toxique très important. Dans des conditions intermédiaires et donc si l'effet toxique n'est pas trop important, on peut observer des modifications en ce qui concerne les proportions des types morphologiques. L'évolution des proportions des trois premiers types cellulaires après un stress est relativement facile à interpréter si l'on admet que suite à un stress, les cellules de type I évoluent en cellules de type II et celles-ci évolueront ensuite en cellules de type III. Les cellules de type IV sont les premières cellules post-mitotiques observées en condition normale et leur nombre augmente suite à un stress (cette proportion augmente avec le nombre de passages de la culture qui subi le stress, mais n'atteint jamais un haut pourcentage tant que les cellules mitotiques, capables de se diviser, sont présentes). Les cellules de type V et VI augmentent mais en proportion encore plus faible. Les cellules de type VII n'apparaissent pratiquement pas, si ce n'est le lendemain du stress où une proportion des cellules moins résistantes dégénèrent suite au stress.

Ces résultats peuvent être expliqués si nous acceptons le fait que le niveau d'erreurs nécessaire pour provoquer le passage des cellules de type III en type IV est relativement élevé alors qu'il serait faible pour les passages suivants. Dans cette perspective, suite à un stress, les cellules s'accumuleraient surtout sous forme de cellules de type III et IV, avec un plus faible pourcentage de cellules de type V, VI et VII.

La même interprétation peut être appliquée pour les résultats obtenus après des stress successifs. En effet, les cellules de type I disparaissent rapidement ainsi que les cellules de type II, alors que les cellules de type III et IV s'accumulent dans la culture. Une observation intéressante est que si le premier stress affecte relativement fort les cellules, l'effet des stress suivants sur les cellules semble moins marqué, la population

cellulaire devenant de plus en plus homogène du point de vue de sa résistance au stress.

1. La première conclusion de notre travail est que les résultats expérimentaux que nous avons obtenus après des stress sous aluminium renforcent ceux obtenus après des stress sous peroxyde lipidique et sous éthanol. De fait, dans les trois cas, un stress appliqué sur des cultures de cellules jeunes a bien pour effet un passage accéléré vers des proportions de types morphologiques caractéristiques de cultures de cellules âgées. Rappelons que l'effet des trois stress sont tout à fait différents. Le tert-butylhydroperoxide est source de radicaux libres qui peuvent affecter tous les composants cellulaires (Ochi et Miyaura, 1987). Quant à l'éthanol, ses effets cellulaires peuvent se remarquer sur la croissance cellulaire, sur le métabolisme général (Barnes *et al.*, 1990) ou sur le métabolisme du calcium en particulier, et enfin sur la stabilité membranaire (Brazeau et Fung, 1990). Enfin, l'aluminium inhibe de nombreuses enzymes et peut définitivement remplacer le Mg^{++} sur l'ATP en le rendant inutilisable et peut aussi se fixer sur la chromatine (Ganrot, 1986).

Replacé dans un cadre plus large, ces résultats sont de nouveaux arguments en faveur du modèle théorique. Ce modéle ne donne pas d'informations sur les causes de l'évolution à travers une succession d'états stationnaires. Cependant, une conclusion de ce modèle est que la cellule optimalise son fonctionnement selon son état de différenciation et ses interactions avec son environnement. Les premières études décrivant l'évolution des morphotypes fibroblastiques en culture sous conditions normales ou après des stress interprètent cette évolution comme un processus de différenciation (Bayreuther *et al.*, 1988; Rodeman *et al.*, 1989). Les stress utilisés dans ces études étaient la lumière U.V.(Rodeman, 1989), la mitomycine C (Rodeman *et al.*, 1989) ou les champs magnétiques intenses (Rodeman, 1989 **b**). Toutes ces conditions peuvent influencer la stabilité de l'ADN et donc agir sur l'expression génique. Si ces stress ont surement un effet sur l'ADN et son expression, ils affectent aussi de nombreux autres composants cellulaires et sont aussi toxiques à fortes doses. Les résultats obtenus maintenant avec trois autres types de stress (peroxyde lipidique, éthanol et aluminium) montrent aussi un passage des cellules par différents morphotypes avec la même accumulation de cellules de types III et IV. Ceci en faveur d'une interprétation de réorganisation globale de la cellule dans des états spécifiques caractérisés par l'expression de protéines nécessaires à la survie de la cellule dans ces conditions. En d'autres mots, la cellule réagira globalement, et de la même

manière pour survivre face à tout type de stress intenses. L'interprétation génétique donnée par Bayreuther et al.(1988) est beaucoup plus restrictive puisque les mêmes gènes qui feraient passer les cellules d'un morphotype à l'autre doivent être exprimés ou réprimés exactement de la même manière en conditions normales ou sous l'effet d'au moins six stress de nature très différente.

L'évolution d'un type cellulaire suite à des stress uniques ou répétés est en accord avec la théorie qui considère la cellule comme un état stationnaire qui peut évoluer d'un état à un autre au cours du temps et suite à un stress. Si les erreurs générées par le stress sont trop nombreuses, cela pourrait définitivement déstabiliser le système et la cellule mourirait: un seuil critique a été atteint. Si le nombre d'erreurs engendrées est beaucoup plus faible, celles-ci ne déstabiliseraient pas le système et, après correction, la cellule restera dans son état stationnaire. Pour des stress intermédiaires, les erreurs qui seront engendrées déstabiliseront l'état stationnaire et la cellule réagira par une augmentation temporaire de la production d'entropie dans le but de produire plus d'énergie pour faire face à ces modifications. Mais la perturbation sera si importante que la cellule ne reviendra pas dans son état stationnaire de départ mais en recherchera un autre avec un niveau de production d'entropie plus bas et un niveau d'erreurs plus élevé.

2. Les résultats de notre mémoire vont plus loin qu'une simple confirmation des résultats obtenus en ce qui concerne l'effet des stress sur un passage prématuré de cellules de types jeunes (I, II) vers des cellules de types âgés (III à VII). En effet, le modèle théorique postule que différents facteurs peuvent intervenir dans ce passage vers des cellules de types âgés. Dans cette approche, nous avons testé l'hypothèse de l'intervention du métabolisme énergétique cellulaire. La cellule a besoin d'énergie pour se défendre face à tout stress: elle doit combattre les perturbations introduites par le stress de manière à les faire disparaître. Théoriquement, il est donc possible qu'une modification du potentiel énergétique de la cellule ait une conséquence sur la résistance de la cellule face au stress.

D'une part, si l'on abaisse le potentiel énergétique, la cellule résistera moins bien au stress. En d'autres mots, l'état stationnaire dans lequel se trouve la cellule sera plus facilement déstabilisé. Pratiquement, on doit donc s'attendre à une proportion plus élevée de passages vers des types morphologiques âgés. Nous avons testé cette hypothèse en soumettant les

cellules à un stress sous aluminium en présence d'un découplant des phosphorylations oxydatives. Deux faits majeurs resortent de ces expériences; premièrement, une mortalité cellulaire supérieure suite au stress en présence de découplant et donc une résistance moindre des cellules et deuxièmement, on observe une proportion accrue de passages vers des types morphologiques âgés en présence de découplant. Ces effets peuvent être interprétés comme une déstabilisation de l'état stationnaire d'une grande proportion de cellules.

D'autre part, si l'on augmente le potentiel énergétique, la cellule devrait mieux résister au stress. Autrement dit, l'état stationnaire de la cellule sera moins facilement déstabilisé. Expérimentalement, cela devrait donc se traduire par une proportion moins élevée de passages vers des types morphologiques âgés. Pour tester cela, nous avons enrichi le tampon dans lequel les cellules baignent pendant le stress. L'ajout des constituants classiques des milieux de cultures (glucose, acides aminés et vitamines) a entraîné une résistance accrue des cellules confrontées au stress: il faut en effet multiplier le temps de stress par quatre pour observer la même mortalité lorsque ces constituants sont présents. De plus, il semblerait que le glucose soit le constituant le plus efficace dans cette résistance accrue. En ce qui concerne les proportions de morphotypes, dans des conditions de mortalité égale, on observe bien une diminution des proportions de passage à des types âgés en présence de ces nutriments. L'absence de protection supplémentaire en présence d'anti-oxydants et d'autres molécules énergétiques comme la glutamine, l'insuline ou le glucose peut s'expliquer de diverses manières et ne remet pas nécessairement en cause la théorie. En effet, il se peut que le contrôle qui dans ces expériences contient déjà beaucoup de molécules importantes pour le fonctionnement des cellules et donc que 5mM de glucose soit déjà largement suffisant pour apporter une protection importante de sorte que l'addition d'autres molécules ne puisse plus augmenter cette protection.

En conclusion, cette approche concernant l'effet de stress sur les morphotypes des fibroblastes confirme le point de vue sur le vieillissement des cellules comme étant un processus en plusieurs étapes qui peut être accéléré suite à toute une série de modifications environnementales. Cependant, d'autres prédictions du modèle théorique doivent encore être vérifiées. Par exemple, il faut s'attendre à ce qu'une modification de l'efficacité d'un système de défense face à un stress particulier ait des répercutions dans cette évolution à travers différentes étapes.

L'examen de l'effet de stress sur l'évolution cellulaire constitue une nouvelle approche des modifications cellulaires liées au vieillissement puisque, *in vivo*, les cellules peuvent être en contact avec des produits toxiques, des radicaux libres,... ou leur métabolisme peut être perturbé dans des conditions comme l'inflammation ou l'hypoxie. Il serait donc utile de considérer les effets biologiques de l'accélération de l'évolution de cellules plus ou moins différenciées dans le cadre de l'étude des nombreuses maladies chroniques affectant la plupart des tissus humains.

Bibliographie

Babloyantz, A. Molecules, dynamics and life. In: Prigogine, I. and Nicolis, G. (eds) *Nonequilibrium problems in the physical science and biology. : An introduction to self-organisation of matter*, vol.4 Wiley Interscience New-York 1986.

Bamberger, C.E., J., Borld and R.L., Cabrini. Inhibition of alkaline phosphatase by beryllium and aluminium. *Arch. Biochem. Biophys.*, **123** (1968) 195-200.

Barnes, Y., S., Houser and F.A. Barile. Temporal effects of ethanol on growth, thymidine uptake, protein and collagen production in human foetal lung fibroblasts. *Toxicol. in Vitro*, **4** (1990) 1-7.

Bayreuther, K. and P.I., Francz. Aging in the human dermal fibroblast stem cell system *in vivo* and *in vitro*. *Molec. Biol. Aging*, (1990) 205-215.

Bayreuther, K., H.P. Rodemann, R. Hommel, K. Dittmann, M. Albiez and P.I. Francz, Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85** (1988) 5112-5116.

Bayreuther, K.; H.P., Rodemann; P.I., Francz; K. Mauer. Differentiation of fibroblast stem cells. *J. Cell Sci.* , **suppl. 10**, (1989) 1-15.

Bendich A., L.J. Machlin and O. Scandurra The antioxidant role of vitamin C. *Adv. Free Rad. Biol. Med.*, **2** (1986) 419-444.

Bessman, S.P., C., Nohan and I., Zoider. Intracellular site of insulin action: mitochondrial cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83** (1986) 5067-5070.

Bortz, W.M. II Aging as entropy. *Exp. gerontol.* ,**21** (1986) 321-328.

Brazeau, G.A. and Fung, H.-L. Mechanisms of creatine kinase release from isolated rat skeletal muscles damaged by propylene glycol and ethanol. *J. Pharmaceut. Sci.*, **79** (1990) 393-397.

Corbisier, P. Importance des mitochondries dans le processus de vieillissement cellulaire. (1989), *Thèse doctorale, FNDP*, Namur

Crapper, D.R. and A.J., Dalton. Aluminium-induced neurofibrillary degeneration, brain electrical activity and alteration in acquisition and retention. *Physiol. Behavior*, **10** (1973) 935-945.

Cutler, R.G. (ed.), *The dysdiffernetiative hypothesis of mammalian aging and longevity*, Raven Press, New-York, (1982)

Cutler, R.G. In: R.C., Adelman and G;S., Roth, eds. *Testing the theories of aging.* CRC Press Boca Raton, Florida, (1982) pp. 25-34.

Dahl, A, A., Bignani, N.J. Bich and N.H., Chi. Immunochemical characterization of neurofibrillary tangles induced by mitotic spindle inhibitors. *Acta Neuropathol.*, **51** (1980) 165-168.

De Boni, V., A., Otvos, J.W., Scott and D.R., Crapper. Neurofibrillary degeneration induced by systemic aluminium. *Acta Neuropathol.(Berlin)*, **35** (1976) 285-294.

Driscoll, C.T., J., Baker, J.P., Bisogni and C.L., Schofiekd Effect of aluminium speciation on fish in dilute acidified waters. *Nature (London)* , **204** (1979) 304-306.

Economos, A.C., J. Miquel, J.E., Fleming and J.E. Johnson Jr, Is there intrinsic mitochondrial aging? *Age*, **3** (1980) 117-126.

Fleming, J.E., J. Miquel, S.F. Cottrell, L.S. Yengoyan and A.C. Economos, Is cell aging caused by respiration-dependant injury to the mitochondrial genome? *Mech. Ageing. Dev.*, **28** (1982) 44.

Francz, P. I.; K., Bayreuther; H.P., Rodemann, Cytoplasmic, nuclear, membrane-bound and secreted (^{35}S)methionine-labelled polypeptide pattern in differentiating fibroblast stem cells i*n vitro*. *J. Cell Sci.*, **92** (1989), 231-239.

Ganrot, P.O. Metabolism and possible health effect of aluminium. *Environ. Health perspect.* , **65** (1986) 363-441.

Glansdorff, P. and I. Prigogine, *Thermodynamics of structure, stability, and fluctuations.*, Wiley Interscience New-York (1971)

Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge, (eds.) in : *Free radical in biology and medecine.* Clarendon press (1985).

Halliwell, B. Free radicals and metal ions in health and disease. *Proc. Nutr. Soc.*, **46**, (1987) 13-28.

Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, **11** (1956) 298-300.

Harman, D. Free radical theory of aging: origin of life, evolution, and aging. *Age*, **3** (1980) 100-102.

Harman, D. In: H. Warner, R. Butler, R.L. Sprott and E. Schneider (eds.) *Aging* Vol. 31, Raven Press, New-York, (1987) pp. 81-92.

Harman, D. Prolongation of life: role of free radical reactions in aging. *J. Amer. Geriatrics Soc.*, **17** (1969) 721-731.

Harrison, W.H., E. Codal and R.M., Gray. Aluminium inhibition of hexokinase., *Lancet*, **277** (1972) ii.

Hayflick, L. The limited lifetime of human diploid celll strain. Exp. Cell Res., **140** (1965) 614-636.

Hayflick, L. and C.E. Finch (eds.), *Handbook of biological aging.* Van Nostrand Reinhold Company. (1977)

Hayflick, L. Theories of biological aging. *Exp. Gerontol.*, **20** (1985) 145-159.

Holliday,R. Towards a biological understanding of the ageing process. *Perspective Biol. Med.*, **32** (1988) 109-123.

Houben, A.; M., Raes; A., Houbion and J., Remacle, Alteration of enzymes in ageing human fibroblasts in culture. II. Conditions for the reversibility and the mechanism of the alteration of glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Mech. Ageing Dev.*, **25** (1984) 35-45.

Huber, C.T. and E., Friedin. The inhibition of ferroxidase by trivalent and other metal ions. *J. Biol. Chem.*, **245** (1970) 3979-3984.

Kanungo, M.S., ed. *Biochemistry of aging*, Academic Press, New-York,.(1980)

Karlik, S.J., G.L., Eichlorm, P.N., Lewis and D.R., Crapper. Interaction of aluminium species with desoxiribonucleic acid. *Biochemistry*, **19** (1980) 5991-5998.

Lehninger, A.L. and G.D., Greville. The enzymatic oxidation of α and 1-β-hydroxibutyrate. *Biochem. Biophys. Acta*, **12** (1953) 188-202.

Lione, A. The prophylactic reduction of aluminium intake. *Food Chem. Toxicol.*, **21** (1983) 103-109.

Lione, A. Aluminium toxicology and the aluminium-containing medications. *Pharmacol. Ther.*, **29** (1985) 255-284.

Lowry O. H., N. J. Rosebrought, A. L. Farr and R. J. Randall .Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** (1951) 265-275.

Luce, M. C. and C.L. Bunn. Decreased accuracy of protein synthesis in extracts from aging human diploid fibroblasts. *Exp. Gerontol.*, **24** (1989) 113-118.

Mac Gandy, R.B., C.H. Barrows, A. Meredith, J.L. Stone and A.H. Norris Nutrients intakes and energy expenditure in men of different age. *J. Gerontol.*, **21** (1966) 581-587.

Marquis, J.K. Aluminium inhibition of human serum cholinesterase. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, **31**, (1983) 164-169.

Mason, L. and C. Weinkave. Radioenzymatic assay of cathecolamines: reversal aluminium inhibition of enzymatic demethylation by desferroxamine. *Ann. Clin. Biochem.*, **20** (1983) 105-111.

Mason, R.G. and J.U. Balis Pathology of the endothelium. In : B.F. Trump and A.U. Arstila, eds, *Pathobiology of cell membranes II.* (1980) 425-472.

Michiels, C. La dégénérescence cellulaire: importance des systèmes contre les radicaux libres, (1989) Thèse doctorale, FNDP, Namur.

Michiels, C., M. Raes, E. Pigeolet, P. Corbisier, D. Lambert and J.Remacle, Importance of a threshold for error accumulation in cell degenerative processes. I. Modulation of the threshold in a model of free radical-induced cell degeneration. *Mech. Aging Devel.*, **51** (1990) 41-54.

Michiels, C., M. Raes, M.-D. Zachary, E. Delaive and J. Remacle, Microinjection of antibodies against superoxide dismutase and glutathione peroxidase. *Exp. Cell Res.*, **179** (1988) 581-589.

Michiels, C. and J. Remacle, Use of the inhibition of the antioxidant systems in order to evaluate their physiological importance. *Eur. J. Biochem.*, **177** (1988) 435-441.

Miller, C.M. and E.N., Lerine. Effect of aluminium salts on cultured neuroblastoma cells; *J. Neurochem.*, **22** (1974) 751-758.

Miquel, J., A.C. Economos, J.E. Fleming and J.E. Jr. Johnson, Mitochondrial role in cell aging. *Exp. Gerontol.*, **15** (1980) 575.

Nagorny, A.V., V.N. Nikitin, I.N. Bulankin, *Problems of aging and longevity.* State Publ. House Med. Lit. Moscow Russian. (1963)

Nicolis, G. and I.Prigogine (eds) *Self-organisation in nonequilibrium systems.* Wiley Interscience, New-York. (1977)

Ochi, T. and Miyaura, S. Cytotoxicity of an organic hydroperoxide and cellular antioxidant defense system against hydroperoxides in cultured mammalial cells. *Toxicology*, **55** (1987) 69-82.

Orgel, L.E. Ageing of clones of mammalian cells. *Nature (London)*, **243** (1973) 441-445.

Orgel, L.E. The maintenance of accurancy of protein synthesis and its relevance to aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **67** (1963) 517-521.

Parks, D. R.; V.M., Brujan; V.T., Oi and L.A., Herznberg. Antigen specific identification and cloning of hydridomas with a fluorescent activated sorter (FACS) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76** (1979) 1962-1966.

Patocka, C.E. The influence of Al+++ on cholinesterase activity; *Acta Biol. Med. Ger.*, **26** (1971) 845-846.

Price, W.J, ed. Sprectrochemical analysis by atomic absorption. Wiley Heyden Publication, New-York (1979).

Prigogine, I. *Etude thermodynamique des processus irreversibles.* Dunod, Paris and Desoer, Liège.(1946)

Raes, M., C. Michiels and J. Remacle, Comparative study of the enzymatic system against oxygen derived-free radicals: the key role of glutathione peroxidase. *J. Free Rad. Biol. Med.*, **3** (1987) 3-7.

Remacle, J., D. Lambert, O. Toussaint, C. Michiels, E. Pigeolet and M. Raes The modelisation of free radical production and elimination leads to the possibility of stable and unstable domains. Soumis pour publication.

Rodemann, H. P. Differential degradation of intracellular proteins in human skin fibroblasts of mitotic and mitomycin-C (MMC)-induced post-mitotic differentiation states *in vitro*. *Differentiation*, **42** (1989) 37-43.

Rodemann, H. P.; K., Bayreuther and G., Pfleiderer. The differentiation of normal and transformed fibroblasts *in vitro* is influenced by electromagnetic fields. *Exp. Cell Res.*, **182** (1989 **b**) 610-621.

Rodemann, H. P.; K., Bayreuther; P.I., Francz; K., Dittmann and M., Albiez. Selective enrichment and biochemical characterization of seven skin fibroblasts cell types *in vitro*. *Exp. Cell Res.*, **180** (1989) 84-92.

Segal, J. Aging: a non regulated process, *Med. Hypothesis*, **25** (1988) 197-207.

Shainkin-Kestenbaum, R., A.J. Adler, G.M., Berlyne and C., Caruso. Effect of aluminium on superoxide dismutase. *Clin. Sci.*, **77** (1989) 463-466.

Shock, N.W. and M.J. Yienst Age changes in basal respiration measurements and metabolism in males, *J. Gerontol.*, **10** (1955) 31-40.

Siegel, N. and A. Haug. Aluminium interaction with calmodulin: evidence for altered structure and fonction from optical and enzymatic studies. *Biochim. Biophys. Acta*, **744** (1983) 36-45.

Somville, M.; A., Houben; M., Raes; A., Houbion; V., Henin, and J., Remacle. Alterations of enzymes of ageing human fibroblasts in culture. III. Modification of superoxide dismutase as an environmental and reversible process. *Mech. Ageing Dev.*, **29** (1985) 35-46.

Steinweis, P.A. and A.G., Gilman. Aluminium: a requirement for activation of the regulatory component of adenylate cyclase by fluorate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79** (1982) 4888-4891.

Strehler, B.L. (ed.) *Time, cells and aging*, Academic Press, New-York (1977)

Strehler, B.L. Genetic instability as the primary cause of human aging. *Exp. Gerontol.*, **21** (1986) 283-319.

Toussaint, O. Effets des agents enzymatiques antioxydants dans les cellules endothéliales. *Memoire de fin de licence, FNDP*, Namur (1988).

Toussaint, O., A. Houbion and J. Remacle, 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 prediction on human fibroblasts in culture. *Mech. Ageing Dev.*, soumis pour publication.

Toussaint, O., M. Raes.and J. Remacle, Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. *Mech. Ageing Dev.*, Sous presse.

Zotin, A.I., R.S. Zotina and V.A. Konoplev In: A.I. Zotin and I. Lamprecht (eds). *Thermodynamics of biological processes*, De Gruyter, Berlin(1978) pp. 85-96.

BUMP
0050446648
*FM B04/1991/16