



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

La sénescence induite prématurément par le cuivre chez les fibroblastes humain WI-38 : marqueurs de la sénescence et étude préliminaire du rôle de la protéine Prion

Winant, Virginie

Award date:
2011

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.



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

Faculté des Sciences

**LA SÉNESCENCE INDUITE PRÉMATURÉMENT PAR LE CUIVRE CHEZ LES
FIBROBLASTES HUMAINS WI-38 : MARQUEURS DE LA SÉNESCENCE ET
ETUDE PRÉLIMINAIRE DU RÔLE DE LA PROTÉINE PRION**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Virginie WINANT

Janvier 2011

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

La sénescence induite prématurément par le cuivre chez les fibroblastes humains WI-38 : marqueurs de la sénescence et étude préliminaire du rôle de la protéine prion

WINANT Virginie

Résumé

Le cuivre est un métal de transition essentiel pour le développement et le maintien des cellules. Un lien entre le cuivre et la sénescence semble exister chez *Podospora anserina*. En effet, un changement de la distribution du cuivre intracellulaire a lieu durant la sénescence chez cet ascomycète. Etant donné que les mécanismes impliqués dans le métabolisme du cuivre sont hautement conservés au cours de l'évolution, le lien entre le cuivre et la sénescence a également été étudié chez les mammifères. Scheckhuber et al. ont montré qu'une augmentation de la concentration en cuivre dans le milieu de culture des fibroblastes humains diploïdes entraînait l'apparition des biomarqueurs de la sénescence. Il a également été montré que la forme cellulaire normale de la protéine prion (PrP^c) est régulée par le cuivre et surexprimée dans la sénescence répllicative et la sénescence induite prématurément par les stress (SIPS). Dans cette étude, nous avons d'abord caractérisé un modèle permettant une accumulation de cuivre à l'intérieur des fibroblastes WI-38 ainsi qu'une augmentation de l'abondance en ARNm de gènes dont l'expression dépend notamment du cuivre. Nous avons montré que le cuivre induisait la SIPS après incubation de fibroblastes WI-38 avec 500 µM de CuSO₄ pendant 16 h. Nous avons cherché par quels mécanismes la sénescence était induite et nos résultats suggèrent l'intervention d'un stress oxydatif pendant l'incubation avec le cuivre. Enfin, nous avons étudié le rôle potentiel de PrP^c dans ce modèle. Nous avons montré par une première approche préliminaire que le cuivre induit une augmentation de l'expression de PrP^c dans les fibroblastes WI-38. Nous avons ensuite utilisé un siRNA invalidant l'expression de PrP^c. Nos résultats suggèrent que PrP^c pourrait jouer un rôle « protecteur » vis-à-vis du stress oxydatif et des dommages à l'ADN. Ces données permettront peut être à l'avenir de mieux comprendre le rôle de PrP^c dans les fibroblastes WI-38.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire
Janvier 2011
Promoteur: O. Toussaint

Remerciements

Avant d'entrer dans le vif du sujet, je souhaite tout d'abord adresser mes remerciements aux personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Je tiens tout d'abord à remercier le directeur de l'URBC, Thierry Arnould, pour m'avoir permis d'intégrer cette unité de recherche. J'en profite également pour remercier dans son intégralité l'équipe des GRAS dont je faisais partie ainsi que mon promoteur, Olivier Toussaint, pour le temps qu'il a consacré ainsi que pour les conseils prodigués au cours de la réalisation de ce mémoire.

Un grand merci aux techniciens de l'URBC, pour leur compétence et leur disponibilité.

Je me dois également de remercier tout particulièrement Audrey, pour ses informations précieuses sur le siRNA NTS.

Merci également aux membres du jury de consacrer un peu de leur temps à la lecture de ce manuscrit.

Je terminerai ici en adressant mes remerciements les plus sincères à la personne sans qui la réalisation de ce mémoire n'aurait pas été possible, ma tutrice, Emmanuelle Boilan. Je la remercie de m'avoir transmis sa rigueur et son éthique scientifique ainsi que sa passion pour un travail bien fait. Je lui suis très reconnaissante pour les nombreuses heures qu'elle m'a consacrées, pour sa gentillesse et son encadrement hors pair ainsi que pour sa compréhension dans les moments les plus difficiles.

Merci à toutes et à tous !

Liste des abréviations :

Abréviation	Signification
[³ H]-thymidine	Thymidine tritiée
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ApoJ	Apolipoprotéine J
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP7A	ATPase, copper transporting, alpha polypeptide (la protéine de Menkes)
ATP7B	ATPase, copper transporting, beta polypeptide (la protéine de Wilson)
ATPase	Adénosine triphosphatase
BME	Basal medium eagle
BSA	Bovine serum albumin
CDK	Cyclin dependent kinase
CS-1	Coppersensor-1
CSS	Copper chaperone for superoxide dismutase
Ct	Threshold cycle
CTGF	Connective tissue growth factor
Ctr	Copper transporter
CuCl ₂	Chlorure de cuivre
CuSO ₄	Sulfate de cuivre
DSB	Double strand breaks
DTT	Dithiothréitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EST	Encéphalopathies spongiformes subaigües transmissibles
FBS	Fetal bovine serum
GADD	Growth arrest DNA damage
GAGs	Glycosaminoglycanes
GPI	Glycosyl-phosphatidylinositol
H ₂ DCF-DA	Dichlorodihydrofluorescéine diacétate
H ₂ O	Eau

H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HDFs	Human diploid fibroblasts
HO-1	Hème oxygénase-1
Hsp70	Protéine de choc thermique de 70 kDa
IGFBP3	Insulin-like growth factor-binding protein 3
MT2A	Métallothionéine de type II
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium
MPTP	Mitochondrial permeability transition pore
Na ₂ SO ₄	Sulfate sodium
NO [•]	Oxyde nitrique
NOS	NO synthase
NQO1	NAD(P)H déshydrogénase quinone 1
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
O ₂	Oxygène
O ₂ ^{•-}	Anion superoxyde
OH [•]	Radical hydroxyle
ONOO ⁻	Peroxynitrite
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldéhyde
PIB	Phosphatase inhibitor buffer
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
pRB	Protéine du rétinoblastome
PrP ^c	La protéine prion cellulaire
PrP ^{sc}	La protéine prion « scrapie »
PVDF	Polyvinylidène fluoride
NTS	Non-targeting smart pool
qRT-PCR	Qualitative reverse transcription-PCR
ROS	Reactive oxygen species
SA-β galactosidase	Senescence associated β-galactosidase activity
SSB	Single strand breaks
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SIPS	Sénescence induite prématurément par les stress

SOD	Superoxyde dismutase
T25	Boîte de culture de 25 cm ²
T75	Boîte de culture de 75 cm ²
TCA	Acide trichloracétique
TGF- β 1	Transforming growth factor beta-1
Trolox	acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique
Tween-20	Polyéthylène sorbitant monolaurate

Table des matières

I. Introduction	- 1 -
1. Le vieillissement	- 1 -
1.1. Les principales théories du vieillissement	- 1 -
1.1.1. La théorie de la limite de Hayflick	- 1 -
1.1.2. La théorie du raccourcissement des télomères	- 3 -
1.1.3. La théorie des radicaux libres	- 4 -
1.2. La dégénérescence de l'homéostasie des métaux au cours du vieillissement	- 5 -
2. Le cuivre	- 7 -
2.1. Le cuivre, un élément essentiel	- 7 -
2.2. Métabolisme et transport du cuivre	- 7 -
2.2.1. Le rôle de la protéine Ctr1	- 7 -
2.2.2. Le rôle des protéines chaperonnes	- 8 -
2.2.3. Le rôle des métallothionéines	- 8 -
2.2.4. Le rôle d'Hsp70	- 9 -
2.3. Le cuivre et la génération d'un stress oxydatif	- 9 -
2.4. Le cuivre et la sénescence	- 10 -
3. La protéine prion	- 11 -
3.1. Généralités	- 11 -
3.2. Les deux isoformes de la protéine prion	- 12 -
3.2.1. La protéine PrP ^c	- 12 -
3.2.2. La protéine PrP ^{sc}	- 14 -
3.3. La conversion de PrP ^c en PrP ^{sc}	- 14 -
3.3.1. Modèles proposés	- 14 -
3.3.2. La localisation cellulaire de la conversion de PrP ^c en PrP ^{sc}	- 15 -
3.3.3. Les partenaires intervenant dans la conversion de PrP ^c en PrP ^{sc}	- 15 -
3.4. PrP ^c et le cuivre	- 16 -
3.5. Implication de PrP ^c dans le vieillissement.	- 17 -
4. Objectifs	- 18 -
II. Matériel et Méthodes	- 20 -
1. Conditions de culture des fibroblastes WI-38	- 20 -
1.1. Matériel	- 20 -
1.2. Méthode	- 20 -
1.2.1. Maintien de la culture	- 20 -
1.2.2. Pour les expériences	- 20 -
2. Incubation des fibroblastes WI-38 avec du CuSO ₄	- 21 -

2.1. Matériel	- 21 -
2.2. Méthode	- 21 -
3. Incubation des fibroblastes WI-38 avec du Trolox	- 21 -
3.1. Principe	- 21 -
3.2. Matériel	- 21 -
3.3. Méthode	- 21 -
4. Test de viabilité cellulaire (MTT assay)	- 21 -
4.1. Principe	- 21 -
4.2. Matériel	- 22 -
4.3. Méthode	- 22 -
5. Western-blot	- 22 -
5.1. Principe	- 22 -
5.2. Extraction protéique totale	- 22 -
5.2.1. Matériel	- 22 -
5.2.2. Méthode	- 22 -
5.3. Extraction protéique nucléaire.....	- 23 -
5.3.1. Matériel	- 23 -
5.3.2. Méthode	- 23 -
5.4. Dosage protéique par la méthode de Pierce	- 23 -
5.4.1. Matériel	- 23 -
5.4.2. Méthode	- 23 -
5.5. Western-blot NuPAGE	- 24 -
5.5.1. Préparation des extraits.....	- 24 -
5.5.2. Migration	- 24 -
5.5.3. Transfert	- 24 -
5.5.4. Traitement de la membrane et système de révélation	- 25 -
6. Immunofluorescence	- 25 -
6.1. Principe	- 25 -
6.2. Matériel	- 25 -
6.3. Méthode	- 25 -
7. RT-PCR quantitative en temps réel	- 26 -
7.1. Principe	- 26 -
7.2. Extraction d'ARN	- 27 -
7.2.1. Matériel	- 27 -
7.2.2. Méthode	- 27 -
7.3. Dosage de l'ARN	- 27 -

7.3.1. Matériel	- 27 -
7.3.2. Méthode	- 27 -
7.4. Transcription inverse	- 28 -
7.4.1. Principe	- 28 -
7.4.2. Matériel	- 28 -
7.4.3. Méthode	- 28 -
7.5. qRT-PCR en temps réel	- 28 -
7.5.1. Matériel	- 28 -
7.5.2. Méthode	- 28 -
7.6. Analyse des résultats	- 29 -
8. Transfection de siRNA	- 29 -
8.1. Principe	- 29 -
8.2. Matériel	- 29 -
8.3. Méthode	- 29 -
9. Analyse des biomarqueurs de la sénescence	- 29 -
9.1. Activité SA- β galactosidase	- 29 -
9.1.1. Principe	- 29 -
9.1.2. Matériel	- 29 -
9.1.3. Méthode	- 29 -
9.2. Incorporation de thymidine tritiée	- 30 -
9.2.1. Principe	- 30 -
9.2.2. Matériel	- 30 -
9.2.3. Méthode	- 30 -
10. Mesure de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS)	- 30 -
10.1. Principe	- 30 -
10.2. Matériel	- 30 -
10.3. Méthode	- 31 -
11. Sonde Coppersensor 1 (CS1)	- 31 -
11.1. Principe	- 31 -
11.2. Matériel	- 31 -
11.3. Méthode	- 31 -
III. Résultats	- 32 -
1. Caractérisation du modèle expérimental	- 32 -
1.1. Mises au point techniques du modèle expérimental	- 32 -
1.2. Evaluation de la viabilité cellulaire des fibroblastes WI-38	- 33 -

1.3. Etude de l'impact de l'incubation avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h sur le niveau intracellulaire de cuivre dans les fibroblastes WI-38	- 33 -
1.3.1. Dosage du cuivre dans des fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4	- 33 -
1.3.2. Détection du cuivre dans des fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h	- 33 -
1.3.3. Modification de l'expression des gènes dont l'expression dépend du cuivre dans des fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4	- 33 -
2. Etude de l'apparition des biomarqueurs de la sénescence à 72 h après une incubation de 16 h avec 500 μM de CuSO_4	- 36 -
2.1. Modèle de sénescence induite par le cuivre	- 36 -
2.2. La morphologie cellulaire	- 36 -
2.3. La prolifération cellulaire	- 36 -
2.4. L'activité β -galactosidase associée à la sénescence	- 37 -
2.5. Modifications dans l'expression de certains gènes liés à la sénescence	- 37 -
3. Etude du stress oxydatif et des dommages à l'ADN induits par le cuivre chez des fibroblastes WI-38	- 38 -
3.1. Mesure de la génération d'un stress oxydatif chez les fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 μM de CuSO_4 à l'aide d'une sonde fluorescente	- 38 -
3.2. Etude de la réponse antioxydante des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h	- 39 -
3.2.1. Analyse de l'abondance relative de l'ARNm des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif chez des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h	- 39 -
3.2.2. Etude de l'abondance protéique de HO-1, Nrf2 et NQO1 par marquage en immunofluorescence dans des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h	- 39 -
3.3. Etude de l'arrêt de prolifération lié aux dommages à l'ADN chez des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h	- 40 -
3.3.1. Analyse de l'abondance relative de l'ARNm de gènes impliqués dans l'arrêt de prolifération lié aux dommages à l'ADN	- 40 -
3.4. Effet d'un antioxydant dans des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h	- 40 -
3.4.1. Mesure de la génération d'un stress oxydatif chez des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 μM de CuSO_4 et/ou avec un antioxydant à l'aide d'une sonde fluorescente	- 40 -

3.4.2. Analyse de l'abondance relative de l'ARNm des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif chez des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 µM de CuSO ₄ et/ou avec un antioxydant pendant 16 h	41 -
3.4.3. Analyse de l'abondance relative de l'ARNm de certains gènes liés à la sénescence chez des fibroblastes WI-38 à 72 h après l'incubation ou non avec 500 µM de CuSO ₄ et/ou avec un antioxydant pendant 16 h	41 -
3.5. Effet du Trolox dans des fibroblastes WI-38 à 24 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 µM de CuSO ₄ pendant 16 h	42 -
3.5.1. Mesure de la génération d'un stress oxydatif dans des fibroblastes WI-38 à 24 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 µM de CuSO ₄ et/ou avec le Trolox	42 -
3.5.2. Evaluation de la viabilité cellulaire des fibroblastes WI-38 incubés pendant 16 h avec 500 µM de CuSO ₄ et/ou avec le Trolox	43 -
4. Etude du rôle de la protéine prion dans les mécanismes de la sénescence induite prématurément par le cuivre	44 -
4.1. Le cuivre induit une augmentation de l'expression de PrP ^c dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 µM de CuSO ₄ pendant 16 h à travers un stress oxydatif	44 -
4.1.1. Analyse de l'abondance relative de l'ARNm de PrP ^c dans des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 µM de CuSO ₄ pendant différents temps d'incubation	44 -
4.1.2. Etude de l'abondance protéique de PrP ^c par marquage en immunofluorescence dans des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 µM de CuSO ₄ pendant 16 h	44 -
4.1.3. Etude de l'abondance protéique de PrP ^c par Western-blot dans des fibroblastes ou non avec 500 µM de CuSO ₄ pendant 16 h	45 -
4.2. Etude du rôle de PrP ^c dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence induite pas le cuivre via l'utilisation de siRNA.	45 -
4.2.1. Mise au point des siRNA invalidant l'expression de PrP ^c	45 -
4.2.2. Effet de l'invalidation de PrP ^c sur les mécanismes de SIPS	47 -
IV. Discussion et perspectives	50 -
1. Accumulation de cuivre dans les fibroblastes WI-38 ainsi qu'une modification de l'abondance de l'ARNm de gènes qui dépendent notamment du cuivre	50 -
2. Le cuivre induit l'apparition des biomarqueurs de la sénescence dans les fibroblastes WI-38	50 -
3. Le cuivre génère un stress oxydatif et des dommages à l'ADN, ceux-ci jouant peut-être un rôle dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence	51 -
3.1. Le cuivre induit la génération d'un stress oxydatif dans les fibroblastes WI-38	51 -
3.2. Le cuivre génère des dommages à l'ADN dans les fibroblastes WI-38	52 -

4. La protéine prion pourrait jouer un rôle dans les mécanismes de la sénescence induite prématurément par le cuivre	- 53 -
4.1. Le cuivre induit une augmentation de l'expression de PrP ^c dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 µM de CuSO ₄ pendant 16 h	- 53 -
4.2. L'invalidation de PrP ^c semble provoquer l'apparition des biomarqueurs de la sénescence dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 µM de CuSO ₄ pendant 16 h	- 54 -

I. Introduction

1. Le vieillissement

Le vieillissement est un processus inévitable et complexe, faisant intervenir bon nombre de changements. Malgré le fait que le vieillissement semble être une caractéristique commune à tout être vivant, des différences existent entre les espèces, soulevant l'idée que certains facteurs vont pouvoir influencer le vieillissement, incluant le génotype et l'environnement [1].

Ces dernières années ont vu l'accomplissement de grands progrès dans la compréhension des mécanismes de régulation de la sénescence cellulaire et de son fonctionnement. Cependant, l'éternelle question demeure immuable depuis bien des années, même si de plus en plus de théories viennent étoffer ce grand mystère : quelles sont les causes du vieillissement ?

Nous allons tout d'abord introduire différentes théories qui vont tenter de répondre à cette question fondamentale, en tenant compte des progrès réalisés dans le domaine de la sénescence cellulaire.

1.1. Les principales théories du vieillissement

1.1.1. La théorie de la limite de Hayflick

1.1.1.1. Généralités

L'impossibilité des cellules normales (non cancéreuses) à proliférer de manière infinie a été observée pour la première fois par Leonard Hayflick et Paul Moorhead en 1961. Ils ont observé que les fibroblastes humains diploïdes (HDFs) étaient capables de subir un nombre fini de divisions cellulaires en culture, ce qu'on appelle à présent « la limite de Hayflick », avant d'entrer dans un état d'arrêt prolifératif irréversible [2]. Ils ont divisé la durée de vie des cellules en culture en trois phases (**Figure 1**), dénommées respectivement phase I (culture primaire), phase II (croissance rapide qui va ralentir de plus en plus) et phase III (sénescence) avant d'entrer en dégénérescence. Après la mise en culture des cellules à partir de l'explant, les cellules vont coloniser toute la surface de la boîte de culture (phase I). Les cellules prolifèrent ensuite à un taux constant et rapide (phase II). Toutefois, après un certain nombre de divisions cellulaires, un déclin lent et progressif de la vitesse de croissance s'observe et certains changements moléculaires commencent à apparaître (phase III). La sénescence répliquative est caractérisée par une diminution du taux de mitoses pour finalement aboutir à un arrêt irréversible des divisions cellulaires.

Il restait à savoir si cette sénescence répliquative observée *in vitro* affectait également les cellules *in vivo*. Une étude réalisée en 1976 sur des fibroblastes de peau issus de donneurs d'âges différents a montré l'existence d'une corrélation inverse entre l'âge du donneur et le potentiel répliquatif des fibroblastes en culture, même si cette corrélation était relativement faible [3]. A l'inverse, certaines observations ont donné à penser que ce n'était pas le cas, notamment les résultats de l'étude plus récente réalisée par l'équipe de Vincent Cristofalo [4]. Ils ont étudié 124 souches cellulaires établies à partir de fibroblastes de peau issus de donneurs d'âges très différents. Aucune corrélation significative entre le potentiel prolifératif de ces souches cellulaires et l'âge du donneur n'a pu être confirmée.

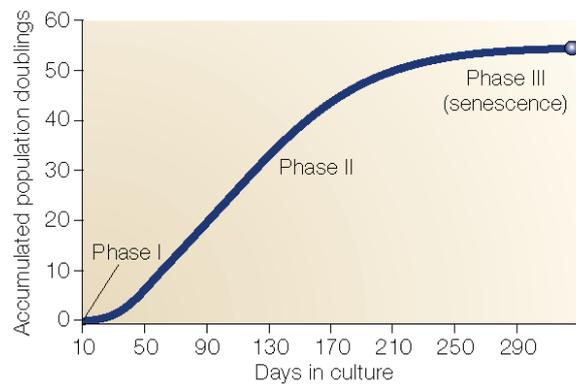


Figure 1: Les trois phases de la durée de vie des cellules en culture selon Hayflick ¹. La phase I représente la culture primaire où les cellules vont coloniser toute la surface de la boîte de culture. La phase II est une phase de croissance rapide et exponentielle, qui finira par ralentir de plus en plus pour aboutir à la phase III, la phase de sénescence où un déclin progressif de la vitesse de croissance s’observe.

¹ Jerry W. Shay et Woodring E. Wright, “Hayflick, his limit, and cellular ageing,” *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, n°. 1 (Octobre 2000): 72-76.

Il faut savoir que la sénescence répliquative peut être caractérisée par différents biomarqueurs, comprenant entre autres la morphologie élargie et étendue typique de la sénescence [5][6], l'apparition de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence (Senescence Associated β -galactosidase activity) [7], des changements dans le niveau d'expression de certains gènes [8], l'arrêt de prolifération cellulaire [2], des modifications d'abondance de certaines protéines [9] ainsi qu'une délétion typique de 4,997 paires de bases de l'ADN mitochondrial [10][11]. Nous allons maintenant décrire brièvement ces biomarqueurs.

1.1.1.2. Les biomarqueurs de la sénescence

La sénescence se caractérise par de profondes modifications cytomorphologiques : aplatissement des cellules, vacuolisation du cytoplasme, le volume du noyau est augmenté et on observe des altérations chromatiniennes [12].

L'équipe de Judith Campisi a mis en évidence que la β -galactosidase possédait une activité maximum à pH 6 qui s'exprimerait lors de la sénescence, à la fois *in vitro* et *in vivo* [7]. La β -galactosidase est une hydrolase qui possède en temps normal une activité optimale à pH 4. En ajoutant un substrat chromogène à des cellules en culture, du X-gal, les cellules sénescents se colorent en bleu après clivage à pH 6. Ceci s'explique par la taille des lysosomes qui augmentent avec le vieillissement *in vitro*. La β -galactosidase va s'accumuler et pouvoir être détectée dans une gamme de pH différente des cellules jeunes, ce qui en fait un marqueur privilégié [13].

On observe également une augmentation de l'abondance en ARNm de différents gènes, comme les gènes qui codent pour la fibronectine, l'ostéonectine ou l'apolipoprotéine J par exemple [14]. La fibronectine est un composant essentiel de la matrice extracellulaire qui participe à l'adhésion cellulaire, à l'organisation du cytosquelette [6]. L'ostéonectine est une protéine liant le calcium associée avec la matrice extracellulaire. Elle permet le changement de forme cellulaire, empêche la progression du cycle cellulaire en inhibant son entrée dans la phase S [15] et influence la synthèse de la matrice extracellulaire [14]. L'apolipoprotéine J est une protéine extracellulaire possédant une activité « chaperone-like » similaire à celle des petites protéines « de choc thermique » [16]. Des changements dans le niveau d'expression de certains membres de la famille des *insulin-like growth factor binding proteins* (IGFBP), de p16, p53 et de p21^{WAF-1} par exemple sont également observés [12]. Pour rappel, les membres de la famille des IGFBP jouent le rôle de transporteur pour les facteurs de croissance apparentés à l'insuline tandis que p16 et p21^{WAF-1} sont des inhibiteurs du cycle cellulaire qui peuvent inhiber les complexes cyclines D/Cdk4 et Cdk2/Cycline E-A. L'inhibition de ces complexes va entraîner une diminution de la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb) qui va bloquer la répliquative de l'ADN et entraîner un arrêt du cycle cellulaire. L'expression de p21^{WAF-1} est induite par p53, un facteur de transcription capable d'activer la transcription du gène de p21^{Waf-1} [17].

Le blocage de l'initiation de la phase S par p16, p53 et p21^{WAF-1} [18] et donc de l'arrêt du cycle cellulaire est mis en évidence par incorporation de thymidine tritiée. La cellule va incorporer dans son ADN de la thymidine dont un hydrogène est remplacé par un atome de tritium. Son incorporation dans les cellules peut être évaluée par détection de la radioactivité, et une cellule qui ne duplique pas son ADN n'incorpore pas de thymidine.

La limite de Hayflick peut contribuer au vieillissement général de l'organisme par l'accumulation de cellules sénescents qui ne peuvent plus se diviser dans les tissus. La sénescence répliquative, caractérisée par de nombreux biomarqueurs, apparaît donc après un

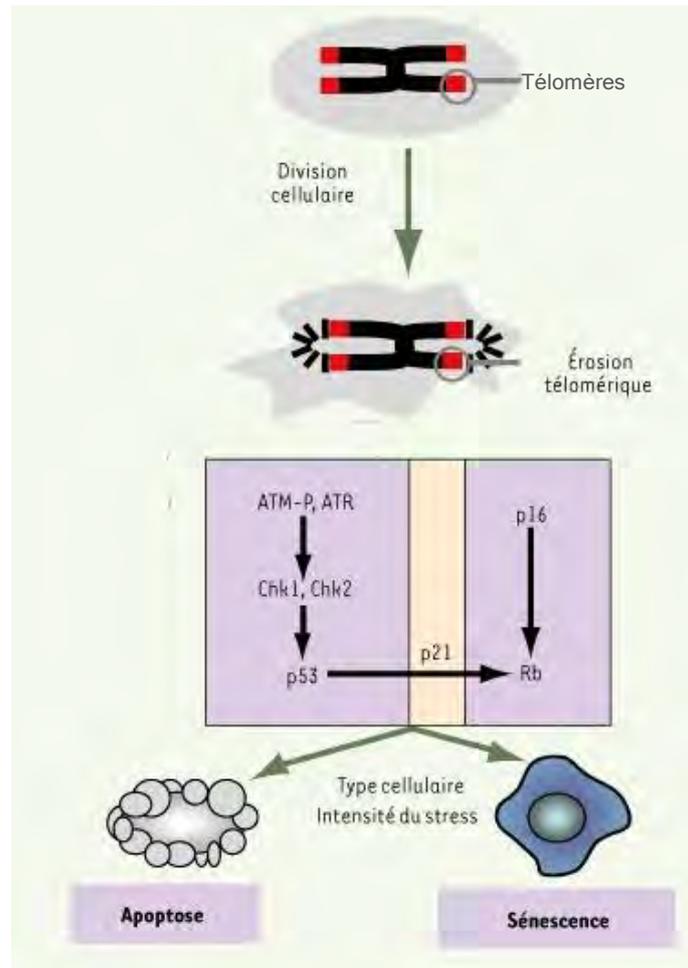


Figure 2 : Le dysfonctionnement des télomères comme déclencheur de l'apoptose ou de la sénescence répllicative². En fonction du type cellulaire ou du degré de dysfonctionnement des télomères dû à leur raccourcissement à une longueur critique, la cellule va entrer soit en apoptose soit en sénescence répllicative. P53 joue un rôle crucial : il peut 1) soit déclencher l'apoptose via l'expression du gène Bax qui va permettre la libération du cytochrome c de la mitochondrie 2) soit déclencher la sénescence répllicative en induisant l'expression de p21^{WAF-1}.

² Arturo Londoño-Vallejo, Christelle Lenain, et Eric Gilson, "[Targeting telomeres to enforce cancer cells to senescence]," *Médecine Sciences: M/S* 24, n°. 4 (Avril 2008): 383-389.

nombre fini de divisions cellulaires. C'est un peu comme si les cellules avaient la capacité de compter le nombre de divisions qu'elles ont effectuées grâce à un « réplicomètre », terme proposé par Hayflick, qui n'est rien d'autre qu'un « compteur cellulaire » spécialisé. Ce n'est que bien des années plus tard que le rôle des télomères a été mis en évidence dans le déclenchement de la sénescence répliquative [19] et qu'on a pu mettre un nom sur ce mécanisme.

1.1.2. La théorie du raccourcissement des télomères

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques linéaires répétées se trouvant aux extrémités des chromosomes des cellules eucaryotes. Dans les cellules humaines, ils sont constitués de répétitions multiples d'une séquence de paires de bases particulière : TTAGGG [6]. Ils sont indispensables à la réplication de l'ADN et permettent de maintenir l'intégrité des chromosomes, en empêchant leur dégradation ainsi que la fusion entre les chromosomes pendant la réplication. Dans les cellules somatiques humaines qui ne possèdent pas de télomérase active, l'enzyme responsable de la synthèse *de novo* des répétitions télomériques, les télomères se raccourcissent de 30 à 200 paires de bases à chaque division cellulaire [20]. La plupart des cellules humaines primaires n'expriment pas de la télomérase et subissent dès lors une érosion progressive des télomères à chaque division cellulaire [19]. Ce raccourcissement est dû à l'incapacité intrinsèque de la machinerie de réplication à copier les extrémités de molécules linéaires. Lorsque les télomères sont raccourcis à une longueur critique de 4 à 7 kb, ils sont considérés par la cellule comme de l'ADN endommagé, ce qui va mener la cellule soit à l'apoptose, soit à la sénescence répliquative (**Figure 2**).

Dans le premier cas, le facteur de transcription p53 peut induire l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose et conduire à la mort cellulaire. Il va activer entre autres l'expression du gène Bax qui va permettre la libération de cytochrome c de la mitochondrie et déclencher la voie apoptotique. Dans le cas où la sénescence répliquative est enclenchée, on observe alors un arrêt irréversible du cycle cellulaire au niveau du point de contrôle G1/S. p53 va induire l'expression de p21^{WAF-1} qui va inhiber les complexes Cycline D/Cdk4 et Cdk2/Cycline E-A, qui vont arrêter le cycle cellulaire [20].

L'hypothèse selon laquelle les télomères permettraient de compter le nombre de divisions cellulaires ayant eu lieu, et au moment opportun, décider d'arrêter la machine et de déclencher la sénescence répliquative a été confirmée par Bodnar et al. [6]. Ces auteurs ont empêché le raccourcissement des télomères en transfectant et en exprimant de manière stable la sous-unité catalytique de la télomérase dans des HDFs, ce qui a entraîné une immortalisation des cellules.

Il a été montré que le raccourcissement des télomères ne refléterait pas seulement l'historique prolifératif d'une cellule, mais aussi l'accumulation de dommages oxydants. En effet, le stress oxydatif peut accélérer le raccourcissement des télomères et donc influencer le déclenchement de la sénescence répliquative [21]. Ceci nous amène à nous pencher sur la théorie des radicaux libres proposée par Denham Harman qui énonce que le vieillissement physiologique résulte de dommages délétères aléatoires occasionnés par le stress oxydatif, et en particulier par les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS en anglais, pour Reactive Oxygen Species) produits durant le métabolisme aérobie normal, sur les tissus de l'organisme [6].

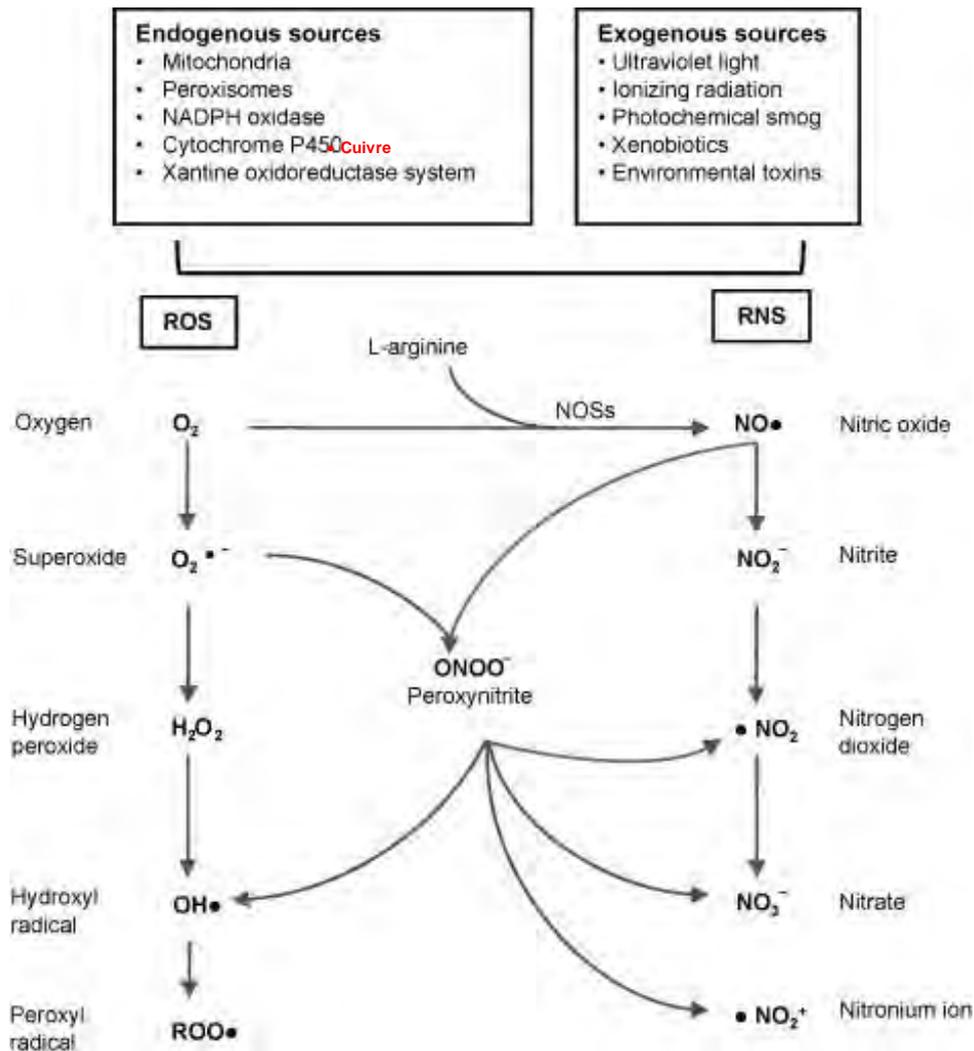


Figure 3 : Aperçu des différents ROS impliqués dans les dommages aux différents composants cellulaires³. Les ROS peuvent provenir de différentes sources, comme la mitochondrie, les enzymes cytochrome P450, les peroxysomes (sources endogènes) ou bien provenir de sources extérieures, comme le cuivre et les UV par exemple (sources exogènes). Ces ROS peuvent causer des dommages oxydatifs. L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) produit par la chaîne respiratoire de la mitochondrie à partir d'oxygène (O_2) peut réagir avec l'oxyde nitrique (NO^{\bullet}) via la NO synthase (NOS) pour former du peroxonitrique ($ONOO^-$), un ROS hautement réactif. $O_2^{\bullet -}$ peut également être transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) via la superoxyde dismutase. La réaction Fenton va dégrader le H_2O_2 et former le radical hydroxyle (OH^{\bullet}).

³ Francesca Mangialasche et al., "Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment," *Ageing Research Reviews* 8, n°. 4 (Octobre 2009): 285-305.

1.1.3. La théorie des radicaux libres

Selon cette théorie, les ROS auraient donc un rôle important à jouer dans la sénescence. Il existe deux sources principales de ROS, les sources endogènes et les sources exogènes (**Figure 3**) [22].

La chaîne respiratoire de la mitochondrie est responsable de la production de la plupart des ROS et produit en particulier l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) qui est libéré dans la matrice mitochondriale ainsi que dans l'espace intermembranaire. La mitochondrie est aussi impliquée dans la génération d'oxyde nitrique (NO^{\cdot}) via la NO synthase. $O_2^{\cdot-}$ peut réagir avec NO^{\cdot} pour former du peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$), un ROS très réactif [23].

Les ROS provenant des sources non mitochondriales sont produits notamment par la réaction de Fenton, par la β -oxydation des acides gras dans les peroxysomes ou par les cytochromes P450 microsomaux [24]. La réaction de Fenton dégrade le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et forme le radical hydroxyle (OH^{\cdot}). Les microsomes contiennent des enzymes cytochrome P450 catalysant l'oxydation ou la réduction de xénobiotiques, en produisant simultanément $O_2^{\cdot-}$. Quant à la β -oxydation des acides gras dans les peroxysomes, elle génère du H_2O_2 . Les peroxysomes contiennent une catalase qui peut dégrader le H_2O_2 en eau (H_2O) et empêcher l'accumulation de ce composé très réactionnel.

Tous ces processus peuvent causer des dommages oxydatifs en fonction principalement de la concentration à laquelle ils sont présents et des défenses antioxydantes de la cellule mais peuvent également participer à de nombreux processus physiologiques. Les ROS jouent donc également un rôle non délétère non négligeable. La régulation redox impliquant les ROS est donc cruciale pour moduler des fonctions cellulaires critiques, par exemple la cascade des MAP kinases, le transport ionique, la mobilisation du calcium ou encore le programme de mort cellulaire programmée [23].

Le stress oxydatif est généralement considéré comme un déséquilibre entre la génération et l'élimination de radicaux libres. Lorsque le stress oxydatif se déclare, la cellule réagit pour contrecarrer l'effet oxydant et restaurer l'équilibre de la balance redox [23].

Les organismes ont mis en place plusieurs mécanismes protecteurs antioxydants afin de se protéger contre l'agression des radicaux libres, réduisant ainsi la production de ROS. Ces mécanismes ne sont pas parfaits : des ROS échappent à ces mécanismes protecteurs et peuvent endommager certaines molécules cellulaires comme les lipides, les protéines ou les acides nucléiques [25]. Différentes protéines sont associées à la réponse contre le stress oxydatif (**Figure 4**), comme le facteur de transcription Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2), NQO1 (NAD(P)H déshydrogénase quinone 1) ou HO-1 (l'hème oxygénase-1). Nrf2 est un facteur de transcription nucléaire [26] qui contrôle l'expression de gènes codant pour des enzymes de détoxification comme HO-1 et NQO1. NQO1 empêche la réduction des électrons des quinines [27]. HO-1 est une isoforme de l'hème oxygénase qui dégrade l'hème et produit des quantités équimolaires de monoxyde de carbone, biliverdine et fer. HO-1 est une isozyme ubiquiste, exprimée de façon basale dans la plupart des cellules et tissus, et inductible. Elle peut être induite par un stress oxydatif (par les UV ou directement par des ROS par exemple) et est donc indirectement un indicateur de stress oxydatif. HO-1 est un antioxydant puissant, notamment via sa capacité à diminuer l'activité de la NAD(P)H oxydase, un complexe multiprotéique de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale qui produit massivement des anions $O_2^{\cdot-}$ [28].

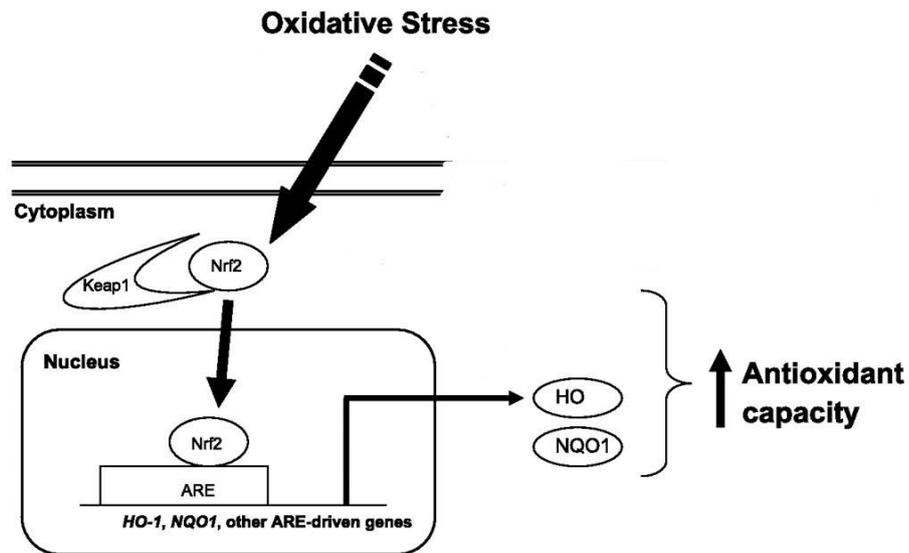


Figure 4 : Mécanismes protecteurs antioxydants contre l'agression des ROS⁴. Un stress oxydatif important va entraîner une accumulation nucléaire du facteur de transcription Nrf2 qui va favoriser la transcription des gènes codant pour des enzymes de détoxification, comme HO-1 et NQO1.

⁴ Chi-Chen Hong et al., "Genetic Variability in Iron-Related Oxidative Stress Pathways (Nrf2, NQO1, NOS3, and HO-1), Iron Intake, and Risk of Postmenopausal Breast Cancer," *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 16, n° 9 (2007): 1784 -1794.

Nous avons vu que le raccourcissement des télomères ne reflétait non seulement l'historique prolifératif d'une cellule mais aussi l'accumulation de dommages oxydants. L'équipe de Von Zglinicki a d'ailleurs observé que la vitesse de raccourcissement des télomères chez les fibroblastes humains n'était pas constante, mais pouvait être accélérée par un stress oxydatif [20]. Les dommages oxydatifs peuvent être « mesurés » en évaluant la formation de 8-oxo-2'-deoxyguanosine dans l'ADN. En effet, les radicaux hydroxyles peuvent attaquer l'ADN et entraîner la formation de 8-oxo-2'-deoxyguanosine. L'équipe de M. Chen a par exemple montré que les cellules sénescents contenaient 30% de plus de ce composé, comparé à des cellules normales [18]. Les cellules sénescents accumuleraient donc des dommages oxydatifs dans l'ADN [29]. Les radicaux libres vont générer des cassures simple brin dans l'ADN et cette accumulation de « single-strand breaks » (SSB) est due à une déficience dans les dernières étapes des mécanismes d'excision de paires de bases. La nucléase S1 va couper ces SSB et donc accélérer la vitesse de raccourcissement des télomères, en générant des cassures double brin (« double-strand breaks »). Il est intéressant de noter que l'histone H2AX est phosphorylé lors de cassures doubles brins [30].

Plusieurs études ont montré que différents stress pouvaient induire le phénotype sénescents ainsi que les biomarqueurs associés, ce qui a été regroupé sous le nom de sénescence induite prématurément par les stress (SIPS) [8]. Un grand nombre de types cellulaires prolifératifs (mélanocytes, cellules endothéliales, fibroblastes diploïdes de poumons ou de peau, ...) exposés à des stress oxydatifs peuvent entrer en SIPS [19].

De nombreux travaux ont également montré que le stress oxydatif est impliqué dans l'apparition de maladies liées au vieillissement, comme les maladies neurodégénératives et en particulier la maladie d'Alzheimer (ce qui sera discuté dans la partie 2.4). Ces maladies sont généralement associées avec une modification de l'homéostasie des métaux dans le cerveau, comme le fer et le cuivre, suggérant un rôle important de ces métaux dans ces maladies [31].

1.2. La dégénérescence de l'homéostasie des métaux au cours du vieillissement

Plusieurs études ont montré que différents métaux avaient tendance à s'accumuler au cours du vieillissement, notamment le fer et le cuivre.

Paolo Zatta et al. ont mis en évidence l'accumulation d'ions métalliques, dont le cuivre, dans le cerveau de bovins âgés de 8 à 12 ans [32]. Dans une étude très récente de 2010, l'équipe de Sathyanarayan Rao a évalué les niveaux de cuivre et de fer dans différentes régions du cerveau chez des individus répartis dans trois groupes d'âges différents, allant d'environ 40 ans à plus de 61 ans. Ces niveaux de cuivre et de fer étaient beaucoup plus importants dans le groupe d'âge le plus élevé, indiquant la présence de changements dans l'homéostasie de ces métaux dans le cerveau des individus plus âgés [33].

Dans des études précédentes en collaboration avec notre laboratoire, l'équipe de H.D. Osiewacz a mis en évidence un lien entre l'homéostasie du cuivre et la sénescence chez *Podospora anserina* et chez les fibroblastes diploïdes humains [34]. Dans des cultures âgées de *Podospora anserina*, différents changements phénotypiques ont lieu, et ceux-ci sont regroupés sous le nom de « syndrome sénescents » [35]. Cette particularité fait de cet ascomycète un organisme modèle pour étudier les mécanismes de la sénescence cellulaire.

L'équipe de H.D. Osiewacz a démontré dans un premier temps qu'une diminution de la concentration en cuivre dans le milieu de culture de *Podospora anserina* était corrélée avec une augmentation de sa durée de vie et dans un second temps, qu'un changement dans la

distribution intracellulaire du cuivre s'observait chez *Podospora anserina* durant la sénescence. A cela s'ajoute une augmentation des transcrits des gènes qui régulent la concentration en cuivre dans les cultures sénescents de ce champignon. Les auteurs supposent qu'il y aurait une libération de cuivre de la mitochondrie qui serait responsable de l'augmentation des niveaux de cuivre dans le cytoplasme des cultures sénescents. Cette libération serait corrélée à un changement morphologique de la mitochondrie, qui passerait d'un état filamenteux à un état « interrompu », suite à la création de pores MPTP (mitochondrial permeability transition pore). Les protéines et les mécanismes impliqués dans le métabolisme de traitement du cuivre sont extrêmement conservés à travers l'évolution [32].

De ce fait, ce lien semblerait également exister chez les mammifères. Les auteurs de cet article en collaboration avec notre laboratoire ont également étudié le rôle potentiel de l'homéostasie du cuivre sur le vieillissement chez les fibroblastes diploïdes de poumon et de peau. Ils ont démontré qu'une augmentation de cuivre dans le milieu de culture de ces fibroblastes entraînait une augmentation de l'expression des gènes régulés par le cuivre dans les cellules en sénescence répllicative et en SIPS, suggérant que les concentrations en cuivre augmentent durant la sénescence. Nous allons maintenant nous intéresser plus particulièrement au cuivre.

2. Le cuivre

2.1. Le cuivre, un élément essentiel

Le cuivre est un élément essentiel pour le développement et le maintien des cellules. Cet oligo-élément possède deux états d'oxydation, Cu^+ et Cu^{2+} , le second constituant la forme la plus stable [36]. Il joue un rôle important dans le cycle catalytique de plusieurs enzymes grâce à sa capacité à changer d'état d'oxydation. En effet, le cuivre est un cofacteur important de bon nombre d'enzymes, comme la lysyl oxydase permettant la liaison interfibrillaire d'élastine et de collagène, la cytochrome c oxydase, une enzyme produisant de l'énergie dans la chaîne de transport d'électrons mitochondriale ou encore la superoxyde dismutase (SOD), une enzyme catalysant la transformation de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en O_2 et H_2O_2 [37]. Le cuivre est donc nécessaire à la vie cellulaire et son métabolisme doit être finement régulé.

2.2. Métabolisme et transport du cuivre

Chez les mammifères, le cuivre est absorbé dans le tractus gastro-intestinal et est transporté dans le sérum, lié à l'albumine et l' α -céruleplasminine avant d'être distribué à tous les tissus de l'organisme [38]. A peu près 90% du cuivre que l'on retrouve dans le sang est lié de manière covalente à la céruleplasminine, tandis qu'à peine 10% est lié faiblement à l'albumine. Cette petite fraction de cuivre lié faiblement est dénommée « cuivre libre ». Le cuivre qui participe à la génération de ROS est le « cuivre libre » [39]. C'est pourquoi une fois à l'intérieur de la cellule, l'homéostasie du cuivre doit être finement régulée pour éviter la formation de radicaux hydroxyles. Cette régulation a déjà lieu dès l'entrée du cuivre dans la cellule, à travers des protéines spécifiques qui transportent le cuivre, les protéines Ctr.

2.2.1. Le rôle de la protéine Ctr1

Le transport du cuivre du milieu extracellulaire à l'intérieur de la cellule dépend d'une famille de protéines spécifiques qui possèdent une très grande affinité pour le cuivre (Ctr en anglais, pour Cu transporter protéine). Ces protéines (Ctr1, Ctr2 et Ctr3) ont d'abord été découvertes dans la levure et ont été caractérisées ensuite chez les mammifères (notamment dans les fibroblastes). Il s'est avéré que Ctr2 n'est pas exclusivement impliquée dans le transport du cuivre mais peu de choses sont connues à ce jour quant au rôle joué par ces protéines. Quant aux fonctions de Ctr1 et Ctr3, elles sont redondantes malgré le fait qu'elles possèdent peu d'homologie dans leur séquence primaire [40].

Ctr1 est localisée en membrane plasmique et dans les vésicules intracellulaires et possède trois domaines transmembranaires, une région N-terminale riche en méthionines ainsi qu'un domaine C-terminal riche en cystéines et histidines localisé dans le cytoplasme [40]. La distribution de Ctr1 entre ces deux compartiments dépend du type cellulaire. Dans le foie, les reins, le placenta et la glande mammaire, la localisation prédominante de Ctr1 est la membrane plasmique tandis que dans les intestins, Ctr1 est plutôt localisée dans les vésicules, à proximité de la membrane apicale [41].

Ctr1 va capter les ions Cu^{2+} de l'espace extracellulaire pour les amener à l'intérieur de la cellule sous forme d'ions Cu^+ sans nécessiter d'ATP, probablement suite à la présence d'une Cu réductase à la surface cellulaire [42]. Ce transport est dynamique et est notamment stimulé par un pH acide extracellulaire, une forte concentration en ions K^+ et une élévation de la quantité de Cu^{2+} extracellulaire [43].

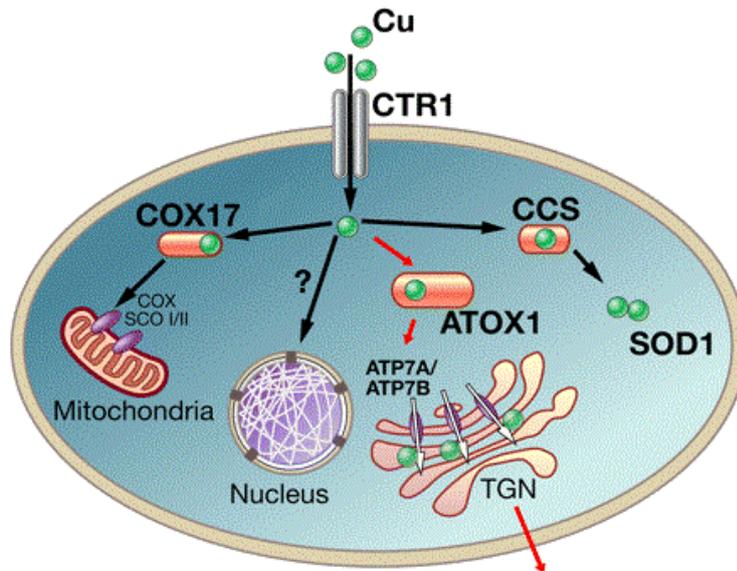


Figure 5 : Transport du cuivre à l'intérieur des cellules⁵. Les ions Cu^+ sont acheminés vers les différentes cuproenzymes grâce à trois systèmes de métallochaperones cytoplasmiques : Atox1, Cox17 et CCS. Atox1 permet de transporter le Cu^+ à ATP7A et ATP7B au niveau de la membrane du trans-golgi ; Cox17 permet d'acheminer Cu^+ au niveau de la mitochondrie ; CCS transfère les ions Cu^+ à la SOD1.

⁵ Svetlana Lutsenko et al., "Function and regulation of human copper-transporting ATPases," *Physiological Reviews* 87, n°. 3 (Juillet 2007): 1011-1046.

2.2.2. Le rôle des protéines chaperonnes

Une fois dans le cytoplasme, les ions Cu^+ sont rapidement acheminés vers les différentes cuproenzymes afin d'éviter la formation de ROS grâce à trois systèmes de métallochaperones (**Figure 5**) : Atox1, Cox17 et CCS [42].

Atox1 possède une séquence conservée de liaison aux métaux et peut donc lier le cuivre sur deux cystéines. En changeant de conformation, les cystéines vont permettre le transfert du cuivre à d'autres protéines [44].

Cette métallochaperone permet de transporter le cuivre aux ATPases de type P (P pour phosphorylation), ATP7A (la protéine de Menkes) et ATP7B (la protéine de Wilson) au niveau de la membrane du trans-golgi. [43]. ATP7A se retrouve préférentiellement dans les muscles, les reins, les poumons et le cerveau, tandis que ATP7B est exprimée principalement dans le foie et les reins [45]. ATP7A et ATP7B possèdent huit domaines transmembranaires et contiennent six motifs de liaison au cuivre dans leur région N-terminale. Ils utilisent l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour transloquer les ions à travers la bicouche lipidique. ATP7A délivre le cuivre à des cuproenzymes dans la voie sécrétoire, tandis que ATP7B permet l'incorporation directe de cuivre dans la céruloplasmine. Lorsque la cellule est exposée à une trop grande quantité de Cu^+ , ATP7A se délocalise du réseau trans-golgien pour se retrouver au niveau de la surface cellulaire des fibroblastes par exemple, où il pourra se débarrasser de l'excès de cuivre [37]. ATP7B subit ce même genre de translocation en présence d'une charge trop importante en Cu^+ . Il se délocalise de la membrane du trans-golgi vers le compartiment vésiculaire se trouvant à proximité de la membrane canaliculaire des hépatocytes afin d'excréter l'excès de cuivre dans la bile [45].

Cox17 permet d'acheminer le cuivre vers la mitochondrie où il sera incorporé dans la cytochrome c oxydase. Cox17 est une protéine de 8 kDa se trouvant à la fois dans le cytoplasme et dans l'espace intermembranaire [43]. Cette protéine lie Cu^+ via des motifs cystéines et le délivre à deux protéines Cox11 et Sco1 qui se trouvent dans la membrane interne de la mitochondrie. Ces deux protéines vont à leur tour transférer le cuivre à la cytochrome c oxydase [37].

CCS, la chaperone pour la SOD transfère le cuivre à la SOD dans la mitochondrie [42]. Cette protéine de 26 à 30 kDa possède une séquence de liaison au cuivre similaire à celle d'Atox1 localisée dans la région N-terminale [44].

2.2.3. Le rôle des métallothionéines

Le cuivre est chélaté par des métallothionéines (MTs), une famille ubiquiste de protéines riches en cystéines conservées au cours de l'évolution, de faible poids moléculaire qui comporte quatre isoformes chez les mammifères : MT-I, MT-II (aussi connue sous le nom MT2A), MT-III et MT-IV [38]. MT-I et MT-II sont exprimées à tous les stades du développement et dans pratiquement tous les types cellulaires. MT-III est exprimée constitutivement, principalement dans les neurones mais également dans les organes reproductifs. Quant à MT-IV, elle est exprimée dans l'épithélium squameux [37].

En temps normal, les gènes codant pour les MTs sont exprimés à un niveau basal mais leur transcription est fortement induite par une charge en ions métalliques. Les MTs peuvent

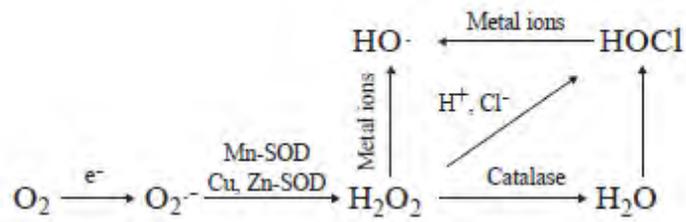


Figure 6 : Le rôle des ions métalliques dans la production de ROS⁶ Le cuivre a la capacité de réagir avec H₂O₂, HOCl ou O₂^{•-}, entraînant la formation de radicaux hydroxyles hautement réactifs.

⁶ H Fai Poon et al., "Free radicals and brain aging," *Clinics in Geriatric Medicine* 20, n°. 2 (Mai 2004): 329-359.

stocker du cuivre, mais elles sont incapables d'éliminer l'excès de cuivre hors d'une cellule. Ce sont les transporteurs ATPases de Type P qui s'en chargeront [37].

2.2.4. Le rôle d'Hsp70

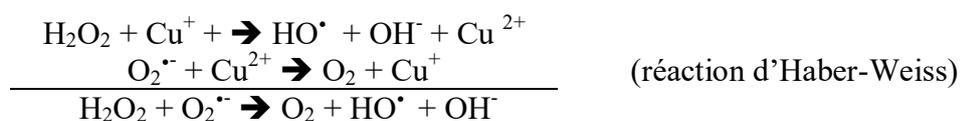
Il existe d'autres protéines qui semblent être importantes dans le métabolisme du cuivre, c'est le cas de la famille des protéines de choc thermique (Hsp pour Heat shock proteins) qui vont exercer un effet protecteur vis-à-vis des différents composants cellulaires suite à la génération d'un stress oxydatif. Les différents Hsp sont réparties en 5 groupes en fonction de leur poids moléculaire (20–30 kDa, 50–60 kDa, 70 kDa, 90 kDa and 100 kDa) [46]. Ce sont les Hsp de 70 kDa (Hsp70) qui vont particulièrement nous intéresser ici, étant donné qu'il a déjà été montré dans la littérature qu'une augmentation de l'expression du gène codant pour Hsp70 était induite notamment par les métaux comme le cuivre ainsi que par les ROS dans des cellules animales [47].

2.3. Le cuivre et la génération d'un stress oxydatif

Le cuivre est indispensable à la vie (voir section 2.1), mais il devient très rapidement toxique en excès ou lorsque les systèmes de régulation de l'homéostasie du cuivre ne sont pas efficaces, ce qui est notamment le cas des individus atteints de la maladie de Wilson ou la maladie de Menkes.

Comme nous l'avons vu, ATP7A (la protéine de Menkes) et ATP7B (la protéine de Wilson) permettent de délivrer le cuivre aux différentes cuproenzymes. Les maladies de Wilson et de Menkes sont dues à une mutation des gènes codant pour ces deux protéines, entraînant respectivement une déficience en cuivre ou une surcharge en cuivre [45].

Le cuivre peut être toxique à cause de sa capacité à réagir avec H₂O₂, HOCl ou encore O₂^{•-}, résultant en la formation de radicaux hydroxyles hautement réactifs pouvant causer des dommages aux macromolécules cellulaires (**Figure 6**), que cela soit de l'ADN, des protéines ou encore des lipides [48]. La réaction de Fenton nécessite de petites quantités de Cu⁺. En effet, ces ions agissent comme catalyseurs et sont recyclés en réagissant avec O₂^{•-}.



La génération des ROS est donc étroitement liée à la présence de métaux pouvant participer aux réactions redox, comme le fer et le cuivre. Il paraît donc évident qu'un excès de cuivre peut générer des ROS [49], comme mentionné dans un des chapitres précédents consacré aux dommages oxydatifs (section 1.1.3).

Les ROS générés par le cuivre peuvent générer des dommages à l'ADN, incluant les cassures simple et double brin ainsi que les modifications de bases, comme la 8-hydroxydéoxyguanosine par exemple [50].

Différentes études ont mis en exergue un lien potentiel entre le stress oxydatif généré par le cuivre et la sénescence. Nous allons nous attarder sur ce point ci-après.

2.4. Le cuivre et la sénescence

Nous avons vu que la maladie de Wilson se caractérisait par une surcharge en cuivre due à la mutation du gène codant pour ATP7B. Il faut également savoir que des cellules dans lesquelles l'expression de la protéine ATP7B était invalidée présentaient des biomarqueurs de la sénescence [51].

Rappelons également que l'équipe de H.D. Osiewacz avec la collaboration de notre laboratoire a démontré qu'une augmentation de cuivre dans le milieu de culture de fibroblastes diploïdes humains entraînait une augmentation de l'expression des gènes régulés par le cuivre dans les cellules en sénescence répliative et en SIPS, suggérant que les concentrations en cuivre augmentent durant la sénescence [32].

L'accumulation d'ions métalliques augmente avec l'âge. Le système nerveux central est particulièrement sensible à la production de ROS. En effet, le cerveau ne possède pas beaucoup d'enzymes antioxydantes, comme la catalase ou la peroxydase, et est particulièrement riche en substrats oxydables, à savoir les acides gras polyinsaturés [36].

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative qui se caractérise par une perte diffuse des cellules neuronales ainsi que par l'accumulation de plaques amyloïdes et d'agrégats neurofibrillaires. Le cerveau des patients atteints par la maladie d'Alzheimer contient une accumulation anormale d'ions Cu^+ et de protéines pouvant lier le cuivre, comme le β -amyloïde et la protéine prion [36].

La protéine prion est une protéine capable de lier le cuivre et de s'accumuler dans les plaques amyloïdes. Nous allons voir en quoi la protéine prion est intéressante dans l'étude du vieillissement.

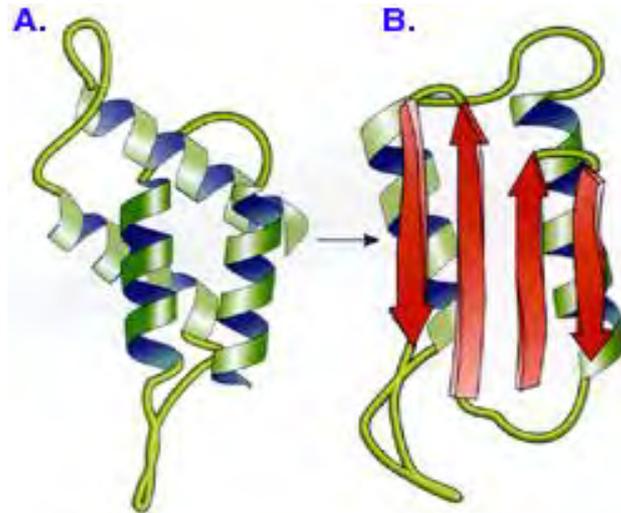


Figure 7 : Les deux isoformes de la protéine prion⁷. (A) PrP^c est la forme cellulaire normale exprimée constitutivement à l'intérieur de la cellule tandis que (B) PrP^{sc} est la forme mal repliée de cette même protéine, elle est dite « scrapie ». PrP^c est constituée majoritairement d'hélice- α tandis que PrP^{sc} est constituée majoritairement de feuillets β .

⁷ Université de Miami, département de biologie.

3. La protéine prion

3.1. Généralités

Les prions sont à la fois des particules protéiques dépourvues de matériel génétique et des pathogènes infectieux qui sont la cause des Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles (EST), appelées communément à l'heure actuelle « maladies à prions », comprenant entre autres le Kuru, l'encéphalopathie spongiforme bovine, la tremblante du mouton ou la maladie de Creutzfeldt-Jakob [52].

Ces maladies ont été regroupées sous le terme de « EST » en référence à deux de leurs caractéristiques principales, à savoir la vacuolisation du cerveau qui rappelle la texture d'une éponge ainsi que le caractère transmissible. En effet, ces maladies peuvent se transmettre au sein d'une même espèce, ou d'une espèce à l'autre [36]. Ces maladies touchent toutes les classes d'âge. Même si leur prévalence est généralement faible, les EST sont toujours incurables et donc inévitablement fatales [53].

Le Kuru, une EST découverte au sein d'une tribu de Papouasie-Nouvelle Guinée pratiquant des rituels de cannibalisme ainsi que la maladie de Creutzfeld-Jakob chez l'homme ont été décrites il y a des dizaines d'années. De même la tremblante du mouton est connue dans les cheptels depuis des siècles. Mais l'engouement pour les EST s'est porté à son paroxysme lors de l'avènement de la maladie de la vache folle au Royaume-Uni au milieu des années 90 [54]. A partir de cet instant, les scientifiques se sont davantage plongés sur cet agent infectieux pour le moins particulier.

Afin de caractériser l'agent responsable des EST, on a isolé des extraits de cerveau de moutons atteints de la tremblante [36]. L'agent infectieux responsable de cette maladie est particulièrement difficile à inactiver et est beaucoup plus résistant aux traitements chimiques et physiques utilisés couramment pour inactiver les autres pathogènes comme les bactéries, les champignons et les virus. Malgré l'irradiation aux UV et aux rayons γ , une exposition au formaldéhyde, à de fortes températures et l'utilisation de nucléases, le caractère infectieux de l'agent causant cette maladie n'en fut pas diminué. Par contre, des procédés qui modifient habituellement les protéines, comme un traitement à l'urée, à la protéinase-k au SDS ou à la trypsine avaient un effet sur la fraction infectieuse. C'est ce qui a mené les scientifiques à penser que ces agents pourraient être dépourvus de matériel génétique [55].

Le terme « prion » fut alors proposé par le professeur Prusiner suite à ces découvertes [56], ce mot étant issu d'une combinaison entre les mots « **protéique** » et « **infectieux** ». Selon le professeur Prusiner, le prion serait constitué en majeure partie d'une forme altérée d'une protéine. D'après l'hypothèse « protein-only », lorsqu'une protéine cellulaire subit un changement de conformation, sa fonction normale est compromise (« perte de fonction ») ou la protéine acquiert une nouvelle activité (« gain de fonction ») [57].

On sait maintenant que les maladies à prions sont dues à un changement de conformation de la forme de la protéine prion exprimée constitutivement dans la cellule, la protéine prion cellulaire (PrP^c), en une forme mal repliée de cette même protéine, la protéine prion dite « scrapie » (PrP^{sc}) (**Figure 7**) Ce changement de conformation entraîne non seulement une perte de fonction de la protéine PrP^c mais aussi une accumulation de PrP^{sc} qui va former des agrégats protéiques compacts, résistants aux protéases, qui vont s'accumuler dans le cerveau et mener à terme à la neurodégénérescence [58].

La neurodégénérescence est caractérisée par une perte neuronale progressive, la formation de plaques séniles, la présence de larges vacuoles qui donnent au cerveau une apparence spongiforme [59]. Une dégénérescence fatale du système nerveux central peut avoir lieu [56].

3.2. Les deux isoformes de la protéine prion

3.2.1. La protéine PrP^c

3.2.1.1. Généralités

Le gène qui code pour PrP^c est *Prnp*. Chez l'homme, ce gène est localisé sur le chromosome 20 et est constitué de deux exons [60]. La séquence de PrP^c a été hautement conservée durant l'évolution [61], ce qui suggère que cette protéine doit jouer un rôle important. Les éléments qui régulent l'expression de *Prnp* sont encore loin d'être identifiés à ce jour [53]. Le facteur de transcription Atox-1 semble jouer un rôle dans l'expression de PrP^c, d'après une étude relativement récente réalisée par l'équipe du professeur Brown [62], mais ce ne sont que des résultats préliminaires.

La protéine PrP^c est constituée d'un domaine N-terminal flexible, de trois hélices α et deux feuillets β antiparallèles encadrant la première hélice α . Le second domaine de PrP^c est le domaine central qui est constitué de résidus chargés positivement ainsi que d'une région hydrophobe. Et enfin le troisième domaine, appelé également le domaine globulaire C-terminal, est constitué d'une hélice α et de deux feuillets β parallèles [63]. Cette protéine de 209 acides aminés possède une structure dominante en hélices α et peut être digérée par la protéinase-k, une protéase qui possède une gamme de substrats très large [64].

PrP^c est une protéine N-glycosylée qui possède une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI). Lors de son passage à travers le reticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi, des modifications post-traductionnelles vont avoir lieu, incluant le clivage d'un peptide signal N-terminal de 22 acides aminés, la formation d'une hélice interne qui va stabiliser les ponts disulfures entre les cystéines 179 et 214, l'attachement de chaînes d'oligosaccharide N-liée et le remplacement de l'extrémité carboxy-terminale par l'ancre GPI. La protéine PrP^c est alors exportée à la surface de la membrane plasmique en tant que protéine à ancre GPI [65].

La glycosylation est une caractéristique importante des protéines de surface, incluant donc PrP^c qui possède deux sites de N-glycosylation ainsi qu'une ancre GPI comme mentionné précédemment. L'ancre GPI est flexible et permet de maintenir la protéine à environ 9-13 angströms de la surface de la membrane plasmique [66]. Des problèmes dans la glycosylation de PrP^c peuvent être associés à des problèmes dans la biosynthèse et la structure de PrP^c, comme par exemple des changements de topologie dans la membrane cellulaire, dans la stabilité de PrP^c, dans l'acheminement de PrP^c vers la surface des cellules neuronales et enfin dans la conversion de PrP^c en PrP^{sc} [66]. De plus, des voies de dégradation de protéines mal repliées peuvent être enclenchées et détruire PrP^c.

C'est la transmissibilité qui va distinguer les maladies à prions des autres maladies liées à un mauvais repliement des protéines [65]. Cette transmissibilité pourrait s'expliquer par la présence de l'ancre GPI qui aurait des effets sur les propriétés biochimiques, biophysiques et neurotoxiques de PrP^c : l'ancre GPI permettrait l'échange de protéines entre les cellules via la sécrétion de vésicules membranaires ou de projections intracellulaires. Ces protéines à ancre GPI pourraient s'agréger à d'autres cellules et enclencher la formation de nouveaux agrégats

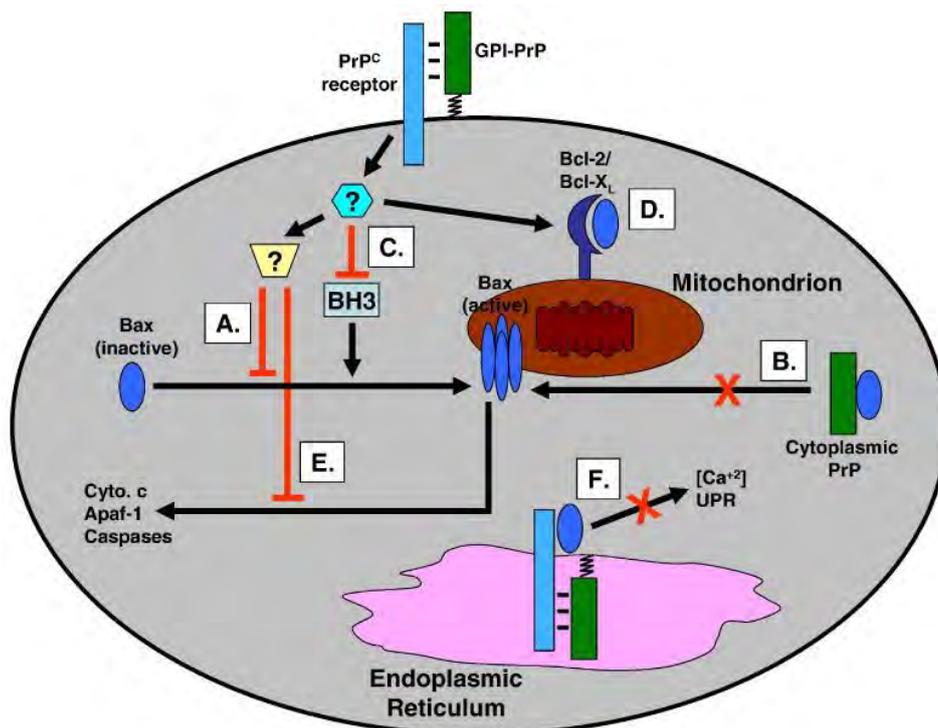


Figure 8 : Effet cytoprotecteur de PrP^c contre l'apoptose induite par Bax⁸. Le mécanisme par lequel PrP^c agirait n'est pas encore entièrement connu, mais plusieurs hypothèses ont été émises : **(A)** soit par interaction avec un récepteur transmembranaire, PrP^c peut altérer Bax en inhibant sa translocation de la mitochondrie ainsi que son changement de conformation, **(B)** soit par interaction possible des formes cytoplasmiques de PrP^c et de Bax, **(C)** soit via un signal dépendant de PrP^c qui pourrait agir en amont de Bax et inhiber les activateurs BH3-only de Bax, **(D)** soit en favorisant l'association de Bax avec des régulateurs anti-apoptotiques comme Bcl-2, **(E)** soit en inhibant les effets de Bax en aval, lors de la libération du cytochrome c ou de l'activation des caspases, **(F)** ou en perturbant l'activité de Bax associée au réticulum endoplasmique.

⁸ Laura Westergard, Heather M Christensen, et David A Harris, "The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease," *Biochimica Et Biophysica Acta* 1772, n°. 6 (Juin 2007): 629-644.

protéiques [55]. Même si beaucoup d'études restent controversées, la glycosylation de PrP^c a certainement un rôle à jouer.

3.2.1.2. La localisation de PrP^c

On sait que PrP^c est exprimée tôt dans l'embryogénèse et aussi chez l'adulte, en grande quantité dans les neurones et la moelle épinière, ainsi qu'en petite quantité dans d'autres types cellulaires, comme les cellules gliales du système nerveux central ou encore les fibroblastes [67].

L'équipe de Morel a montré que PrP^c est localisée dans le noyau des cellules qui se divisent activement [68]. L'équipe de Gu, a mis en évidence la présence de signaux de localisation nucléaire dans la protéine prion tronquée de leur domaine C-terminal [69]. Ils ont également caractérisé des résidus essentiels à la translocation nucléaire ainsi que les conditions durant lesquelles la protéine prion tronquée est dirigée vers la membrane plasmique au lieu du noyau.

La majorité des molécules de PrP^c se retrouvent sous forme liée à l'ancre GPI. Il semble logique que PrP^c forme une plateforme dynamique localisée à la surface cellulaire qui va permettre les interactions moléculaires et la signalisation transmembranaire [70]. PrP^c se retrouve donc principalement en membrane, localisée au niveau des « lipid rafts » ou « radeaux lipidiques », des microdomaines de la membrane plasmique riches en cholestérol et en sphingolipides [53]. Une petite partie de PrP^c se retrouve dans les puits tapissés de clathrine et est soumise à l'endocytose constitutive tandis qu'une autre partie se retrouve dans le RE où PrP^c subira des modifications post-traductionnelles [70].

3.2.1.3. Les fonctions de PrP^c

On pense que PrP^c est impliquée dans différentes fonctions, y compris la prolifération cellulaire ainsi que la différenciation cellulaire [71], l'adhésion cellulaire [72], la transduction du signal [73] et la protection contre le stress oxydatif [74].

Le cerveau humain représente un petit pourcentage du poids total du corps et est le plus grand consommateur d'oxygène. En effet, il consomme approximativement 20% de l'oxygène inhalé et possède peu d'enzymes antioxydantes, faisant de cet endroit un endroit privilégié où règne un stress oxydatif important [23]. Dans un tel système, on pense que PrP^c joue un rôle critique dans la résistance au stress oxydatif. Il a été montré dans une étude de Nicole Watt que des cellules déficientes en PrP^c étaient moins viables en culture et plus susceptibles aux dommages oxydants causés par les ROS en comparaison avec les cellules qui exprimaient PrP^c. PrP^c protégerait des dommages à l'ADN causés par les ROS et jouerait donc un rôle neuroprotecteur [75].

Il a également été montré que PrP^c présentait un effet cytoprotecteur contre des stress pro-apoptotiques. En effet, dans des neurones embryonnaires humains en culture, PrP^c protège de l'apoptose induite par Bax [70]. Il a également été montré que la délétion de la région N-terminale empêchait cet effet protecteur. Le mécanisme par lequel PrP^c agirait n'est pas encore entièrement connu, mais plusieurs hypothèses ont été émises (**Figure 8**) [70] : 1) soit par interaction avec un récepteur transmembranaire, PrP^c peut altérer Bax en inhibant sa translocation de la mitochondrie ainsi que son changement de conformation, 2) soit par interaction possible des formes cytoplasmiques de PrP^c et de Bax, 3) soit via un signal dépendant de PrP^c qui pourrait agir en amont de Bax et inhiber les activateurs BH3-only de

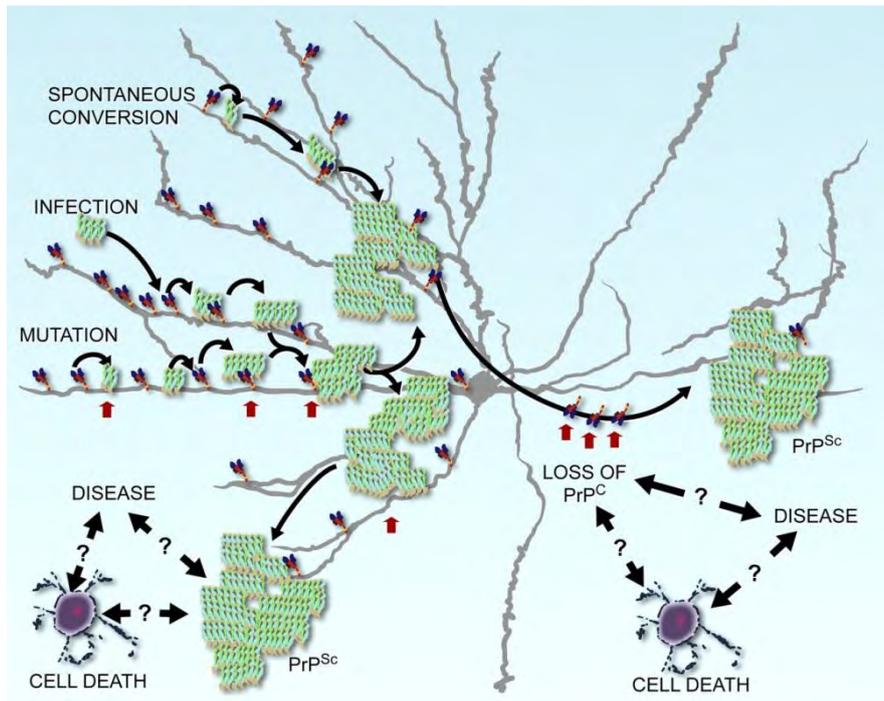


Figure 9 Modèles proposés pour la conversion de PrP^c en PrP^{sc}⁹. Deux modèles ont été proposés pour expliquer cette conversion protéique : le modèle « gain de fonction » et le modèle « perte de fonction ». Dans les deux cas de figure, une molécule de PrP^{sc} (représentée en vert clair) va entrer dans le système nerveux central suite à une infection, à une conversion spontanée d'une molécule de PrP^c ou encore suite à une mutation du gène codant pour PrP^c. PrP^{sc} va s'accumuler et former des agrégats qui pourront ensuite piéger des molécules de PrP^c éventuellement les convertir en PrP^{sc}. Le modèle « gain de fonction » propose que cette agrégation de molécules de PrP^{sc} va sensibiliser les neurones à la mort programmée et va mener aux maladies à prions. A l'inverse, le modèle « perte de fonction » propose que la perte de PrP^c entraîne une certaine « vulnérabilité » cellulaire qui va mener aux maladies à prions. Ces deux hypothèses ne sont pas exclusives et des liens pourraient exister entre l'accumulation de PrP^{sc}, la mort cellulaire et le déclenchement de la maladie.

⁹ Rafael Linden et al., "Physiology of the prion protein," *Physiological Reviews* 88, n°. 2 (Avril 2008): 673-728.

Bax, 4) soit en favorisant l'association de Bax avec des régulateurs anti-apoptotiques comme Bcl-2, 5) soit en inhibant les effets de Bax en aval, lors de la libération du cytochrome c ou de l'activation des caspases, 6) ou en perturbant l'activité de Bax associée au réticulum endoplasmique. A l'heure actuelle, les recherches en cours ne permettent pas de favoriser telle ou telle voie pour expliquer l'effet cytoprotecteur de PrP^c.

Suite à son implication dans les maladies neurodégénératives, les fonctions de PrP^c sont principalement étudiées dans des cellules neuronales [70]. Peu d'études sont réalisées dans d'autres types cellulaires.

3.2.2. La protéine PrP^{sc}

A l'inverse de PrP^c, la structure tridimensionnelle de PrP^{sc} n'a pas encore été complètement établie, vu que cette protéine a du mal à être purifiée en quantité suffisante et sous une forme soluble et non-agrégée [65]. Cependant, en se basant sur la cryo-microscopie ainsi que sur les modèles structuraux de protéines similaires, il a été montré que PrP^{sc} est formée en grande partie de structures en feuillets β , avec une composition en feuillets β avoisinant les 40%, alors que l'isoforme PrP^c n'en contient que 3% [54].

Ce changement de conformation est dû à la transition conformationnelle de la région hydrophobe qui va former des agrégats de protéines insolubles et non digérables par la protéinase-k [56]. Lorsque PrP^{sc} est traitée avec des enzymes protéolytiques, seule la région N-terminale est digérée. Le reste de la protéine reste insoluble et s'accumule, ce qui peut se visualiser par des colorations immuno-histochimiques [65]. Le rouge congo et la thioflavine T permettent de mettre ces agrégats en évidence.

3.3. La conversion de PrP^c en PrP^{sc}

3.3.1. Modèles proposés

La façon dont cette conversion a lieu n'est pas encore parfaitement élucidée. Deux modèles expliquant cette conversion protéique ont été proposés (**Figure 9**) : le modèle « gain de fonction » et le modèle « perte de fonction ». Dans les deux cas, une molécule de PrP^{sc} doit pénétrer dans le système nerveux central. Ceci peut se faire de différentes manières : à la suite d'une infection, suite à une conversion spontanée ou encore suite à une mutation du gène codant pour PrP^c [53]. C'est la première étape, appelée également « uptake ». Cette étape est difficile à étudier car il n'existe pas d'anticorps qui puisse différencier les formes PrP^c et PrP^{sc} dans les cellules vivantes [76]. La molécule de PrP^{sc} peut ensuite piéger des molécules de PrP^c dans les agrégats et convertir PrP^c en PrP^{sc}.

Deux modèles sont proposés pour expliquer cette étape de conversion : 1) « nucleated polymerization model » où PrP^{sc} va agir comme un noyau qui va initier la polymérisation, et des monomères de PrP^c vont être ajoutés à PrP^{sc}, 2) « template-assisted conversion model », où PrP^{sc} agit comme « matrice », et va convertir PrP^c en PrP^{sc} via une interaction directe [54]. D'après l'hypothèse du « gain de fonction », l'accumulation de PrP^{sc} va sensibiliser les neurones à l'apoptose et mener aux maladies à prions. En suivant l'hypothèse de la « perte de fonction », la perte de PrP^c va rendre la cellule plus vulnérable et mener aux maladies à prions, PrP^c ne jouant plus son rôle. Aucune de ces deux hypothèses n'est entièrement exclusive, et il reste encore à évaluer les liens possibles entre l'accumulation de PrP^{sc}, la mort cellulaire et le déclenchement de la maladie [53].

3.3.2. La localisation cellulaire de la conversion de PrP^c en PrP^{sc}

La localisation cellulaire de la conversion de PrP^c en PrP^{sc} n'est pas encore élucidée actuellement. Plusieurs localisations ont été proposées, sur base de différents arguments repris ci-dessous.

3.3.2.1. La membrane plasmique

Plusieurs études ont montré que les modifications post-traductionnelles sont acquises après que PrP^c ait atteint la membrane plasmique. En effet, l'environnement lipidique et protéique de la membrane plasmique favoriserait l'interaction entre PrP^c et PrP^{sc} ainsi que la conversion de PrP^c [77]. En favorisant la libération de PrP^c de la membrane plasmique par différentes méthodes, on empêche la formation de PrP^{sc} [78].

Des microdomaines de la membrane plasmique, les « radeaux lipidiques », sont des portions spécialisées riches en cholestérol et en sphingolipides. Ils pourraient avoir un rôle à jouer durant la conversion de PrP^c en PrP^{sc}. En effet, les rafts produisent un environnement favorable pour la conversion, en favorisant les interactions entre PrP^c et PrP^{sc}, en concentrant les molécules dans les petites portions de la membrane plasmique ou en les alignant d'une façon à promouvoir leur interaction [77].

3.3.2.2. Le réticulum endoplasmique

Après son internalisation, PrP^{sc} subit un transport rétrograde vers l'appareil de Golgi ou vers le réticulum endoplasmique, perturbant ainsi les molécules de PrP^c nouvellement synthétisées et déclencherait ainsi la formation de PrP^{sc} [77]. L'équipe de Beranger a montré qu'en stimulant le transport rétrograde ainsi qu'en surexprimant la petite GTPase Rab6a qui permet de délocaliser une grande quantité de PrP^c dans le réticulum endoplasmique et y permettre son accumulation, on augmentait la production de PrP^{sc} [79]. Ces auteurs proposent que l'accumulation de PrP^{sc} dans le réticulum endoplasmique pourrait être due à l'accumulation de molécules de PrP^c mal repliées. Le réticulum endoplasmique jouerait donc un rôle dans la conversion de PrP^c et pourrait même jouer le rôle de « compartiment d'amplification ».

3.3.2.3. Le compartiment endosomal

L'équipe de Marijanovic a montré que 90% des molécules de PrP^{sc} se trouvent dans les compartiments intracellulaires tandis que 10% environ sont localisés à la surface cellulaire. D'après eux, il paraît logique que la conversion de PrP^c a lieu à un endroit où les deux protéines se croisent et où les interactions physiques peuvent avoir lieu [80]. Etant donné que des anticorps pouvant distinguer les deux isoformes n'existent pas, ils se sont basés sur des analyses d'images quantitatives leur permettant de définir la quantité de PrP^c et PrP^{sc} dans les compartiments extracellulaires, le signal étant plus important pour PrP^{sc} [80].

3.3.3. Les partenaires intervenant dans la conversion de PrP^c en PrP^{sc}

Les partenaires de PrP^c sont nombreux. La liste continue encore aujourd'hui de s'agrandir, mais certains retiennent plus l'attention que d'autres. C'est bien entendu le cas de l'ion Cu²⁺, dont il fut discuté en détails dans la section 3.4, mais également du récepteur à la laminine ou des glycosaminoglycans (GAGs) [55]. Ces trois ligands interviendraient dans le processus de

conversion de PrP^c. Il semblerait que le récepteur à la laminine permettrait de rapprocher les deux partenaires et de favoriser l'interaction entre PrP^c et PrP^{sc}. Il a été montré que le récepteur à la laminine pouvait lier *in vitro* PrP^c et favoriser l'internalisation de PrP^{sc} par les cellules. Les GAGs serviraient de récepteurs de surface pour PrP^{sc} et participeraient à sa biosynthèse, en jouant un rôle dans sa propagation. Quant au cuivre, il induit un changement de conformation de PrP^c [54].

3.4. PrP^c et le cuivre

PrP^c peut lier le cuivre grâce à son domaine N-terminal qui contient 4 à 5 répétitions de 8 résidus (PHGGGWGQ) [81]. L'octapeptide se lie à quatre atomes Cu²⁺ et cette liaison implique une coordination avec des atomes d'azote présents dans les chaînes latérales imidazoles des résidus histidine, mais aussi avec les azotes et les oxygènes présents dans la chaîne principale [70]. La liaison du cuivre résulte en un changement de conformation de la partie N-terminale de PrP^c. En absence de cuivre, la partie N-terminale reste flexible et non structurée.

Pauly et al. ont mis en évidence le rôle du cuivre dans l'endocytose de PrP^c. En effet, ils ont démontré que Cu²⁺ pouvait induire l'endocytose et la redistribution de PrP^c à la surface cellulaire dans des cellules de neuroblastome de souris. PrP^c pourrait jouer un rôle dans le transport du cuivre entre le milieu extracellulaire et intracellulaire. Ce cuivre pourrait être ensuite distribué aux différentes cuproenzymes (voir section 2.1) [82].

Les ions cuivre à l'état non liés sont extrêmement toxiques car ils contribuent à la génération de ROS [49]. En liant des ions cuivre à travers sa région contenant les 8 résidus, PrP^c semblerait exercer une activité antioxydante. Ceci a été démontré dans les cellules dérivées de la corde neurale chez la souris et dans les cellules humaines HeLa [83]. De même, le dosage d'enzymes antioxydantes a également permis de montrer que l'expression de PrP^c augmentait le niveau basal de plusieurs enzymes antioxydantes [36]. Il a également été montré que PrP^c possédait elle-même une activité superoxyde dismutase (SOD)-like lorsqu'elle se repliait en présence de cuivre. Lorsqu'on retirait l'octapeptide, l'activité SOD-like était quasi inexistante. En réalité, l'activité SOD-like de PrP^c nécessite au minimum la liaison de deux atomes de cuivre [84].

Varela et al. ont démontré que la région de PrP^c contenant l'octapeptide pouvait réduire Cu²⁺ en Cu⁺ *in vitro*. Cette région permettrait à PrP^c de protéger contre la toxicité induite par le cuivre *in vivo* [85]. En analysant la séquence du promoteur du gène *Prnp*, ces auteurs ont découvert la présence de plusieurs éléments de réponses aux métaux. Ces éléments sont constitués d'un motif de 12 paires de bases dans lequel on retrouve un motif très conservé de 7 paires de bases (5'-TGC(A/G)CNC), entouré de motifs riches en GC. Ils en ont déduit qu'il était fort probable que le cuivre, et peut-être d'autres métaux lourds, exercent un effet sur l'expression du gène *Prnp* via ces éléments de réponses aux métaux présents dans la région promotrice [85].

Par contre, on ne sait toujours pas avec certitude si la liaison de Cu²⁺ à PrP^c facilite ou non sa conversion en PrP^{sc}. Il est juste intéressant de souligner que l'insertion de 1 à 9 octapeptides à la PrP^c est associée à des formes de maladies à prions. L'équipe de Chiesa a démontré que l'insertion de 9 octapeptides dans PrP^c entraînait des lésions semblables à celles engendrées par PrP^{sc} dans différents organes [86].

3.5. Implication de PrP^c dans le vieillissement.

Nous avons vu que l'isoforme PrP^c possédait deux sites de glycosylation. Une étude de 2007 s'est penchée sur l'analyse des profils de glycosylation de PrP^c dans le cerveau de souris âgées [87]. Cette étude a mis en évidence des changements dans la glycosylation de PrP^c durant le vieillissement, diminuant donc la quantité de PrP^c fonctionnelle. Ces résultats sont confirmés par une étude plus récente de Yumi Yoshioka où les propriétés physiologiques et la quantité de PrP^c ont été déterminées dans des homogénats de cerveaux issus de bovins jeunes et âgés. Les résultats de cette étude ont montré que la fraction de protéine prion digérable par la protéinase-k (donc l'isoforme PrP^c) était beaucoup moins importante chez les individus âgés en comparaison avec les individus plus jeunes [88]. On pourrait émettre l'hypothèse que la proportion de PrP^{sc} augmenterait dans les cellules âgées au détriment de PrP^c qui assure les fonctions protectrices vis-à-vis des ROS décrites précédemment.

D'autres études mettant en évidence la fonction protectrice de PrP^c à l'encontre des effets du stress cellulaire ont permis de souligner les relations biologiques qui pourraient exister entre le vieillissement et PrP^c. On observe en effet une augmentation de l'expression de PrP^c chez des souris âgées exposées à des stress oxydatifs dans une étude réalisée par l'équipe de Jakob Moskovitz [89]. Dans cette étude, les souris ont été exposées à des conditions d'hyperoxie afin d'établir si un stress oxydatif pouvait affecter l'expression de PrP^c *in vivo*. Ils ont mis en évidence une augmentation de l'expression de PrP^c dépendant de l'âge, en réponse à cette hyperoxie.

Très peu d'études concernant le rôle potentiel de PrP^c dans le vieillissement existent à l'heure actuelle. La plupart d'entre elles se focalisent principalement sur le rôle de PrP^c dans les maladies à prions, ainsi que sur les phénomènes entraînant sa conversion en la forme PrP^{sc} et sont réalisées principalement avec des cellules neuronales. Une étude du rôle que jouerait PrP^c dans les mécanismes liés à la sénescence semble pourtant pertinente, au vu des différentes fonctions que peut remplir cette protéine et de son interaction très privilégiée avec le cuivre. C'est pourquoi les objectifs définis au cours de ce mémoire avaient pour but d'apporter quelques hypothèses quant au rôle de PrP^c dans les processus de sénescence cellulaire.

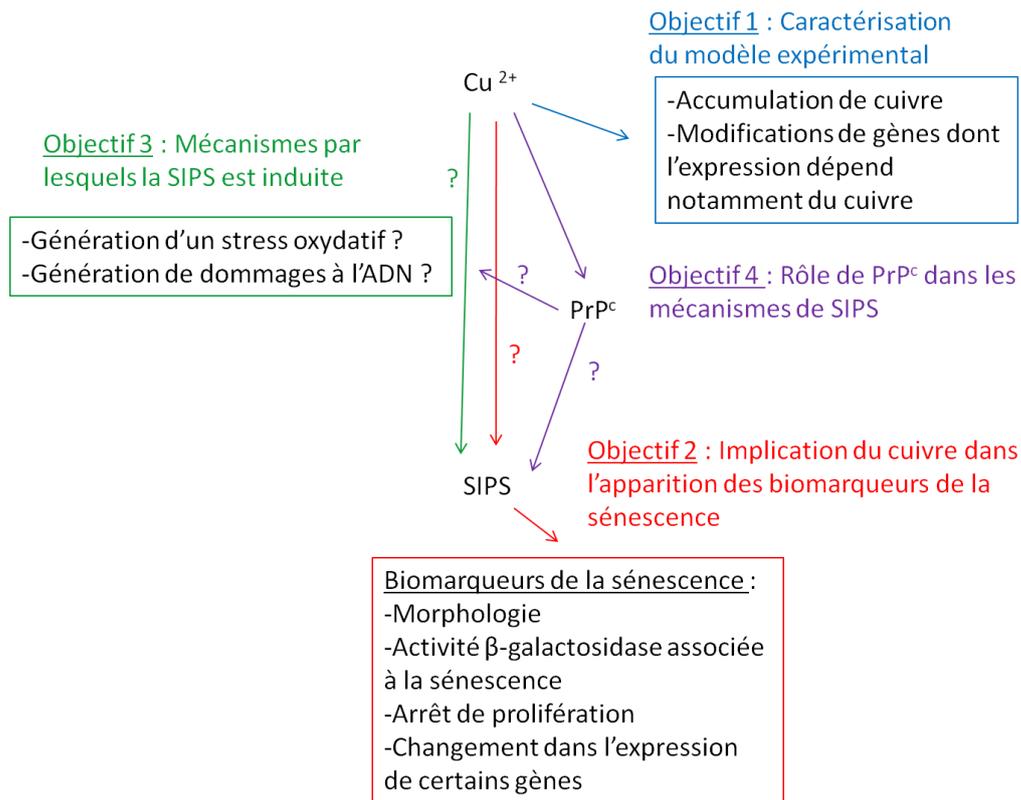


Figure 10 : Objectifs abordés au cours du mémoire. Premièrement, nous avons mis au point et caractérisé un modèle expérimental d'exposition au cuivre permettant l'accumulation de cuivre ainsi que des modifications de gènes dont l'expression dépend notamment du cuivre dans les fibroblastes WI-38. Deuxièmement, nous avons étudié l'implication du cuivre dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence chez les fibroblastes WI-38. Troisièmement, nous sommes penchés sur les mécanismes par lesquels la SIPS est induite. Nous avons voulu déterminer si le cuivre induit la génération de d'un stress oxydatif ainsi que des dommages à l'ADN. Pour terminer, nous nous sommes penchés sur l'éventuel rôle que la protéine prion (PrP^c) joue dans la sénescence induite prématurément par le cuivre chez les fibroblastes humains WI-38.

4. Objectifs

Afin d'étudier le rôle potentiel de la protéine prion dans la sénescence induite prématurément par le cuivre dans les fibroblastes humains WI-38, plusieurs approches ont été mises en place (Figure 10).

Le choix de cette lignée cellulaire repose sur deux critères majeurs : c'est avec ce type cellulaire en particulier que Leonard Hayflick a posé les bases en matière de sénescence cellulaire et c'est également avec cette lignée que plusieurs modèles de sénescence induite prématurément par les stress (SIPS) ont été mis au point au sein de notre laboratoire. De plus, il paraissait également intéressant d'utiliser ce type cellulaire pour l'étude du rôle potentiel de la protéine prion étant donné que toutes les études concernant ce sujet qui sont publiées à ce jour sont réalisées majoritairement dans des cellules neuronales.

Tout d'abord, nous avons mis au point et caractérisé un modèle expérimental d'exposition au cuivre permettant d'induire l'accumulation de cuivre ainsi que des modifications de gènes dont l'expression dépend notamment du cuivre.

Afin de mettre au point ce modèle expérimental de sénescence induite prématurément par le cuivre et en particulier la dose sublétalement utilisée, différents donneurs de cuivre ont été testés à différentes concentrations ainsi que différents temps d'incubation.

Après avoir établi ces différents paramètres, nous nous sommes penchés sur le deuxième objectif qui a pour but d'étudier l'implication du cuivre dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence chez les fibroblastes humains WI-38. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle expérimental de SIPS par le cuivre permettant d'évaluer l'apparition des biomarqueurs à long terme. Les fibroblastes WI-38 ont été incubés pendant 16 h avec du CuSO_4 à une concentration de 500 μM . Après les 16 h d'incubation, les fibroblastes ont été incubés avec du nouveau milieu de culture ne contenant pas de cuivre afin qu'ils puissent « récupérer » du stress, et 72 h après l'arrêt de l'incubation, différents biomarqueurs de la sénescence vont être étudiés : la morphologie cellulaire, l'activité β -galactosidase associée à la sénescence, l'arrêt de prolifération cellulaire ainsi que la modification de l'expression de certains gènes liés à la sénescence.

Après avoir vu que le cuivre pouvait induire l'apparition des biomarqueurs de la sénescence, nous nous sommes penchés sur le troisième objectif, à savoir les mécanismes par lesquels la SIPS est induite. Nous avons voulu déterminer si le cuivre induisait la génération d'un stress oxydatif ainsi que des dommages à l'ADN, comme mentionné dans la littérature, ceux-ci pouvant être impliqués dans la génération des biomarqueurs de la sénescence.

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle la SIPS est induite via un stress oxydatif, nous avons utilisé un antioxydant (le Trolox) lorsque nous incubions nos cellules avec le cuivre. L'utilisation d'un antioxydant permet non seulement de contrer le stress oxydatif qui serait généré par l'incubation au CuSO_4 mais également d'étudier l'impact de cet antioxydant sur l'apparition des biomarqueurs de la sénescence.

Après avoir abordé ces trois premiers objectifs, notre quatrième et dernier objectif a pour but d'étudier l'éventuel rôle que la protéine prion jouerait dans les mécanismes de sénescence induite prématurément par le cuivre. Tout d'abord, nous avons tenté de mettre en évidence le lien qui existerait entre le cuivre et la protéine prion, un sujet qui est très abordé dans la littérature. Après avoir tenté de mettre en évidence ce lien, nous avons invalidé l'expression de la protéine prion afin de voir ce qu'il se passait dans les fibroblastes WI-38 lorsqu'ils étaient incubés avec du CuSO_4 .

En fonction du résultat obtenu, on pourrait éventuellement déterminer si PrP^c joue un rôle protecteur ou à l'inverse un rôle plus « actif » dans les mécanismes de sénescence. En effet, après invalidation de PrP^c, si une augmentation de l'apparition des différents biomarqueurs associés à la sénescence apparaît on pourrait en déduire que PrP^c joue un rôle « protecteur ». Tandis que si on observe une diminution de l'apparition des différents biomarqueurs suite à l'invalidation de PrP^c, on pourrait déduire que PrP^c jouerait un rôle plus « actif » dans ces mécanismes.

Après avoir invalidé l'expression de PrP^c et incubé les fibroblastes WI-38 avec 500 µM de CuSO₄ pendant 16 h, nous avons également analysé l'abondance relative de gènes impliqués dans la réponse antioxydante et dans la réparation des dommages à l'ADN à 0 h après l'arrêt de l'incubation avec le CuSO₄. Ainsi, nous avons pu analyser le rôle de PrP^c vis-à-vis du stress oxydatif et des dommages à l'ADN.

Il faut bien entendu garder à l'esprit que la plupart des résultats présentés dans ce mémoire ne sont que des résultats préliminaires. Ils apportent des informations relativement intéressantes, mais de nombreuses expériences restent encore à réaliser pour pouvoir proposer une réponse à notre hypothèse de départ, à savoir le rôle potentiel que la protéine prion joue dans la sénescence induite prématurément par le cuivre chez les fibroblastes humains WI-38.

II. Matériel et Méthodes

1. Conditions de culture des fibroblastes WI-38

Dans le cadre de ce mémoire, la lignée cellulaire humaine WI-38 a été utilisée comme modèle cellulaire. Cette lignée de fibroblastes humains a été développée en 1962 par Hayflick [2] à partir de tissu pulmonaire issu d'un fœtus de 3 mois, suite à un avortement thérapeutique (American Type Culture Collection – ATCC, #CCL-75, USA). Cette lignée cellulaire humaine n'ayant pas été immortalisée, les cellules vieillissent au fur et à mesure des passages en culture et nous devons dès lors tenir compte des générations cellulaires.

1.1. Matériel

Tableau II-1

1.2. Méthode

Les fibroblastes sont cultivés dans des boîtes de culture de 75 cm² (T75) en présence de 15 ml de milieu de culture Basal Medium Eagle (BME) contenant de la L-glutamine et 10 % de sérum de veau fœtal. Lorsque les cellules sont à environ 80% de confluence, les cellules sont cultivées suivant le procédé suivant : le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées deux fois avec 10 ml de PBS stérile par T75 afin d'éliminer complètement le sérum de veau fœtal pour assurer un fonctionnement optimal de la trypsine. La trypsine est une protéase qui va permettre le détachement des cellules de la boîte de culture en clivant les protéines permettant les interactions intercellulaires et les interactions entre la cellule et la matrice extracellulaire. 500 µl de trypsine sont alors ajoutés dans chaque T75 après avoir décanté complètement le PBS pour ne pas diluer l'enzyme. Les cellules sont alors incubées de 8 à 10 min à 37°C. Une fois les cellules détachées, les cellules sont resuspendues dans 10 ml de milieu complet afin d'arrêter l'action de la trypsine.

1.2.1. Maintien de la culture

La suspension cellulaire est homogénéisée, puis répartie dans de nouvelles T75 contenant 10 ml de milieu complet, pour atteindre un volume final de 15 ml. L'ensemencement pour le maintien des cellules en culture se fait de 1 en 2. Les cellules qui ont arrêté de se diviser après deux semaines sont considérées comme sénescents.

1.2.2. Pour les expériences

Lorsque les cellules atteignent 60 % de leur vie proliférative (environ le passage en culture 27) et sont à environ 80% de confluence, elles sont cultivées à une densité de 14 000 cellules/cm² dans des boîtes de culture de 25 cm² (T25), de 75 cm² (T75) ou des plaques 24 puits. Afin d'atteindre précisément cette densité cellulaire, un comptage à l'aide de la chambre de Neubauer est réalisé. Une fois l'ensemencement effectué, les cellules sont placées dans une étuve à 37°C et à atmosphère humide contenant 5% de CO₂ (incubateur de culture cellulaire).

Tableau II- 1 : Matériel et solutions utilisés pour le repiquage des fibroblastes WI-38.

Boîtes de culture	Boîtes de culture de 75 cm ² (T75) (Corning, USA)
Milieu de culture complet	- Basal Medium Eagle (BME , Gibco-Invitrogen, UK) - 2 mM L-glutamine (Gibco-Invitrogen, UK) - 10 % de sérum de veau fœtal (FBS, Gibco-Invitrogen, UK)
Milieu de rinçage	Phosphate Buffer Saline stérile (PBS, Lonza, Belgique)
Trypsine	Solution de trypsine à 0,5 g/l (Gibco-Invitrogen, UK)
Etuves	- Etuve à 37°C, sans CO ₂ (CO ₂ -auto-zero, Qlab, Belgique) - Etuve à 37°C et 5% CO ₂ (HERAcell 240, Qlab, Belgique)

Tableau II- 2 : Matériel et solutions utilisés pour l'incubation des fibroblastes WI-38 au CuSO₄.

Boîtes de culture	Boîtes de culture 25 cm ² (T25), 75 cm ² (T75) (Corning, USA)
Milieu de culture complet	- Basal Medium Eagle (BME , Gibco-Invitrogen, UK) - 2 mM L-glutamine (Gibco-Invitrogen, UK) - 10 % de sérum de veau fœtal (FBS, Gibco-Invitrogen, UK)
Milieu de rinçage	Phosphate Buffer Saline stérile (PBS, Lonza, Belgique)
CuSO ₄	CuSO ₄ .5H ₂ O (UCB, Belgique)
Etuve	Etuve à 37°C et 5% CO ₂ (HERAcell 240, Qlab, Belgique)

Tableau II- 3 : Matériel et solutions nécessaires pour l'incubation des fibroblastes WI-38 avec du Trolox.

Boîtes de culture	Boîtes de culture 25 cm ² (T25), 75 cm ² (T75) (Corning, USA)
Milieu de culture complet	- Basal Medium Eagle (BME , Gibco-Invitrogen, UK) - 2 mM L-glutamine (Gibco-Invitrogen, UK) - 10 % de sérum de veau fœtal (FBS, Gibco-Invitrogen, UK)
Milieu de rinçage	Phosphate Buffer Saline stérile (PBS, Lonza, Belgique)
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox, Sigma, Allemagne)
Etuve	Etuve à 37°C et 5% CO ₂ (HERAcell 240, Qlab, Belgique)

2. Incubation des fibroblastes WI-38 avec du CuSO₄

2.1. Matériel

Tableau II-2

2.2. Méthode

24 h après l'ensemencement (voir section 1.2.2), les cellules sont incubées avec du milieu de culture contenant 500 µM de CuSO₄ pendant 16 h dans l'étuve à 37°C et à atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Pour mettre fin à l'incubation au CuSO₄, les cellules sont rincées avec du PBS et sont ensuite mises en contact avec du milieu complet. Les cellules « contrôles » subissent le même traitement, sans ajout de CuSO₄.

3. Incubation des fibroblastes WI-38 avec du Trolox

3.1. Principe

Afin de diminuer le stress oxydatif potentiel ayant lieu dans la cellule suite à une incubation avec du CuSO₄, les fibroblastes vont être incubés en présence ou non d'un antioxydant. Nous avons utilisé un antioxydant synthétique dont la structure moléculaire cyclique est semblable à celle de la vitamine E, l'acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique ou Trolox.

3.2. Matériel

Tableau II-3

3.3. Méthode

16 h après l'ensemencement (voir section 1.2.2), le milieu est remplacé par du milieu frais contenant 100 µM de Trolox. Les cellules sont pré-incubées pendant 8 h avec le Trolox. Après ce délai d'incubation, les cellules sont incubées à nouveau avec du milieu frais contenant 100 µM de Trolox ainsi que 500 µM de CuSO₄ pendant 16 h dans l'incubateur de culture cellulaire. Les conditions « contrôles » subissent le même traitement 1) sans Trolox ni CuSO₄, 2) sans Trolox mais avec 500 µM de CuSO₄ et 3) avec 100 µM de Trolox mais sans CuSO₄.

4. Test de viabilité cellulaire (MTT assay)

4.1. Principe

Ce test permet une évaluation indirecte de la viabilité cellulaire en se basant sur l'activité d'une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Les cellules métaboliquement actives vont incorporer le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium) et la succinate déshydrogénase va cliver le MTT en son dérivé formazan visible sous la forme de cristaux insolubles en milieu aqueux. En présence d'une molécule toxique, le nombre de cellules pouvant cliver le MTT va diminuer et une corrélation peut être établie entre la quantité de MTT réduit et la viabilité cellulaire.

Tableau II- 4 : Matériel et solutions nécessaires pour la réalisation d'un test de viabilité cellulaire.

Boîtes de culture	Boîtes de culture 25 cm ² (T25), 75 cm ² (T75) (Corning, USA)
Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT)	2,5 mg/ml PBS (Sigma, Allemagne)
PBS	Phosphate Buffer Saline stérile (PBS, Lonza, Belgique)
Milieu de culture complet	- Basal Medium Eagle (BME, Gibco-Invitrogen, UK) - 2 mM L-glutamine (Gibco-Invitrogen, UK) - 10 % de sérum de veau fœtal (FBS, Gibco-Invitrogen, UK)
Solution de lyse SDS 30 % pH=7,4	- 30 % SDS : 2 volumes dilués dans H ₂ O distillée et chauffé à 37°C (Merck, Allemagne) - N,N-dimethyl-formamide : 1 volume (Janssen chimica, Belgique)
Spectrophotomètre (Bio-rad, microplate spectrophotometer, USA)	

Tableau II- 5 : Matériel et solutions nécessaires pour une extraction protéique totale avec tampon DLA.

Boîtes de culture	Boîtes de culture 25 cm ² (T25) (Corning, USA)
Milieu de rinçage	Phosphate Buffer Saline stérile (PBS, Lonza, Belgique)
PIC	1 tablette de PIC (complete protease inhibitor cocktail tablets, Roche, Allemagne) à dissoudre dans 2 ml H ₂ O distillée
Tampon de lyse	<u>Tampon DLA</u> - Urée : 7M (Merck, Allemagne) - Thiourée : 2M (Merck, Allemagne) - Chaps : 4% (Sigma, Allemagne) - Tris 30 mM (Merck, Allemagne) - DTT 60 mM à partir de DTT 1M (Sigma, Allemagne) - PIC 1,6 % (1,6µl/ml)
Racloirs de 24 mm (Soyagreentec, Corée)	
Microtubes de 1,5 ml (Sarstedt, Allemagne)	
Centrifugeuse 5415R (Eppendorf, Allemagne)	
Agitateur thermomixte confort (Eppendorf, Allemagne)	
Machine à ultrasons Branson 1510 Ultrasonic Cleaner (Branson, USA)	

4.2. Matériel

Tableau II-4

4.3. Méthode

Après l'ensemencement (voir section 1.2.2), la survie cellulaire est mesurée à 0 ou 24 h après l'arrêt de l'incubation avec le CuSO_4 et/ou avec le Trolox grâce à ce test. Les cellules sont rincées avec du PBS et incubées avec du MTT et du milieu de culture complet (1:1) durant 2 à 4 h dans l'incubateur de culture cellulaire. Le surnageant est retiré et du tampon de lyse est ajouté dans chaque boîte de culture. Les cellules sont alors incubées pendant minimum 1 h en chambre chaude à 37°C , sur agitateur, pour permettre la lyse des cellules et la solubilisation des cristaux. Après cette phase, chaque homogénat est alors placé dans une plaque 24 puits qui sera lue à 570 nm par le lecteur de microplaques.

5. Western-blot

5.1. Principe

Le Western-blot est une technique semi-quantitative permettant de détecter la présence d'une protéine d'intérêt dans un extrait cellulaire pour plusieurs conditions. Les extraits protéiques obtenus vont être séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS), un détergent dénaturant qui va conférer à la protéine une charge globale négative. La migration des protéines s'effectue grâce à l'application d'un champ électrique dans la cuve et leur séparation se fera en fonction de leur poids moléculaire. A la fin de la migration, les protéines sont transférées depuis le gel de polyacrylamide sur une membrane grâce à une différence de potentiel. Les protéines vont s'adsorber sur la membrane de transfert. La membrane est ensuite incubée avec une solution contenant l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt. Une solution contenant l'anticorps secondaire couplé à un système de révélation sera utilisée pour révéler la présence de l'anticorps primaire sur la membrane. L'anticorps secondaire reconnaît le fragment Fc de l'anticorps primaire qui est utilisé et est visualisé grâce à un système de révélation à chimioluminescence.

5.2. Extraction protéique totale

5.2.1. Matériel

Tableau II-5

5.2.2. Méthode

Les extraits protéiques totaux sont préparés à partir de fibroblastes ensemencés à une densité de 14 000 cellules/cm² incubés ou non avec du CuSO_4 500 μM . Après 16 h d'incubation, les fibroblastes WI-38 sont tout d'abord rincés une fois avec 5 ml de PBS glacé. Les cellules sont ensuite raclées dans 50 μl de PBS froid à l'aide d'un racloir de 24 mm. Le lysat cellulaire est transféré dans un microtube qui sera placé sur glace. Les cellules sont centrifugées à 4°C et 2000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est éliminé à la pipette. Après centrifugation le culot est resuspendu dans 50 μl de tampon de lyse contenant un mélange d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases, ainsi qu'un détergent permettant la lyse des cellules. Les échantillons sont alors placés sur agitateur pendant 25 min à température ambiante. Après l'agitation, les échantillons seront soniqués 2 min à température ambiante. Les lysats sont ensuite centrifugés 15 min à 13 000 rpm à température ambiante. Les surnageants seront récupérés, aliquotés et conservés à -70°C .

Tableau II- 6 : Matériel et solutions nécessaires pour l'extraction nucléaire.

Boîtes de culture	Boîtes de culture 75 cm ² (T75) (Corning, USA)
PBS	<u>Pour 1 l :</u> - 9 g de NaCl (Merck, Allemagne) - 20 ml tampon phosphate 0,5 M pH 7,4 - H ₂ O distillée
Mélange	- 100 ml PBS - 24 mg Na ₂ MoO ₄ (Sigma, USA) - 21 mg NaF (Merck, Allemagne)
Tampon hypotonique (HB) 10x	<u>Pour 1 l :</u> - 2,1 g NaF 50 mM (Merck, Allemagne) - 2,42 g Na ₂ MoO ₄ 10 mM (Sigma, USA) - 47,5 g Hepes 200 mM (Acros Organics, Belgique) - 0,37 g EDTA 1 mM (Merck, Allemagne) Mise à pH=7,9
Tampon de lyse 0,5% NP-40	- 10 ml HB 10x - 500 µl NP-40 (Sigma, USA) - 89,5 ml H ₂ O distillée
Tampon RE	- 10 ml HB 10x - 20 ml glycerol 87% (Sigma, USA) - 70 ml H ₂ O distillée
Tampon SA (0,8 M NaCl)	- 10 ml HB 10x - 20 ml glycerol 87% (Sigma, USA) - 20 ml NaCl 4% (7,01 g/30 ml H ₂ O distillée, Merck, Allemagne) - 50 ml H ₂ O distillée
PIC	1 tablette de PIC (complete protease inhibitor cocktail tablets, Roche, Allemagne) à dissoudre dans 2 ml H ₂ O distillée
PIB	<u>10 ml de Phosphatase Inhibitor Buffer :</u> - 25 mM de Na ₃ VO ₄ (Sigma, USA) - 250 mM de p-nitrophenylphosphate (Sigma, USA) - 250 mM β-glycérophosphate (Sigma, USA) - 125 mM NaF (Merck, Allemagne)
RE complet	- 1 ml tampon RE - 40 µl PIC - 40 µl PIB
SA complet	- 1 ml tampon SA - 40 µl PIC - 40 µl PIB
Roue (Rotator SB2, Stuart, UK)	
Racloirs de 48 mm (SPL Lifesciences, Corée)	
Microtubes de 1,5 ml (Sarstedt, Allemagne)	
Centrifugeuse 5415R (Eppendorf, Allemagne)	

Tableau II- 7 : Matériel et solutions nécessaires pour un dosage protéique par la méthode de Pierce.

Etalon BSA	Bovine Serum Albumine, 2 mg/ml (Thermo Fisher Scientific, USA)
Réactif de Pierce 660 nm Protein Assay (Sigma, Allemagne)	
Plaques 96 puits Elisa (Greiner bio-one, Autriche)	
Microplate Reader (Bio-rad microplate spectrophotometer, USA)	
H ₂ O distillée	

5.3. Extraction protéique nucléaire

5.3.1. Matériel

Tableau II-6

5.3.2. Méthode

Les extraits nucléaires sont préparés à partir de fibroblastes WI-38 ensemencés à une densité de 14 000 cellules/cm² incubés avec ou sans CuSO₄ dans une T75 (voir section 1.2.2). Après 16 h d'incubation, l'extraction nucléaire est réalisée sur glace. Les cellules sont rincées une fois avec du mélange (PBS froid contenant du NaF 5 mM et du Na₂MoO₄ 1mM). Les cellules sont ensuite incubées avec 10 ml de tampon hypotonique (tampon HB) pendant 8 à 10 min afin de fragiliser la membrane cellulaire. Le tampon hypotonique est ensuite décanté et 100 µl de tampon de lyse sont ajoutés. Les cellules sont raclées et l'homogénat obtenu est récolté dans un microtube pour être ensuite centrifugé à 13 000 rpm pendant 30 secondes. Après centrifugation, le surnageant contient les protéines cytoplasmiques, qui pourront être récupérées dans un microtube, et le culot, les protéines nucléaires. Le culot est resuspendu dans 25 µl de RE complet et ensuite dans 25 µl de SA complet. Par la suite, les microtubes sont placés sur une roue pendant 30 min à 4°C avant d'être centrifugés 10 min à 13 000 rpm et à 4°C. Le surnageant qui contient les protéines nucléaires est récolté, aliquoté et conservé à -70°C.

5.4. Dosage protéique par la méthode de Pierce

5.4.1. Matériel

Tableau II-7

5.4.2. Méthode

La liaison du réactif de Pierce aux protéines va induire un changement de coloration du réactif. Ce changement de couleur est dû à une déprotonation de la sonde suite à des interactions avec les acides aminés chargés positivement des protéines. Une courbe d'étalonnage de l'albumine sérique bovine (BSA) est réalisée pour pouvoir calculer la concentration protéique de chaque échantillon. Pour chaque échantillon protéique, 1 µl d'extrait protéique et 9 µl d'eau sont disposés dans les puits d'une plaque 96 puits. Un blanc avec l'eau ainsi qu'un blanc avec le tampon de lyse sont réalisés. Les dosages sont réalisés en duplicat. 150 µl du réactif de Pierce est ajouté dans chaque puits et la lecture s'effectue à 660 nm, 5 min après l'ajout du réactif [90].

Tableau II- 8 : Matériel et solutions utilisés lors de la préparation des échantillons pour le Western-blot NuPAGE.

Bleu de charge	- 100 µl de LDS Sample Buffer 4x (Invitrogen, USA) - 5 µl DTT (Merck, Allemagne)
Centrifugeuse (Centrifugeuse 5702, Eppendorf, Allemagne)	
Protéine prion recombinante (rhu-PrP ^c pour Recombinant human prion protein, His-tagged, catalog number 0101000301, AJ-Roboscreen, Allemagne)	
Bloc chauffant (Dri-Blocks heaters, Techne, UK)	

Tableau II- 9 : Matériel et solutions nécessaires pour la migration des échantillons pour le Western-blot NuPAGE.

Tampon de migration	<u>Solution 1</u> : 50 ml de SDS running buffer MOPS (Invitrogen, USA) + 950 ml H ₂ O distillée <u>Solution 2</u> : 200 ml solution 1 + 500 µl d'antioxydant (Invitrogen, USA)
Gel Nu-PAGE	4-12% Bis-Tris (MOPS), 10 puits, 1,5 mm (Invitrogen, USA)
Etalon	SeeBlue® Plus2 Prestained Standart (Invitrogen, USA)
Cuve d'électrophorèse (Novex minigel-cell, Invitrogen, USA)	
Générateur (Power Pac 300, Bio-Rad Laboratories, Canada)	

Tableau II- 10 : Matériel et solutions nécessaires pour le transfert.

Tampon de transfert	<u>Pour 200 ml</u> : - 10 ml stock 20x (NP0006) (Invitrogen, USA) - 40 ml méthanol (Thermo Fisher Scientific, USA) - 200 µl antioxydant (Invitrogen, USA) - H ₂ O distillée
Membrane de transfert	PVDF (Amersham Hybon-P, GE Healthcare, UK)
Appareil de transfert (Amersham Biosciences, USA)	
Papier Whatman (Merck, Allemagne)	

5.5. Western-blot NuPAGE

5.5.1. Préparation des extraits

5.5.1.1. *Matériel*

Tableau II-8

5.5.1.2. *Méthode*

Une fois les échantillons préparés (voir 5.2 et 5.3), et dosés (voir 5.4), des volumes correspondant à 20 µg de protéines pour chaque échantillon sont préparés. 5 µl de bleu de charge pour NuPAGE contenant du dithiothréitol (DTT) sont ajoutés au 15 µl contenant l'échantillon. L'étalon de poids moléculaire sera chargé dans un des puits pour estimer le poids moléculaire des bandes correspondantes à la protéine d'intérêt. Le DTT est un agent réducteur responsable de la réduction des ponts disulfures des protéines de l'échantillon permettant, dès lors, leur dénaturation. Les échantillons sont alors placés sur le bloc chauffant à 70°C durant 10 min. Ils sont centrifugés brièvement avant d'être chargés de manière asymétrique sur le gel.

5.5.2. Migration

5.5.2.1. *Matériel*

Tableau II-9

5.5.2.2. *Méthode*

Les échantillons sont séparés sur un gel NuPAGE 4-12% Bis-Tris (MOPS). L'étalon de poids moléculaire permet une visualisation plus aisée des poids moléculaires des protéines d'intérêt dans la gamme de 4 à 250 kDa. Le gel est disposé dans une cuve d'électrophorèse et du tampon de migration est ajouté dans le compartiment intérieur. Les échantillons ainsi que l'étalon de poids moléculaire sont chargés dans les différents puits. Le volume restant de tampon de transfert est ajouté dans la cuve. La cuve est reliée au générateur et la migration du gel s'effectue à 200 V, 400 mA et 40 W pendant environ 35 min.

5.5.3. Transfert

5.5.3.1. *Matériel*

Tableau II-10

5.5.3.2. *Méthode*

Lorsque la migration se termine, une membrane PVDF (PolyVinylidèneDiFluoride) ainsi que des papiers Whatman sont découpés à la grandeur du gel. Après la migration des échantillons, le gel est démoulé puis placé dans un système de sandwich, à l'intérieur de l'appareil de transfert. Le gel est placé sur une membrane hydrophobe préalablement hydratée dans du méthanol 100 % pendant une min pour son activation, puis équilibrée dans du tampon de transfert durant 15 min. Deux papiers Whatman imprégnés de tampon de transfert seront placés de part et d'autre du montage gel/membrane. Le sandwich obtenu est alors placé dans un appareil de transfert, en veillant à éliminer les bulles d'air se trouvant entre chaque couche. En effet, celles-ci pourraient gêner le passage du courant et perturber le transfert des protéines se trouvant sur le gel. La membrane est soumise à un courant de 5 V et 150 mA pendant 2 h.

Tableau II- 11 : Matériel et solutions nécessaires pour le traitement de la membrane.

Tampon TBS 10X (pH=7,4)	<u>Pour 1 l</u> : - Tris : 24,22 g/l (Merck, Allemagne) - NaCl : 80,06 g/l (Merck, Allemagne)
TBS 0,1% Tween-20	<u>Pour 1 l</u> : - 100 ml TBS 10x - 900 ml d'H ₂ O distillée - 1 ml de Tween-20 (Sigma, Allemagne)
Agent bloquant	- 2 g de lait amersham (ECL Advance blocking agent, Amersham GE Healthcare, UK) - 40 ml TBS-tween
Solutions de révélation	Solution A + Solution B (Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit, Amersham Biosciences, UK)
Appareil de révélation	Imagequant350 (General Electric Healthcare, Belgique).

Tableau II- 12 : Anticorps primaires utilisés lors du Western-blot.

Anticorps	PM (kDa)	Type	Dilution	Origine	Référence
α -tubuline	55	Monoclonal	1/200 000	Souris	Sigma, #T5168, USA
Anti-bovine prion protein mab 4F7	21-36	Monoclonal	1/2000	Souris	ajRoboscreen, #0102000701, Allemagne
HO-1	33	Monoclonal	1/2000	Lapin	Abcam, ab52947-100, UK
Nrf2	68	Polyclonal	1/2000	Lapin	Abcam, ab31163-500, UK
NQO1	30	Monoclonal	1/2000	Souris	Abcam, ab28947-100, UK

Tableau II- 13 : Anticorps secondaires utilisés lors du Western-blot.

Anticorps	Dilution	Référence
Anti-souris	1/200 000	HRP-coupled anti-mouse, Amersham Biosciences, UK
Anti-lapin	1/200 000	HRP-coupled anti-rabbit, Amersham Biosciences, UK

5.5.4. Traitement de la membrane et système de révélation

5.5.4.1. Matériel

Tableau II-11

5.5.4.2. Méthode

Une fois le transfert terminé, la membrane sur laquelle les protéines ont été transférées est placée dans une solution de TBS contenant 1% de Tween-20 (Polyéthylène Sorbitan Monolaurate) ainsi que 2% d'agent bloquant pendant 2 h à température ambiante. Cette première étape permet de bloquer les sites de liaison non spécifiques des anticorps, afin de limiter le bruit de fond. La membrane est alors incubée 2 h à température ambiante ou la nuit à 4°C dans une solution d'agent bloquant et de TBS-Tween 1% contenant l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt dilué à une concentration optimale. La liste des anticorps utilisés lors de ce mémoire ainsi que leurs dilutions sont repris dans le tableau II-12. La détection de α -tubuline est utilisée comme contrôle de charge. Des extraits purifiés de protéine prion recombinante (dilution 40 000 fois) synthétisés *in vitro* sont utilisés pour contrôler la liaison spécifique de l'anticorps aux protéines PrP^c. Après le temps d'incubation, les membranes sont rincées trois fois avec du TBS-Tween 1% pendant 20 min. La liaison de l'anticorps primaire est visualisée grâce aux anticorps secondaires couplés à une peroxydase de Raifort. Les anticorps utilisés sont repris dans le tableau II-13. La membrane est ensuite rincée trois fois avec du TBS-Tween 1% durant 20 min avant d'être mise en contact avec la solution de révélation. L'ImageQuant 350 Digital Imaging System permet de révéler les différentes bandes qui correspondent aux protéines d'intérêt.

6. Immunofluorescence

6.1. Principe

Le marquage en immunofluorescence est une technique qualitative permettant de détecter la localisation subcellulaire de protéines d'intérêt grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques et l'émission de fluorescence. Cette technique se base sur l'utilisation de deux types d'anticorps : l'anticorps primaire qui est spécifique de la protéine d'intérêt, et l'anticorps secondaire, couplé à un fluorochrome excitable à une longueur spécifique qui va cibler l'anticorps primaire. La sonde Alexa est fluorescente et a la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse et de la réémettre sous forme de photons dans le vert (488 nm) par exemple, de façon à reconstituer une image lors de l'observation au microscope confocal.

6.2. Matériel

Tableau II-14

6.3. Méthode

Le marquage en immunofluorescence est réalisé sur des fibroblastes WI-38ensemencés sur des couvre-objets stériles déposés dans une plaque 24 puits (voir section 1.2.2). 24 h après l'ensemencement, les cellules sont incubées avec du CuSO₄. 16 h après l'incubation au CuSO₄, les puits sont décantés, les cellules sont rincées avec du PBS froid avant d'être fixées pendant 10 min à température ambiante avec du paraformaldéhyde 4%.

Tableau II- 14 : Matériel et solutions nécessaires pour le marquage en immunofluorescence.

Tampon phosphate 0,5 M pH=7,4	- 800 ml KH ₂ PO ₄ 0,5 M (Merck, Allemagne) - Mise à pH=7,4 à l'aide de K ₂ HPO ₄ 0,5 M (Merck, Allemagne)
Milieux de rinçage	<u>PBS (pour 1l) :</u> - 9 g NaCl (Merck, Allemagne) - 20 ml de tampon phosphate (0,5 M) pH 7,4 - H ₂ O distillée
BSA 3%	<u>Pour 100 ml :</u> - 3 gr de BSA (Bovine Serum Albumin, PAA Laboratories, Allemagne) - 100 ml PBS
Paraformaldéhyde 4%	- 4 g de PFA (Merck, Allemagne) - 100 ml PBS
Triton X-100 1%	- 0,2 g triton (Merck, Allemagne) - 20 ml PBS
Plaque 24 puits (Corning, USA)	
Lamelles couvre-objets -13 mm de diamètre (Assistent, Allemagne)	
Lames porte-objets 26x76 cm (Superfrost, VWR International, USA)	
Topro-3 (Invitrogen Molecular Probes, USA)	
Solution de RNase 2mg/ml enPBS (Ribonuclease beef pancreas, ICM, Allemagne)	
Mowiol (Sigma, Allemagne-UK)	
Microscope confocal à fluorescence (Leica, Allemagne)	

Tableau II- 15 : Liste des anticorps primaires utilisés pour le marquage en immunofluorescence.

Anticorps primaire	Type	Dilution	Origine	Référence
Anti-bovine prion protein mab 4F7	Monoclonal	1/500	Souris	ajRoboscreen, #0102000701, Allemagne
HO-1	Monoclonal	1/500	Lapin	Abcam, ab52947-100, UK
Nrf2	Polyclonal	1/500	Lapin	Abcam, ab31163-500, UK
NQO1	Monoclonal	1/500	Souris	Abcam, ab28947-100, UK

Tableau II- 16 : Liste des anticorps secondaires utilisés pour le marquage en immunofluorescence.

Anticorps secondaire	Dilution	Référence
Mouse IgG	1/500	Alexa 488 anti-mouse conjuguates, Molecular probes, USA
Rabbit IgG	1/500	Alexa 488 anti-rabbit conjuguates, Molecular probes, USA

Après 3 rinçages au PBS frais, les cellules sont perméabilisées avec du Triton X-100 1% dilué dans du PBS pendant 5 min à température ambiante. La perméabilisation est nécessaire pour favoriser la pénétration des anticorps dans la cellule. Après le temps d'incubation, les cellules sont rincées trois fois dans du PBS contenant 3% de BSA afin de bloquer les sites non spécifiques.

Les cellules sont ensuite incubées dans une chambre humide, dans laquelle est déposé un parafilm sur un papier whatman humidifié. Les couvre-objets sont déposés sur 40 μ l d'anticorps primaire dilué dans du PBS-BSA 3%. Les cellules sont incubées durant 2 h à température ambiante. Les anticorps utilisés sont recensés dans le tableau II-15.

Après l'incubation, les lamelles sont replacées dans les puits et sont rincées trois fois au PBS-BSA 3%. La liaison des anticorps primaires est visualisée grâce à des anticorps secondaires couplés à des sondes fluorescentes Alexa. Les anticorps utilisés sont recensés dans le tableau II-16. Les couvre-objets sont ensuite placés sur une goutte de 40 μ l d'anticorps secondaire dilué dans du PBS-BSA 3% pendant 1 h à température ambiante et à l'obscurité, pour préserver les propriétés du fluorochrome.

Après le temps d'incubation, les couvre-objets sont rincés 3 fois au PBS-BSA 3% et une fois avec du PBS seul. Le noyau est ensuite marqué au Topro-3. Les couvre-objets sont mis en présence de 40 μ l de Topro-3 dilué 80x dans une solution de RNase 2mg/ml en PBS durant 35 min à température ambiante et dans l'obscurité.

Enfin, les cellules sont rincées trois fois avec du PBS avant d'effectuer le montage des couvre-objets sur les lames porte-objet à l'aide d'une goutte de Mowiol préchauffé à 57 °C. Les lamelles sont incubées au minimum une nuit à 4°C. Les cellules sont observées et analysées grâce à un microscope confocal en fluorescence équipé des filtres appropriés.

7. RT-PCR quantitative en temps réel

7.1. Principe

La qRT-PCR (Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) en temps réel est une technique qui permet de quantifier l'abondance relative d'un ARNm d'un gène donné de manière spécifique. L'ARNm des cellules qu'on souhaite quantifier est isolé et va subir une transcription inverse en ADN complémentaire (ADNc) par une transcriptase inverse. L'ADNc obtenu est beaucoup plus stable que l'ARN et est ensuite amplifié par PCR à l'aide de nucléotides et d'amorces spécifiques des gènes qu'on souhaite étudier. La quantification de l'amplification est rendue possible grâce à l'utilisation du SYBR Green, un agent intercalant qui va s'immiscer entre les brins de l'ADNc et émettre un signal fluorescent qui augmentera de façon proportionnelle au nombre de copies d'ADN au cours de la PCR. La quantité d'amplicons produits pendant la réaction est donc mesurable par la fluorescence émise. Cependant, le SYBR Green s'intercale de façon non spécifique dans l'ADN double brin. Afin d'assurer la spécificité de l'amplicon, les échantillons sont soumis à une chute brutale de température (de 95°C à 60°C), ce qui va permettre la dissociation des amplicons. Cette dissociation est associée à une chute brutale de la fluorescence. La détection d'un seul pic implique l'existence d'une seule population d'amplicons présente dans nos échantillons. La quantification est basée sur la notion de cycle seuil ou Ct (Cycle Threshold). Le cycle seuil est atteint lorsque la fluorescence émise est supérieure au bruit de fond. Le Ct est inversement proportionnel à la quantité d'ADN initial. Plus il est faible, plus il y avait d'ARNm avant la réaction d'amplification. Les résultats obtenus sont ensuite normalisés grâce à la valeur d'un

Tableau II- 17: Matériel et solutions nécessaires pour l'extraction d'ARN totale.

SDS 10 % (MP Biomedicals, France)	<u>Pour du SDS 1% (1 l) :</u> - 100 ml de SDS 10 % - 900 ml d'H ₂ O distillée
Tampon de lyse	Tri Reagent solution (Applied Biosystems, USA)
Racloirs de 24 mm (Soyagreentec, Corée)	
Chloroforme RNase free (Sigma, USA)	
Isopropanol 100 % RNase free (Merck, Allemagne)	
Ethanol 75% RNase free (Merck, Allemagne)	
Eau RNase free (Promega, Belgique)	
Microtubes RNase free de 1,5 ml (Sarstedolt, Allemagne)	
PBS RNase free (Lonza, Belgique)	

Tableau II- 18 : Matériel et solution nécessaires au dosage de l'ARN.

SDS 10 % (MP Biomedicals, France)	<u>Pour du SDS 1% (1 l) :</u> - 100 ml de SDS 10 % - 900 ml d'H ₂ O distillée
Eau RNase free (Promega, Belgique)	
Spectrophotomètre (Eppendorf Biophotometer, Eppendorf, Allemagne)	

« housekeeping gene » dont l'expression ne varie pas dans les conditions expérimentales utilisées. Les valeurs obtenues après normalisation vont permettre la comparaison de l'abondance relative des ARNm des gènes d'intérêt dans les différentes conditions expérimentales en considérant les conditions contrôles comme égales à 1.

7.2. Extraction d'ARN

7.2.1. Matériel

Tableau II-17

7.2.2. Méthode

L'extraction d'ARN se déroule en condition « RNase free » afin d'éviter la dégradation de l'ARN par les RNases. Tout le matériel est nettoyé au SDS 1% avant utilisation. A différents temps après l'incubation au CuSO₄, l'ARN total des fibroblastes WI-38 a été extrait grâce au protocole du « TRI Reagent Solution ». Les boîtes de culture sont décantées sur glace avant d'être rincées 2 fois avec 5 ml de PBS RNase free. Après avoir bien décanté les boîtes de culture, les cellules sont ensuite raclées dans 300 µl de TRI Reagent Solution à l'aide d'un racloir de 24 mm. Le lysat cellulaire obtenu est collecté dans un microtube qu'on laisse incuber pendant 5 min à température ambiante. On ajoute alors 65 µl de chloroforme « RNase free » et on agite fortement au vortex les échantillons pendant 15 secondes. Les échantillons sont ensuite incubés 15 min à température ambiante avant d'être centrifugés à 12 000 g pendant 15 min et à 4°C. Cette centrifugation permet la séparation des échantillons en différentes phases : la phase supérieure qui contient l'ARN, la phase intermédiaire ou couronne de protéines qui contient les protéines et la phase inférieure qui contient les molécules lipidiques. La phase supérieure est récoltée dans un nouveau microtube. Un volume d'isopropanol « RNase free » égal au volume prélevé est ajouté et on homogénéise le tout par inversion avant d'agiter fortement au vortex. L'isopropanol permet de précipiter l'ARN. Les échantillons sont incubés 10 min à température ambiante puis centrifugés à 12 000 g et à 4°C pendant 10 min. Le surnageant est décanté et le culot est rincé avec 500 µl d'éthanol 75% « RNase free » afin de le purifier. Les échantillons sont centrifugés pendant 5 min à 7600 g et à 4°C. Le surnageant est décanté et le culot d'ARN est séché 10 min à température ambiante pour enlever l'éthanol. Le culot d'ARN est resuspendu dans 20 µl d'eau « RNase free » et le microtube est placé durant 10 min à 55°C afin de favoriser la resuspension.

7.3. Dosage de l'ARN

7.3.1. Matériel

Tableau II-18

7.3.2. Méthode

Un dosage de l'ARN après extraction est effectué au spectrophotomètre. 2 µl de la resuspension d'ARN sont placés dans 98 µl d'eau. La concentration en ARN présent dans les échantillons en déterminant la concentration et la pureté des échantillons. Pour ce faire, l'absorbance va être mesurée à 230, 260 et 280 nm. Le ratio entre les deux absorbances doit être au minimum égal à 1,5, la pureté idéale de l'ARN étant égale à 2. En effet, le ratio 260/230 renseigne sur la proportion d'acides nucléiques par rapport à la quantité de sels, et le ratio 260/280 indique la proportion d'acides nucléiques par rapport à la quantité de protéines. La concentration en ARN (ng/ml) peut être calculée à partir des valeurs de l'absorbance automatiquement grâce au spectrophotomètre.

Tableau II- 19 : Matériel et solutions nécessaires pour la reverse transcription.

Kit "First Strand cDNA synthesis" (Roche, USA)	<ul style="list-style-type: none"> - Primers oligo(dT) - dNTP mix - Buffer RT 5x - Ribonuclease inhibitor - Reverse Transcriptase - Eau RNase free (Promega, Belgique)
Tips à filtres (Sorenson, Bioscience, USA)	

Tableau II- 20 : Matériel et solutions utilisés lors de la qRT-PCR en temps réel.

SYBR Green PCR Master Mix (Applied biosystems, USA; Roche, USA)
Plaque 96 puits (Microamp optical reaction plate, Applied Biosystems, USA)
H ₂ O distillée
Microtubes RNase free de 1,5 ml (Sarstedolt, Allemagne)
Tips à filtres RNase free (Sorenson, Bioscience, USA)
Films plastiques (Optical Adhesive Covers, Applied Biosystems, USA)
Logiciel 7000 SDS (Sequence Detection System, Applied Biosystems, USA)

Tableau II- 21 : Liste des amorces utilisées lors de la PCR en temps réel ainsi que leurs dilutions respectives (IDT, USA ; Applied Biosystems, USA).

Genes	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	Dilution (nM)
23 kDa	GCC TAC AAG AAA GTT TGC CTA	TGA GCT GTT TCT TCT TCC GGT AGT	300/300
PrP ^C	ATG ATG GAG CGC GTC GTT	CAT GCT CGA TCC TCT CTG GTA A	300/300
p21 ^{WAF-1}	CTG GAG ACT CTC AGG GTC GAA	CCA GGA CTG CAG GCT TCC T	300/300
ApoJ	GGA TGA AGG ACC AGT GTG ACA	CAG CGA CCT GGA GGG ATTC	300/300
Fibronectine	TGT GGT TGC CTT GCA CGAT	ATC TAG GGC CGA ATT CGC TTC	900/900
Osteonectine	GAG ACC TGT GAC CTG GAC AAT G	GGA AGG AGT GGA TTT AGA TCA CAAGA	300/300
CTGF	CAA GCT GCC CGG GAA AT	GGA CCA GGC AGT TGG CTC TA	300/300
IGFBP3	CAG AGC ACA GAT ACC CAG AAC	CAC ATT GAG GAA CTT CAG GTG	300/300
TGF-β1	AGG GCT ACC ATG CCA ACT TCT	CCG GGT TAT GCT GGT TGT ACA	900/900
Nrf2	GCGACGGAAAGAGTATGAC	GTTGGCAGATCCACTGGTTT	300/300
HO-1	CCA GCA ACA ATG TGC AAG ATT	CAC ATG GCA TAA AGC CCT ACA	300/300
NQO1	GGGATCCACGGGACATGAATG	ATTTGAATTCGGGCGTCTGCTG	300/300
p16	GCCCAACGCGAATAGT	CGCTGCCCATCATCATGAC	300/300
p53	AAGAAACCACTGGATGGAGAA	CAGCTCTCGGAACATCTCGAA	300/300
GADD45A	CTGAGTCACGGACGATTCA	GCAGGCACAACACCACGTTA	300/300
GADD153	TCTCTGGCTTGCTGACTGA	TCCTGTTTCTCCCTTGGTCTT	300/300

7.4. Transcription inverse

7.4.1. Principe

La transcription inverse permet la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire à une matrice d'ARNm de l'échantillon grâce à de l'ADN polymérase ARN dépendante (transcriptase inverse) et des amorces poly-T. L'ADNc est plus stable que l'ARN, évitant ainsi sa dégradation.

7.4.2. Matériel

Tableau II-19

7.4.3. Méthode

2 µg d'ARN total obtenu après extraction est rétrotranscrit en ADNc en utilisant le kit « First Strand cDNA synthesis ». Ce kit contient une transcriptase inverse ainsi que des nucléotides permettant la synthèse d'ADNc à partir d'ARNm. Les échantillons sont centrifugés brièvement avant d'être incubés 10 min à 65°C puis placés sur glace pendant 5 min. Le pré-mélange de transcription inverse est ensuite préparé et 7 µl de ce pré-mélange sont ajoutés dans chaque microtube. Ensuite, les échantillons sont centrifugés brièvement puis incubés durant 30 min à 55°C puis à nouveau centrifugés brièvement. Les échantillons sont ensuite incubés à 85°C durant 5 min puis refroidis sur glace. Les échantillons seront ensuite congelés à -20°C.

7.5. qRT-PCR en temps réel

7.5.1. Matériel

Tableau II-20

7.5.2. Méthode

Pour réaliser la PCR en temps réel, des primers d'amplifications sont utilisés (voir tableau II-21). Le mélange PCR contient du SYBR Green PCR Mastermix et des primers à des concentrations optimales. Un volume de 20 µl de mélange PCR est déposé dans chaque puits de la plaque 96 puits puis 5 µl d'ADNc y sont ajoutés. La plaque est ensuite scellée, centrifugée pendant 1 min à 600 rpm avant d'être conservée à 4°C jusqu'au lancement de la réaction.

La réaction en chaîne de polymérisation s'effectue dans un appareil de qRT-PCR ABI Prism® 7000 Detection System en suivant un programme bien précis. Les échantillons sont d'abord chauffés à 95°C durant 5 min afin de dénaturer les brins d'ADNc. Les échantillons subissent ensuite 40 cycles à 95°C de 15 secondes, permettant la liaison des amorces aux brins d'ADNc ainsi que leur élongation. Pour terminer, les échantillons subiront un cycle de 1 min à 60°C, pour séparer à nouveau les brins d'ADNc nouvellement synthétisés. Le SYBR Green s'intercale entre les brins d'ADN néoformés.

Le logiciel 7000 SDS permet la quantification et l'analyse des données de fluorescence obtenues. De l'eau remplace l'échantillon dans les puits « contrôles », afin de s'assurer qu'aucune contamination par de l'ADN étranger n'a eu lieu. La mesure de l'expression du gène de référence permet la normalisation de l'expression des gènes d'intérêt. Au cours de ce travail, le « housekeeping gene » utilisé est 23kD.

Tableau II- 22 : Matériel et solutions nécessaires à la transfection.

Boîtes de culture	Boîtes de culture de 25 cm ² (T25), 75 cm ² (T75)(Corning, USA)
Milieu de transfection	<ul style="list-style-type: none"> - OptiMEM sans sérum (Gibco, UK) - Basal Medium Eagle (BME , Gibco-Invitrogen, UK) - 2 mM L-glutamine (Gibco-Invitrogen, UK) - 10 % de sérum de veau fœtal (FBS, Gibco-Invitrogen, UK)
siRNAs	<ul style="list-style-type: none"> - PrP (SMARTpool siRNA M-011101-01-0010, Dharmacon Thermo-scientific, UK) - NTS (SMARTpool siRNA D-001206-13-20, Dharmacon Thermo-scientific, UK) - DharmaFECT (Dharmacon Thermo-scientific, UK)

Tableau II- 23 : Solutions nécessaires à la détection de l'activité SA-β galactosidase.

Solution de fixation	<p><u>Pour 100 ml :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 5ml de formaldéhyde 40% (Belgiqueolabo, Belgique) - 0,4 ml de glutaraldéhyde 50% (Fluka, Pays-Bas) - 94,6 ml de PBS (Lonza, Belgique)
Tampon phosphate pH=6	<p><u>Pour 100 ml :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 87,7 ml de NaH₂PO₄ 0,1 M (Merck, Allemagne) - 12,3 ml de Na₂HPO₄ 0,1 M (Merck, Allemagne)
Solution X-gal	<ul style="list-style-type: none"> - 20 mg de X-gal (Eurogenetec, Belgique) - 1 ml de N,N-diméthylformamide (Janssen Chimica, Belgique)
Solution de coloration	<p><u>Pour 15 ml :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 3 ml de tampon phosphate pH=6 - 750 µl de Ferrocyanure de potassium 0,1 M (Merck, Allemagne) - 750 µl de ferricyanure de potassium 0,1 M (Merck, Allemagne) - 1,8 ml de NaCl 2,5 M (Merck, Allemagne) - 30 µl de MgCl₂ 1M (Merck, Allemagne) - 7,92 ml de H₂O distillée - 750 µl de solution X-gal
Méthanol (Janssen Chimica, BE)	

7.6. Analyse des résultats

On va calculer $2^{-\Delta Ct}$ pour chaque échantillon avec $\Delta Ct = Ct_{\text{gène intérêt}} - Ct_{\text{gène référence}}$. L'expression relative du transcrite par rapport au gène de référence, appelé « fold d'induction », peut donc être calculé.

8. Transfection de siRNA

8.1. Principe

Les siRNAs complexés à un agent de transfection vont rentrer dans la cellule avec pour effet l'inactivation des ARNm ciblés. Cette action empêche toute nouvelle traduction des protéines codées par ces ARNm.

8.2. Matériel

Tableau II-22

8.3. Méthode

Les cellules ont été incubées avec le siRNA correspondant au gène *Prnp* humain ou un siRNA Non-targeting smart pool (NTS) pour détecter l'existence d'effets non spécifiques durant 24 h. Les cellules sontensemencées à une densité de 12 000 cellules/cm². Les siRNAs sont mélangés à du milieu Opti-MEM sans sérum ainsi qu'à du BME additionné de 10% de FBS pour obtenir une concentration finale en siRNAs de 50 nM. Après 24 h d'incubation avec les siRNAs à 37°C dans l'étuve à atmosphère humide et à 5% CO₂, les cellules sont rincées avec du PBS et le milieu de culture est remplacé par du milieu complet standard. La viabilité cellulaire a été évaluée en réalisant un MTT avant la transfection et 96 h après la transfection.

9. Analyse des biomarqueurs de la sénescence

9.1. Activité SA-β galactosidase

9.1.1. Principe

Dimri et al. ont mis en évidence que l'activité de la β-galactosidase peut être détectée à pH=6 dans les cellules sénescents [7]. Les cellules possédant une activité SA-β-galactosidase sont facilement détectables car elles apparaissent bleues suite à l'incubation avec un substrat chromogène.

9.1.2. Matériel

Tableau II-23

9.1.3. Méthode

24 h après la fin de l'incubation avec du CuSO₄, les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits à une densité de 7000 cellules par cm². 72 h après l'arrêt de l'incubation avec le CuSO₄, le milieu de culture est décanté, et les puits sont rincés deux fois avec 2 ml de PBS. Les cellules sont ensuite fixées grâce à la solution de fixation pendant 5 min. Les cellules sont à nouveau rincées deux fois avec 2 ml de PBS. Les cellules sont incubées dans la solution de coloration pendant 16 h dans l'étuve à 37°C sans CO₂ et à l'abri de la lumière. Après l'incubation de 16 h, les cellules sont rincées deux fois avec 2 ml de PBS, ainsi que 2 fois

Tableau II- 24 : Matériel et solutions nécessaires pour la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée.

PBS	Pour 1 l : - 9 g NaCl (Merck, Allemagne) - 20 ml de tampon phosphate (0,5 M) pH 7,4 - H ₂ O distillée
BME (Flow Laboratories, UK)	
Serum Bovin foetal (Flow Laboratories, UK)	
Thymidine tritiée (NEN, USA)	
Acide Trichloroacétique (TCA) 10 % (SDS, France)	
Ethanol 70 % (SDS, France)	
Trypsine 0,25 % (Gibco, UK)	
NaOH 0,5 M (Merck, Allemagne)	
HCl 0,5 M (Merck, Allemagne)	
Ultima Gold (Perkin-Helmer, USA)	
Compteur à scintillation (Tri-carb 2100TR Liquid Scintillation Counter, Perkin-Helmer, USA)	

Tableau II- 25: Matériel et solutions nécessaires pour la mesure de la production des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS).

Plaque 24 puits (Corning, USA)
Sonde H ₂ DCF-DA (Invitrogen, UK)
PBS (Lonza, Belgique)
Fluorimètre (Fluoroskan ascent Thermo scientific, Pays-Bas)
NaOH (Merck, Allemagne)
Agitateur (IKA-Schuttler MTS, Allemagne)

avec 2 ml de méthanol. On laisse ensuite sécher les puits à température ambiante. A l'aide d'un microscope optique, on compte au minimum 400 cellules par puits ainsi que la proportion de cellules qui apparaissent en bleu parmi ces 400 cellules. Les cellules qui apparaissent bleues présentent une activité β galactosidase liée à la sénescence. La proportion de cellules positives est rapportée au nombre total de cellules comptées dans chaque puits.

9.2. Incorporation de thymidine tritiée

9.2.1. Principe

L'incorporation de thymidine tritiée ($[^3\text{H}]$ -thymidine) par les fibroblastes WI-38 permet d'estimer leur potentiel prolifératif. En effet, durant la prolifération cellulaire, la cellule va incorporer la thymidine dans son ADN, une thymine dont un atome d'hydrogène est remplacé par un atome de tritium. La radioactivité incorporée est quantifiée grâce à un compteur à scintillation. Les données sont normalisées à la quantité de protéines déterminée par le dosage de Pierce.

9.2.2. Matériel

Tableau II-24

9.2.3. Méthode

24 h après l'incubation avec le CuSO_4 , les cellules sontensemencées dans une plaque 24 puits à une densité de 7000 cellules par cm^2 . 24 h après l'ensemencement, les cellules sont mises en contact avec 1 ml de milieu complet auquel on ajoute 1 μl de $[^3\text{H}]$ -thymidine. La plaque est placée dans l'incubateur de culture cellulaire pendant 24 h. Les cellules sont rincées deux fois avec 1 ml de PBS, une fois avec 1 ml d'acide trichloracétique 10 % glacé (TCA), une fois avec 1 ml d'éthanol à 70% et une fois avec 1 ml de PBS dans des conditions de biosécurité, vu qu'on travaille en radioactivité. Les cellules sont ensuite lysées avec 250 μl de NaOH 0,5 M. Cette solution est neutralisée par l'ajout de 250 μl d'HCl 0,5 M. Après homogénéisation, le lysat cellulaire est placé dans une fiole et 5 ml d'Ultima Gold y est finalement ajouté. Ce réactif va permettre de convertir la radioactivité présente dans la fiole en énergie lumineuse qui sera mesurée grâce au compteur à scintillation.

10. Mesure de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS)

10.1. Principe

Une sonde sensible aux dérivés réactifs de l'oxygène a été utilisée : la sonde $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate). Cette sonde peut être oxydée par les ROS et former un composé fluorescent qui sera mesuré au fluorimètre. De cette manière, la fluorescence mesurée dépend de la quantité de ROS présente dans la cellule. Cette méthode permet d'estimer s'il y a ou non un stress oxydatif à l'intérieur de la cellule.

10.2. Matériel

Tableau II-25

Tableau II- 26 : Matériel et solutions utilisés pour l'incorporation de la sonde Coppersensor 1.

Plaque 24 puits (Corning, USA)	
Lamelles couvre-objets – 13 mm de diamètre (Assistent, Allemagne)	
Tampon phosphate 0,5 M pH=7,4	- 800 ml KH_2PO_4 0,5 M (Merck, Allemagne) - Mise à pH=7,4 à l'aide de K_2HPO_4 0,5 M (Merck, Allemagne)
Milieux de rinçage	<u>PBS (pour 1l) :</u> - 9 g NaCl (Merck, Allemagne) - 20 ml de tampon phosphate (0,5 M) pH 7,4 - H_2O distillée
Sonde CS-1 (reçu de Dylan Domaille, Berkley, USA)	
Lames porte-objets 26x76 cm (Superfrost, VWR International, USA)	
Mowiol (Sigma, Allemagne-UK)	
Microscope confocal à fluorescence (Leica, Allemagne)	

10.3. Méthode

Après ensemencement dans une plaque 24 puits (voir section 1.2.2), les cellules sont incubées ou non avec 500 μM de CuSO_4 . A la fin de l'incubation, les cellules sont mises en contact avec la sonde $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ diluée dans du PBS. Après 30 min d'incubation dans l'obscurité et dans l'incubateur de culture cellulaire, la mesure des ROS a lieu. L'oxydation intracellulaire de la sonde par les ROS est quantifiée par mesure de la fluorescence au fluorimètre aux longueurs d'onde de 485 nm (excitation) et 520 nm (émission). Des contrôles positifs sont réalisés afin de vérifier la spécificité de la sonde. Les puits sont décantés et la concentration protéique est ensuite déterminée par 1) ajout de 50 μl de NaOH 0,5N dans chaque puits, 2) agitation de la plaque pendant 30 min et 3) la quantification des protéines présentes dans chaque puits grâce au dosage par la méthode de Pierce (voir section 5.5).

11.Sonde Coppensor 1 (CS1)

11.1. Principe

CS1 est une sonde possédant des profils d'excitation et d'émission dans le visible permettant de détecter la présence de l'ion Cu^{2+} , avec une grande sélectivité et sensibilité. Il a également été prouvé que CS1 peut traverser les membranes et peut être utilisé pour détecter les niveaux de Cu^{2+} à l'intérieur des cellules vivantes [91].

11.2. Matériel

Tableau II-26

11.3. Méthode

Le marquage en immunofluorescence est réalisé sur des fibroblastes WI-38 ensemencés sur des couvre-objets stériles déposés dans une plaque 24 puits (voir section 1.2.2). Les cellules sont rincées une fois au PBS et sont ensuite incubées avec la sonde CS1 diluée dans du PBS. On peut ensuite effectuer le montage des couvre-objets sur les lames porte-objet à l'aide d'une goutte de Mowiol préchauffé à 57 °C. Les lamelles sont incubées au minimum une nuit à 4°C. Les cellules sont observées et analysées grâce à un microscope confocal en fluorescence équipé des filtres appropriés.

III. Résultats

1. Caractérisation du modèle expérimental

1.1. Mises au point techniques du modèle expérimental

Des mises au point ont été effectuées afin d'obtenir un modèle expérimental permettant une accumulation de cuivre dans les fibroblastes WI-38, une modification des gènes dont l'expression dépend du cuivre ainsi que l'apparition des biomarqueurs de la sénescence. La plupart des mises au point ont été réalisées préalablement au sein du laboratoire.

Premièrement, le choix de la lignée cellulaire des fibroblastes WI-38, une lignée de fibroblastes humains embryonnaires, a reposé sur deux critères majeurs : c'est avec ce type cellulaire en particulier que Leonard Hayflick a posé les bases en matière de sénescence cellulaire et c'est également avec cette lignée que plusieurs modèles de sénescence induite prématurément par les stress (SIPS) ont été mis au point au laboratoire. Les mécanismes de la sénescence dans les fibroblastes WI-38 sont donc particulièrement bien décrits. De plus, il paraissait également original d'utiliser ce type cellulaire pour étudier le rôle potentiel de la protéine prion étant donné que toutes les études concernant ce sujet publiées à ce jour sont réalisées majoritairement dans des cellules neuronales.

Deuxièmement, afin d'engendrer une accumulation de cuivre dans les fibroblastes WI-38, différents donneurs de cuivre ont été testés, comme le chlorure de cuivre (CuCl_2) et le sulfate de cuivre (CuSO_4). Les fibroblastes WI-38 ont été incubés avec du CuSO_4 ou du CuCl_2 ajouté à du milieu de culture contenant 10 % de sérum de veau fœtal (FBS). Le sérum permet non seulement de fournir les nutriments nécessaires à des cellules embryonnaires mais également de les maintenir à des conditions proches des conditions physiologiques. De plus, il a été montré que dans des cellules privées de sérum, on observe une augmentation de l'expression de PrP^c [92]. En privant nos fibroblastes WI-38 de sérum, nous biaiserons nos résultats, en particulier ceux concernant l'expression de PrP^c . Après avoir remarqué que les deux donneurs de cuivre testés étaient capables d'induire les mêmes modifications de l'expression de différents gènes, le choix s'est finalement porté sur le CuSO_4 en accord avec les données concernant le CuSO_4 présentes abondamment dans la littérature de l'époque.

Et enfin, pour déterminer une concentration sublétales, la viabilité cellulaire des fibroblastes WI-38 a été évaluée pour différentes concentrations en CuSO_4 , allant de 0 μM à 1000 μM pendant 16 h. Une dose de 500 μM de CuSO_4 est considérée comme sublétales car cette concentration ne semble pas altérer la survie cellulaire des fibroblastes WI-38. Quant à la concentration de 750 μM de CuSO_4 , elle est considérée comme toxique car la mortalité des fibroblastes WI-38 est très importante. Une incubation de 2 à 8 h ne semble pas induire d'accumulation de cuivre, ni de modifications de l'expression des gènes connus pour être activés par le cuivre et encore moins des biomarqueurs de la sénescence. Il s'est donc avéré qu'une incubation de 16 h avec 500 μM de CuSO_4 permet d'obtenir une accumulation de cuivre à l'intérieur des fibroblastes WI-38 ainsi qu'une modification de l'expression de gènes qui dépend notamment du cuivre.

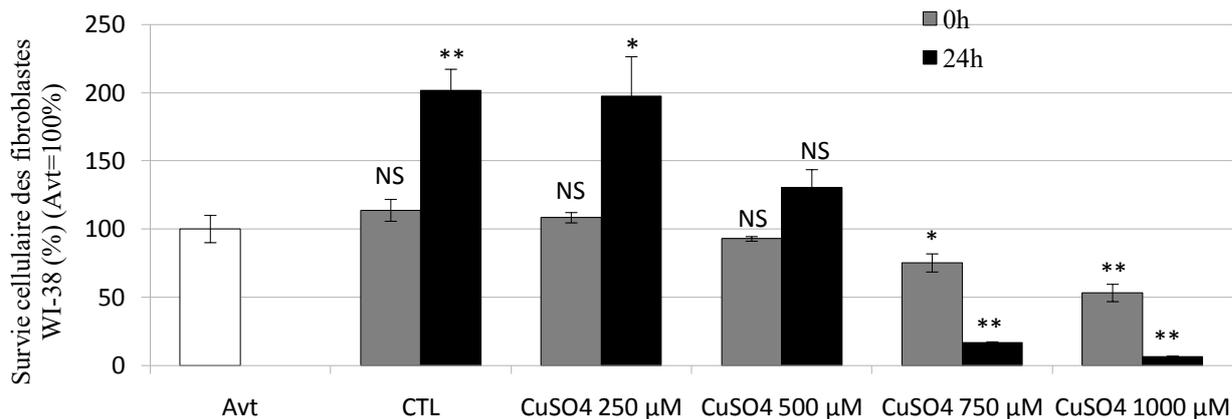


Figure 1 : Evaluation de la viabilité cellulaire des fibroblastes WI-38 incubés avec différentes concentrations de CuSO₄ pendant 16 h. La cytotoxicité induite par une incubation au CuSO₄ a été évaluée par la technique du « MTT Assay », juste avant l'incubation au CuSO₄, à 0 h et à 24 h après la fin de l'incubation au CuSO₄. Les cellules « contrôles » (CTL) n'ont pas été incubées avec du CuSO₄. Les données obtenues pour les différentes concentrations en CuSO₄ ont été normalisées aux données obtenues pour les cellules avant l'incubation. Ces valeurs obtenues pour les cellules « avant incubation » (Avt) sont considérées égales à 100%. Ces résultats représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes ± écart-type (n=3).

1.2. Evaluation de la viabilité cellulaire des fibroblastes WI-38

La cytotoxicité a été préalablement étudiée au laboratoire afin de déterminer la concentration sublétalement induite par le CuSO_4 grâce à la technique du « MTT », une technique permettant d'établir une corrélation entre la quantité de MTT réduit et l'activité métabolique, donc indirectement la survie cellulaire. La concentration de 500 μM de CuSO_4 avait été choisie comme dose sublétalement.

Afin de mieux caractériser notre modèle expérimental, nous avons de nouveau réalisé ce genre d'expérience (**Figure 1**). Cette fois, la survie cellulaire des fibroblastes WI-38 a été évaluée juste avant, juste après (à 0 h) et 24 h après une incubation de 16 h avec différentes concentrations de CuSO_4 . Les résultats obtenus pour les différentes concentrations de CuSO_4 ont été normalisés par rapport aux résultats obtenus pour les cellules juste avant l'incubation avec le CuSO_4 , considérés comme égaux à 100 %. Les cellules « contrôles » n'ont pas été incubées avec du CuSO_4 .

Des concentrations de 250 μM et 500 μM de CuSO_4 ne semblent pas altérer la survie cellulaire des fibroblastes WI-38 à 0 h après la fin de l'incubation avec le CuSO_4 . Dans la condition 750 μM de CuSO_4 , nous pouvons remarquer une baisse de la survie cellulaire avoisinant les 25 %, par rapport aux cellules avant l'incubation. Une importante diminution de la survie cellulaire des fibroblastes WI-38 avoisinant les 50 % s'observe lorsqu'une concentration de 1000 μM de CuSO_4 est utilisée.

24 h après la fin de l'incubation avec du CuSO_4 , la survie cellulaire des fibroblastes WI-38 incubés avec 250 μM de CuSO_4 ou 500 μM de CuSO_4 ne semble pas être altérée, par rapport aux cellules avant l'incubation. Pour ce qui est des concentrations en CuSO_4 de 750 μM et 1000 μM à 24 h après l'arrêt de l'incubation avec le CuSO_4 , elles induisent une mortalité relativement importante, de plus de 75 %.

Après avoir vérifié qu'une concentration de 500 μM de CuSO_4 représente une dose sublétalement pour les fibroblastes WI-38 incubés pendant 16 h, il est intéressant de voir si une augmentation de la concentration en Cu^{2+} extracellulaire provenant du CuSO_4 peut engendrer une accumulation de cuivre dans les fibroblastes WI-38 suite à une perturbation de l'homéostasie du cuivre. Nous avons non seulement dosé l'accumulation du cuivre dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h mais également analysé le niveau d'ARNm des gènes dont l'expression est connue pour dépendre notamment du cuivre.

1.3. Etude de l'impact de l'incubation avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h sur le niveau intracellulaire de cuivre dans les fibroblastes WI-38

1.3.1. Dosage du cuivre dans des fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4

Dans une expérience réalisée préalablement au sein de notre équipe, un dosage du cuivre dans des fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h avait été réalisé à l'aide du kit « Quantichrom Copper Assay Kit ». Ce kit permet la détection des ions Cu^{2+} grâce à un chromogène qui forme un complexe coloré en présence de ces ions. L'intensité du chromogène est mesurable à la longueur d'ondes de 359 nm et est directement proportionnel à la concentration en cuivre présente dans l'échantillon. Une courbe d'étalonnage a également été réalisée à l'aide de différentes concentrations en CuSO_4 .

Les valeurs obtenues pour la concentration en cuivre dans les fibroblastes WI-38 à 0 h après

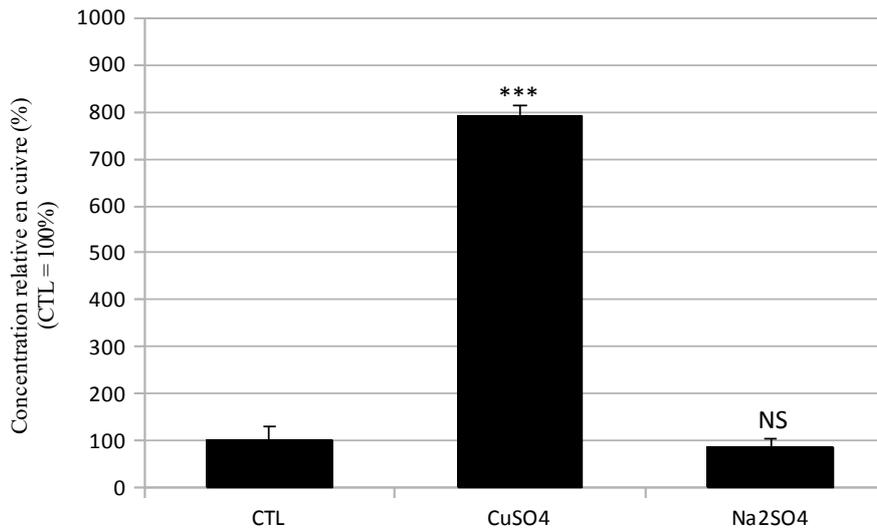


Figure 2 : Dosage du cuivre dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h à l'aide du kit « Quantichrom Copper Assay Kit ». Le dosage du cuivre dans les fibroblastes WI-38 incubés pendant 16 h avec 500 μM de CuSO_4 se réalise grâce au kit « Quantichrom Copper Assay Kit ». La détection des ions Cu^{2+} se fait à une longueur d'onde de 359 nm. Les cellules « contrôles » n'ont pas été incubées avec du CuSO_4 . Des fibroblastes WI-38 ont été incubés avec du Na_2SO_4 et sont considérés comme « contrôle négatif ». Les valeurs obtenues pour la concentration relative en cuivre dans les cellules incubées avec du CuSO_4 sont rapportées à la quantité de protéines (en mg), le tout étant rapporté aux valeurs obtenues pour les « cellules contrôles », considérées égales à 100 %. Ces résultats représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes \pm écart-type (n=3) (CTL : contrôles, CuSO_4 : CuSO_4 500 μM ; Na_2SO_4 : Na_2SO_4 500 μM).

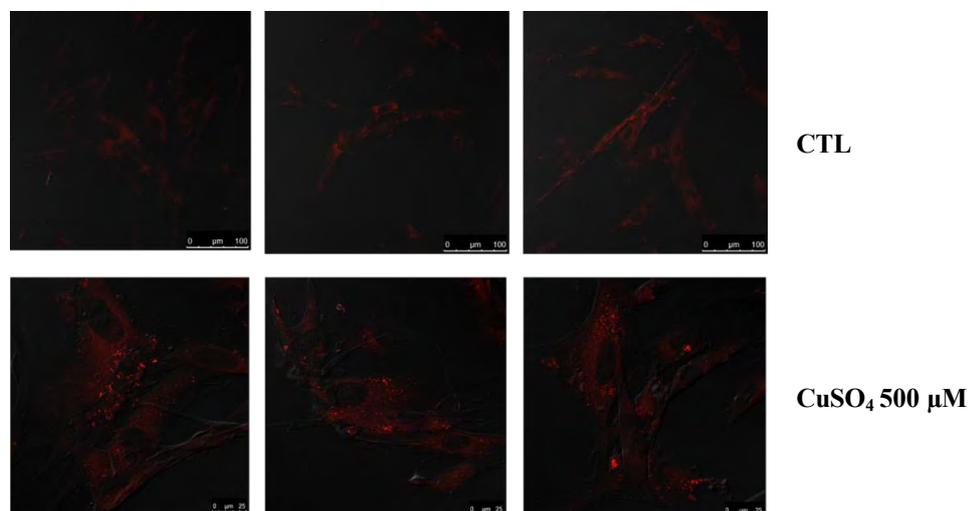


Figure 3 : Détection du cuivre dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h à l'aide de la sonde fluorescente CopperSensor-1. La détection du cuivre dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h a été rendue possible grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente possédant une grande sélectivité et sensibilité pour le Cu^+ , CopperSensor-1 (CS-1). Les fibroblastes ont été incubés avec la sonde CS-1 diluée dans du PBS. La détection du cuivre en microscopie confocale a été réalisée à 0 h après l'arrêt de l'incubation au CuSO_4 . Les cellules « contrôles » (CTL) n'ont pas été incubées avec le CuSO_4 . Ceci est une représentation de 3 expériences indépendantes (n=3).

l'arrêt de l'incubation de 16 h avec 500 μM de CuSO_4 sont rapportées à celles des cellules « contrôles », qui n'ont pas été incubées avec du CuSO_4 . Les valeurs obtenues pour les cellules « contrôles » sont considérées égales à 100 %. Une élévation d'environ 8 fois de la concentration en Cu^{2+} est détectable dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 , par rapport aux cellules « contrôles » n'ayant pas été incubées avec 500 μM de CuSO_4 (**Figure 2**). Des fibroblastes WI-38 avaient également été incubés avec 500 μM de sulfate de sodium (Na_2SO_4) pendant 16 h afin de confirmer que c'était effectivement le cuivre qui induisait cette augmentation et non les sulfates. Les résultats obtenus pour cette condition sont similaires à ceux obtenus pour les cellules « contrôles ».

Ces données illustrent le fait que, dans notre modèle expérimental, les niveaux de cuivre intracellulaires augmentent dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h.

1.3.2. Détection du cuivre dans des fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h

Après avoir mis en évidence une accumulation de cuivre dans les fibroblastes WI-38 incubés pendant 16 h avec 500 μM de CuSO_4 , il est intéressant non seulement de confirmer ce résultat par une autre méthode mais également de voir si des modifications dans la distribution de ce cuivre à l'intérieur de ces fibroblastes WI-38 sont observables. Pour ce faire, nous avons utilisé la seule sonde disponible permettant de détecter le cuivre à l'intérieur des cellules, Copper Sensor-1 (CS-1). CS-1 est une sonde qui possède une grande sélectivité et sensibilité pour le Cu^+ et qui peut détecter les niveaux de Cu^+ à l'intérieur des cellules. Nous sommes conscients que cette sonde ne détecte que le Cu^+ et ne permet dès lors pas de comparer précisément les résultats obtenus grâce au kit « Quantichrom Assay Kit ». On peut néanmoins imaginer que le Cu^+ et le Cu^{2+} augmentent quand la concentration en cuivre extracellulaire augmente.

0 h après l'incubation avec 500 μM de CuSO_4 , les fibroblastes WI-38 sont fixés avec du PFA 4% et sont ensuite incubés avec la sonde CS-1 pendant 20 min. Les cellules « contrôles » n'ont pas été incubées avec du CuSO_4 . Après un montage au Mowiol, les fibroblastes WI-38 sont observés au microscope confocal. Le signal correspondant à la détection des ions Cu^+ apparaît plus intense dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h. Les résultats obtenus (**Figure 3**) mettent en évidence une accumulation de cuivre dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h, comparé aux cellules « contrôles », non incubées avec du CuSO_4 . Il apparaît également que la distribution des ions Cu^+ semble être plus importante dans la région péri-nucléaire.

Ces résultats renforcent les résultats précédents et illustrent le fait que les niveaux de cuivre intracellulaires sont relativement plus importants dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 .

1.3.3. Modification de l'expression des gènes dont l'expression dépend du cuivre dans des fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4

L'expression de plusieurs gènes est connue pour être dépendante notamment du cuivre dans un grand nombre de lignées cellulaires. Dans le cadre de cette étude, trois gènes ont été choisis : MT2A, Hsp70 et PrP^c. Le niveau d'expression de ces trois gènes a été évalué dans des fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 durant 16 h. Pour ce faire, l'ARN total est isolé, rétrotranscrit et ensuite analysé par qRT-PCR. Les cellules « contrôles » n'ont

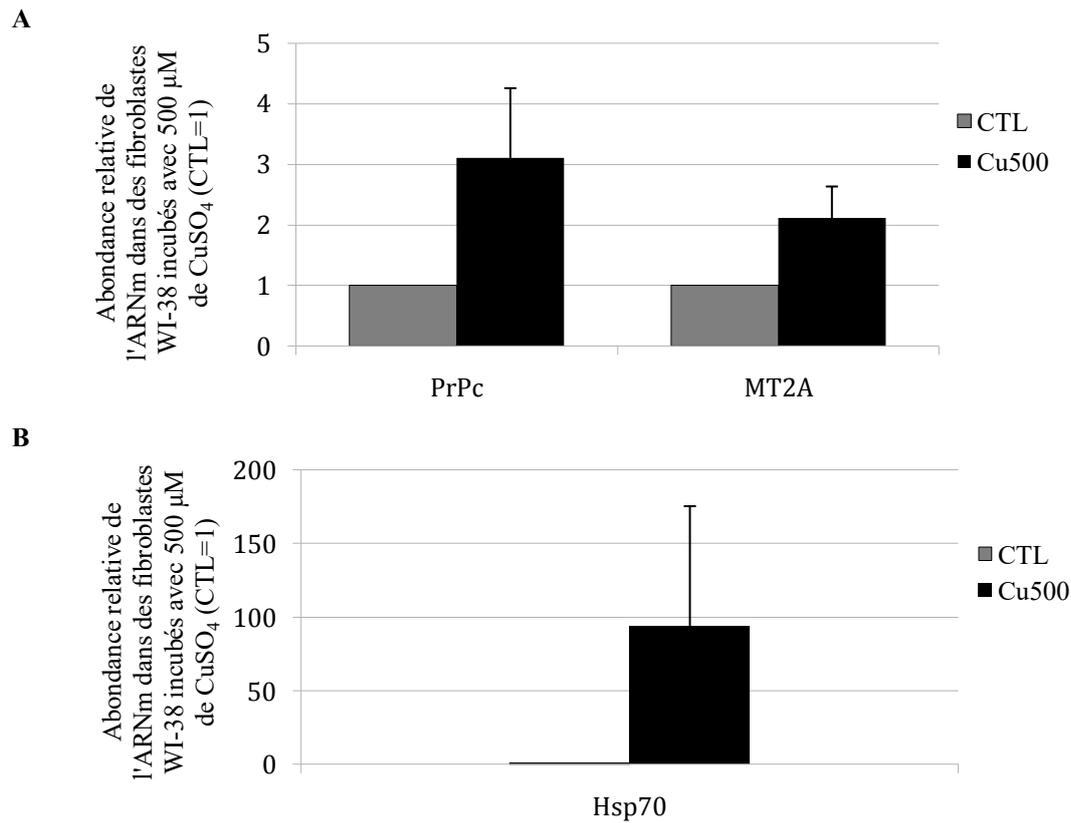


Figure 4 : Le cuivre induit une modification de l'expression des gènes dont l'expression dépend notamment du cuivre. (A) Evaluation de l'abondance relative de l'ARNm de MT2A et de PrP^c dans des fibroblastes incubés avec 500 μ M de CuSO₄ pendant 16 h, comparé aux cellules « contrôles », non incubées avec du CuSO₄. Le transcrite de 23 kDa a été utilisé comme référence pour effectuer la normalisation. Le niveau d'expression de l'ARNm de MT2A et PrP^c dans les cellules « contrôles » est considéré égal à 1 (n=6). **(B)** Evaluation de l'abondance relative de l'ARNm de Hsp70 dans des fibroblastes incubés avec 500 μ M de CuSO₄ pendant 16 h, comparé aux cellules « contrôles », non incubées avec du CuSO₄. Le transcrite de 23 kDa a été utilisé comme référence pour effectuer la normalisation. Le niveau d'expression de l'ARNm de Hsp70 dans les cellules « contrôles » est considéré égal à 1. Ces résultats sont présentés comme moyenne des valeurs de 6 expériences indépendantes \pm écart-type (n=6) (CTL : contrôles ; Cu500 : CuSO₄ 500 μ M).

pas été incubées avec le CuSO_4 . Le gène 23 kDa a été utilisé comme gène de référence pour effectuer la normalisation. L'abondance relative de l'ARNm de MT2A, de Hsp70 et de PrP^c a été analysée à 0 heure après la fin de l'incubation de 16 h avec 500 μM de CuSO_4 . Les résultats obtenus sont la moyenne de 6 expériences indépendantes \pm écart-type (**Figure 4**). Ces résultats ont montré une augmentation de l'abondance relative de l'ARNm de PrP^c (une augmentation de $3,1 \pm 1,2$ fois), MT2A (une augmentation de $2,1 \pm 0,5$ fois) et de Hsp70 (une augmentation de $94 \pm 81,5$ fois) à 0 heure après l'arrêt de l'incubation avec 500 μM de CuSO_4 , comparé aux cellules « contrôles » non incubées avec le CuSO_4 .

Une modification de l'expression de ces trois gènes qui est connue pour être notamment dépendante du cuivre s'observe dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 , ce qui renforce une fois de plus notre modèle expérimental.

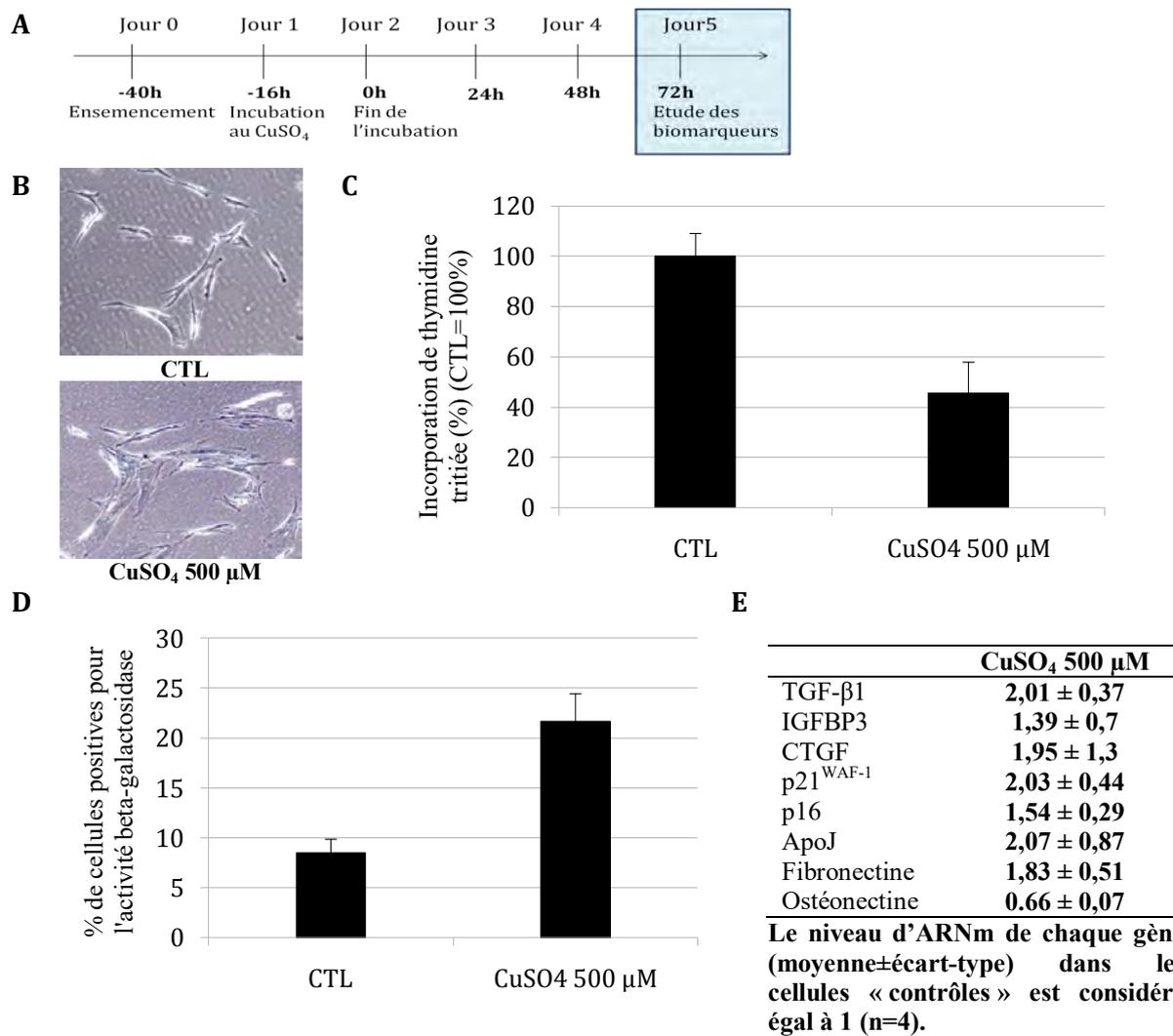


Figure 5 : Le cuivre induit l'apparition des biomarqueurs de la sénescence à 72 h après l'arrêt de l'incubation avec le CuSO₄. (A) Modèle expérimental de sénescence induite prématurément par le cuivre. Au jour 0, les fibroblastes WI-38 sont ensemencés dans des boîtes de cultures de 25 cm². 24 h après le repiquage (jour 1), les fibroblastes WI-38 sont incubés avec 500 μM de CuSO₄ durant 16 h. Au jour 2, l'incubation est arrêtée par un rinçage au PBS et les fibroblastes WI-38 sont ensuite incubés avec du BME + 10% de FBS. Au jour 3, soit 24 h après l'arrêt de l'incubation avec le CuSO₄, les fibroblastes WI-38 sont ensemencés dans des plaques 6-puits à une densité de 20 000 cellules/puits ou dans des plaques 24-puits à une densité de 10 000 cellules/puits. 72 h après la fin de l'incubation au CuSO₄, au jour 5, les différents biomarqueurs de la sénescence sont étudiés. (B) Micrographies de fibroblastes WI-38 obtenues à 72 h après l'arrêt de l'incubation avec le CuSO₄ comparé aux cellules « contrôles » (CTL). Les cellules « contrôles » ne sont pas incubées avec le CuSO₄. Les photos ont été obtenues à partir d'une plaque 6-puits utilisée pour la détection de l'activité β-galactosidase associée à la sénescence. (C) L'estimation du potentiel prolifératif des fibroblastes WI-38 a pu se faire grâce à la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN après une incubation de 16 h avec du CuSO₄. Les données obtenues ont été normalisées par rapport au contenu protéique déterminé par la méthode de Pierce. Les cellules « contrôles » (CTL) n'ont pas été incubées avec le CuSO₄ et la valeur obtenue pour cette condition est considérée égale à 100 %. (D) Le pourcentage de cellules positives pour l'activité β-galactosidase associée à la sénescence a été calculé dans des fibroblastes WI-38 à 72 h après l'arrêt de l'incubation au CuSO₄. Les cellules « contrôles » (CTL) n'ont pas été incubées au CuSO₄. (E) L'abondance de l'ARNm des gènes associés à la sénescence a été évaluée à 72 h après la fin de l'incubation avec le CuSO₄. Les changements dans l'expression de ces gènes liés à la sénescence ont été évalués pour TGF-β1, IGFBP3, CTGF, p21^{WAF-1}, ApoJ, la fibronectine et l'ostéonectine par qRT-PCR. Le transcrite de 23 kDa a été utilisé comme référence pour effectuer la normalisation. L'abondance relative de chaque ARNm dans les cellules « contrôles » non incubées avec CuSO₄ est considérée égale à 1. Ces résultats sont présentés comme moyenne des valeurs de 4 expériences indépendantes ± écart-type (n=4).

2. Etude de l'apparition des biomarqueurs de la sénescence à 72 h après une incubation de 16 h avec 500 μM de CuSO_4

2.1. Modèle de sénescence induite par le cuivre

Pour rappel, la sénescence répliquative se caractérise par différents biomarqueurs, comprenant entre autres la morphologie étalée et typique de la sénescence, l'arrêt de prolifération cellulaire, l'apparition de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence ainsi que des changements dans le niveau d'expression de certains gènes.

Afin de pouvoir analyser l'apparition des biomarqueurs de la sénescence à long terme, un modèle expérimental de sénescence induite prématurément par le cuivre a été établi sur base des mises au point décrites précédemment. Les fibroblastes WI-38 ont été exposés à une dose unique sublétales de 500 μM de CuSO_4 , suivant un protocole très précis (**Figure 5A**) : 24 h après que les fibroblastes WI-38 aient été ensemencés dans des boîtes de cultures de 25 cm^2 (jour 1), ils sont incubés avec 500 μM de CuSO_4 durant 16 h. Au jour 2, l'incubation est arrêtée par un rinçage au PBS et les cellules sont incubées avec du BME + 10% de FBS. Au jour 3, soit 24 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 μM de CuSO_4 , les fibroblastes WI-38 sont ensemencés dans des plaques 6-puits à une densité de 20 000 cellules/puits ou dans des plaques 24-puits à une densité de 10 000 cellules/puits pour étudier différents biomarqueurs de la sénescence. L'étude des différents biomarqueurs se réalise au 5^{ème} jour, soit 72 h après la fin de l'incubation avec 500 μM de CuSO_4 . L'abondance relative de l'ARNm de différents gènes associés à la sénescence est également évaluée au 5^{ème} jour afin d'observer d'éventuelles modifications.

Différentes expériences ont effectivement montré qu'une incubation de 16 h avec 500 μM de CuSO_4 induit le phénotype sénescence chez des fibroblastes WI-38, à 72 h après l'arrêt de l'incubation avec le CuSO_4 .

2.2. La morphologie cellulaire

La **Figure 5B** illustre la morphologie des fibroblastes WI-38 à 72 h après la fin de l'incubation avec 500 μM de CuSO_4 , comparé aux cellules « contrôles » non incubées avec du CuSO_4 . La morphologie des fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 est différente : les cellules sont plus larges et étendues que les cellules « contrôles ». Une incubation avec 500 μM de CuSO_4 induit donc un changement de la morphologie des fibroblastes WI-38 qui est une caractéristique du phénotype sénescence.

2.3. La prolifération cellulaire

Le potentiel prolifératif des fibroblastes WI-38 a été évalué à 72 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 μM de CuSO_4 en mesurant l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN (**Figure 5C**). Les valeurs d'incorporation de thymidine tritiée (coups par minute) ont été normalisées par rapport à la quantité de protéines se trouvant dans chaque échantillon. La quantité de protéines a été déterminée à l'aide de la méthode de dosage de Pierce. Les résultats obtenus (moyenne de 4 expériences indépendantes) pour les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 ont été également rapportés aux résultats obtenus pour les cellules « contrôles » qui n'ont pas été incubées avec du CuSO_4 . Ces résultats sont présentés en pourcentage, en considérant les valeurs obtenues pour les cellules « contrôles » égales à 100 %. Une diminution de l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN d'approximativement 55 %

s'observe dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 , comparé aux cellules « contrôles ».

2.4. L'activité β -galactosidase associée à la sénescence

Le pourcentage de cellules positives pour l'activité β -galactosidase associée à la sénescence a été évaluée chez des fibroblastes WI-38 à 72 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 μM de CuSO_4 , ainsi que dans les cellules « contrôles », qui n'ont pas été incubées avec du CuSO_4 . À l'aide d'un microscope optique, au minimum 400 cellules par puits ont été comptées, ainsi que la proportion de cellules qui apparaissent bleues parmi ces 400 cellules. Ces cellules qui apparaissent bleues représentent les cellules possédant une activité β -galactosidase associée à la sénescence et détectable à pH 6. Une incubation avec 500 μM de CuSO_4 induit une augmentation d'environ 2,5 fois du pourcentage de cellules positives pour l'activité β -galactosidase associée à la sénescence, comme illustré dans la **Figure 5D** (moyenne de 4 expériences indépendantes).

2.5. Modifications dans l'expression de certains gènes liés à la sénescence

Les modifications de l'expression de certains gènes liés à la sénescence ont été évaluées. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au TGF- β 1 (Transforming Growth Factor-beta 1), à l'IGFBP3 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3), au CTGF (Connective Tissue Growth Factor), à $\text{p}21^{\text{WAF-1}}$, à p16, à l'apolipoprotéine J (ApoJ), à la fibronectine et à l'ostéonectine (**Figure 5E**).

À 72 h après la fin de l'incubation avec 500 μM de CuSO_4 , des modifications dans les abondances relatives de l'ARNm des différents gènes cités sont observées quand on les compare aux résultats obtenus pour les cellules « contrôles », non incubées avec du CuSO_4 (moyennes de 4 expériences indépendantes \pm écart-type). L'abondance relative de l'ARNm de ApoJ, de $\text{p}21^{\text{WAF-1}}$, du TGF- β 1, de la fibronectine, de p16 et de IGFBP3 est plus élevée dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 . Les modifications les plus importantes s'observent dans chaque expérience pour ApoJ (une augmentation de $2,07 \pm 0,87$ fois), pour $\text{p}21^{\text{WAF-1}}$ (une augmentation de $2,03 \pm 0,44$ fois), pour le TGF- β 1 (une augmentation de $2,01 \pm 0,37$ fois), pour la fibronectine (une augmentation de $1,83 \pm 0,51$ fois), ainsi que pour p16 (une augmentation de $1,54 \pm 0,29$ fois). À l'inverse, les modifications de l'abondance relative de l'ARNm de l'IGFBP3 (une augmentation de $1,39 \pm 0,7$ fois) ne sont pas observables lors de chaque expérience. Ceci peut s'expliquer par exemple par le fait que l'augmentation de ces gènes se passerait légèrement en différé des 72 h auxquelles nous étudions généralement les biomarqueurs. On pourrait également imaginer que le cuivre induit l'expression ou la répression de gènes dont le produit pourrait interférer avec l'expression de gènes d'intérêt liés à la sénescence.

Ces résultats corrélés aux résultats obtenus précédemment au sein de l'équipe suggèrent que le cuivre induit la SIPS. Lors de la prochaine étape, nous allons voir par quels mécanismes cette SIPS pourrait être induite. Nous avons émis l'hypothèse qu'une accumulation de cuivre pourrait induire la SIPS via la génération d'un stress oxydatif ainsi que via des dommages à l'ADN.

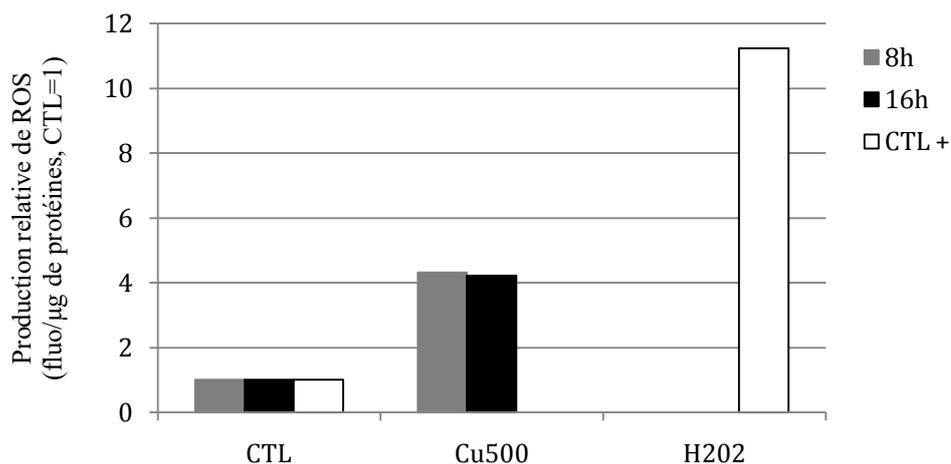


Figure 6 : Etude du stress oxydatif dans des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 μM de CuSO_4 . Mesure de la production de ROS suite à l'oxydation de la sonde fluorescente $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ dans des fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 . Les mesures s'effectuent après 8 h et après 16 h d'incubation avec 500 μM de CuSO_4 . Les cellules « contrôles » n'ont pas été incubées avec du CuSO_4 et les cellules incubées avec 200 μM de H_2O_2 représentent les « contrôles positifs ». Après quantification des protéines, toutes les valeurs obtenues (en μg de protéines) ont été rapportées à celles obtenues pour les conditions « contrôles », considérées égales à 1. Les données reprises dans le graphique représentent les valeurs obtenues après 1 h d'incubation avec la sonde $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (n=1) (CTL : contrôles, Cu500 : CuSO_4 500 μM ; H_2O_2 : H_2O_2 200 μM , CTL + : contrôle positif). Ce résultat est représentatif d'une seule expérience (n=1).

3. Etude du stress oxydatif et des dommages à l'ADN induits par le cuivre chez des fibroblastes WI-38

Afin de savoir si le cuivre engendre la SIPS à travers un stress oxydatif ainsi que des dommages à l'ADN, nous avons déterminé dans un premier temps si le cuivre génère un stress oxydatif ainsi qu'évalué les dommages à l'ADN qui seraient générés suite à une incubation avec 500 μM de CuSO_4 . Dans un second temps, nous avons étudié l'expression de gènes liés à la réponse antioxydante des fibroblastes incubés avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h face au stress oxydatif mis en évidence. Enfin, nous avons essayé de contrer le stress oxydatif généré grâce à un antioxydant.

3.1. Mesure de la génération d'un stress oxydatif chez les fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 μM de CuSO_4 à l'aide d'une sonde fluorescente

Dans un premier temps, la génération d'un stress oxydatif a été mise en évidence en estimant la production de ROS suite à l'oxydation de la sonde 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacétate ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 . Cette production de ROS a été évaluée à court terme, juste après l'ajout de la solution de CuSO_4 sur les fibroblastes WI-38 (mesure « instantanée »), après 2 et 8 h d'incubation avec 500 μM de CuSO_4 ainsi qu'après 16 h d'incubation avec 500 μM de CuSO_4 . Les mesures ont également été effectuées sur des cellules « contrôles », non incubées avec du CuSO_4 .

Les cellules « contrôles » n'ont pas été incubées avec du CuSO_4 . Les fibroblastes WI-38 incubés pendant 1 h avec 200 μM de H_2O_2 représentent le « contrôle positif ». Nous avons mis en évidence que la production de ROS reste relativement stable et comparable à celle obtenue dans les cellules « contrôles » pour les temps de mesure « instantanée » et « 2 h » (résultats non présentés). Par contre, on observe une augmentation de la production de ROS après 8 h et 16 h d'incubation avec 500 μM de CuSO_4 , comparé aux cellules « contrôles » (**Figure 6**).

Après avoir mis en évidence une production de ROS suite à une incubation de 8 h et 16 h avec 500 μM de CuSO_4 chez les fibroblastes WI-38, nous nous sommes penchés sur les modifications de l'expression de certains gènes liés à la réponse au stress oxydatif, afin d'évaluer la réponse antioxydante des fibroblastes WI-38 face à un stress oxydatif qui est généré à l'intérieur des cellules suite à l'incubation avec 500 μM de CuSO_4 .

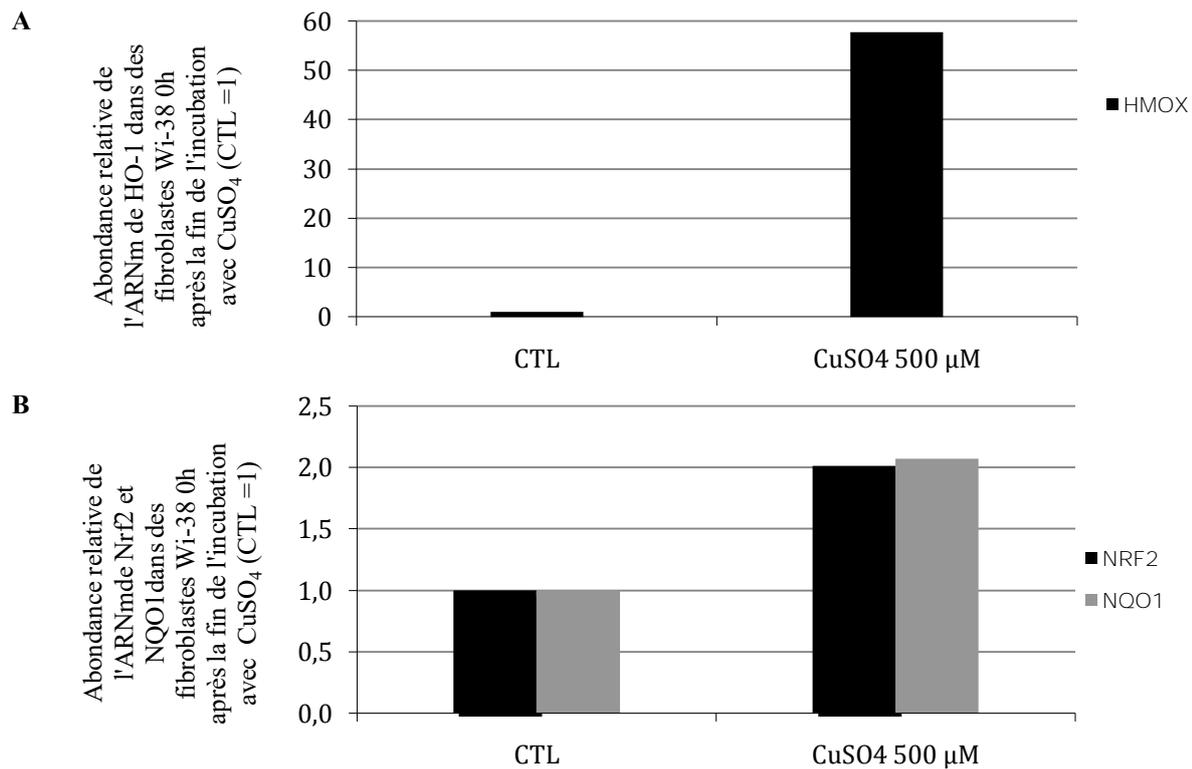


Figure 7: Analyse de l'abondance relative de l'ARNm de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif suite à une incubation de 16 h avec du cuivre. L'abondance relative de l'ARNm de (A) HO-1 et de (B) Nrf2 et NQO1 a été évaluée dans des fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO₄ pendant 16 h, comparé aux cellules « contrôles », non incubées avec du CuSO₄. Le transcrite de 23 kDa a été utilisé comme référence pour effectuer la normalisation. Le niveau d'expression de l'ARNm de HO-1, de Nrf2 et NQO1 dans les cellules « contrôles » (CTL) est considéré égal à 1. Ce graphique est une représentation de 3 expériences indépendantes (n=3).

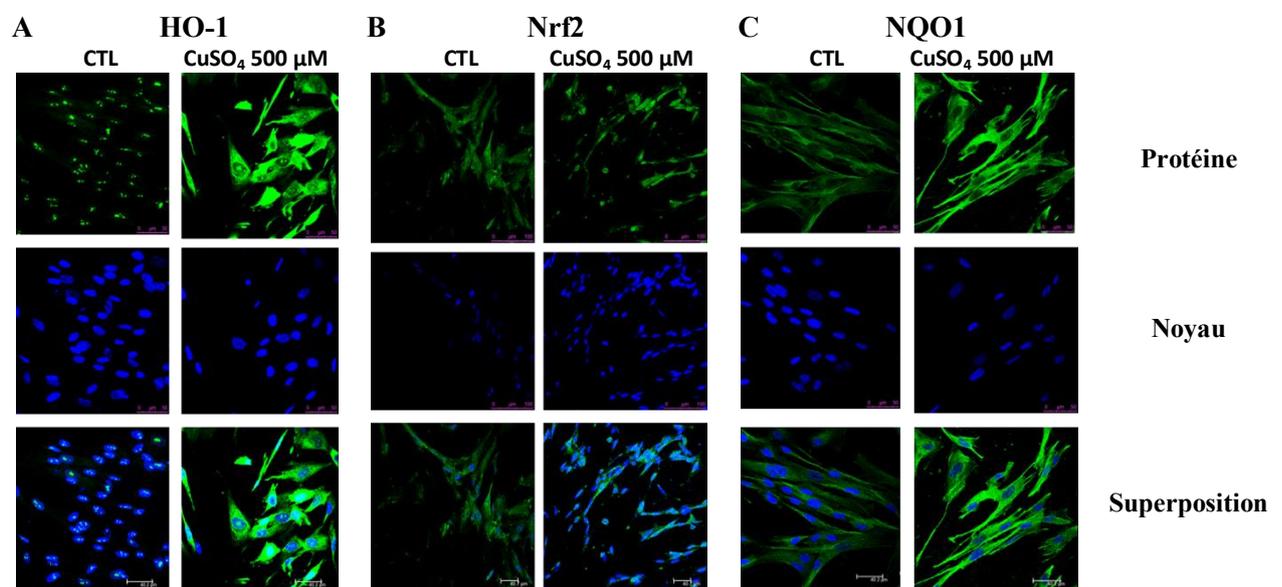


Figure 8 : Etude de l'abondance protéique de HO-1, Nrf2 et NQO1 par marquage en immunofluorescence. Détection par immunofluorescence de l'abondance protéique de (A) HO-1 et de (B) Nrf2 dans des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 μM de CuSO₄ pendant 16 h. Les fibroblastes WI-38 ont été incubés avec l'anticorps monoclonal HO-1 ou Nrf2 et la sonde fluorescente Alexa 488 anti-lapin a été utilisée comme anticorps secondaire. Le Topro a été utilisé pour marquer le noyau. (C) Détection par immunofluorescence de l'abondance protéique de NQO1 dans des fibroblastes incubés ou non avec 500 μM de CuSO₄ pendant 16 h. Les fibroblastes WI-38 ont été incubés avec l'anticorps monoclonal NQO1 et la sonde fluorescente Alexa 488 anti-souris a été utilisée comme anticorps secondaire. Le Topro a été utilisé pour marquer le noyau. Ceci est une représentation de 3 expériences indépendantes (n=3) (CTL : contrôles).

3.2. Etude de la réponse antioxydante des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h

3.2.1. Analyse de l'abondance relative de l'ARNm des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif chez des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h

Trois gènes connus pour être impliqués dans la réponse au stress oxydatif ont été étudiés afin d'évaluer la réponse antioxydante des fibroblastes WI-38 suite à un stress oxydatif généré par l'incubation avec 500 μM de CuSO_4 . Pour ce faire, l'ARN total a été isolé à partir de fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 μM de CuSO_4 durant 16 h, pour être ensuite rétrotranscrit en ADNc et analysé par qRT-PCR afin d'évaluer le niveau d'expression des gènes associés à la réponse au stress oxydatif. L'abondance relative de l'ARNm des gènes codant pour la hème oxygénase-1 (HO-1), pour le facteur de transcription Nrf2 et la NAD(P)H déshydrogénase quinone 1 (NQO1) a été analysée à 0 heure après l'incubation de 16 h avec 500 μM de CuSO_4 . Les résultats ont montré une augmentation de l'abondance relative de l'ARNm de HO-1 (une augmentation de 57,7 fois) (**Figure 7A**), de Nrf2 (une augmentation de 2 fois) et de NQO1 (une augmentation de 2,1 fois) (**Figure 7B**) à 0 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 μM de CuSO_4 .

D'après ces résultats, une incubation avec 500 μM de CuSO_4 générerait un stress oxydatif à l'intérieur des fibroblastes WI-38, engendrant ainsi une réponse antioxydante.

3.2.2. Etude de l'abondance protéique de HO-1, Nrf2 et NQO1 par marquage en immunofluorescence dans des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h

La détection par immunofluorescence a été utilisée afin de déterminer l'abondance protéique de HO-1, Nrf2 et NQO1 dans des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 μM de CuSO_4 durant 16 h et voir si une réponse antioxydante était générée suite à cette incubation. Les signaux correspondant à HO-1 (**Figure 8A**), Nrf2 (**Figure 8B**) et NQO1 (**Figure 8C**) apparaissent plus importants dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h, comparé aux cellules « contrôles » qui n'ont pas été incubées avec du CuSO_4 . Ce résultat corrélé au résultat précédent suggère qu'une incubation avec 500 μM de CuSO_4 génère effectivement un stress oxydatif à l'intérieur des fibroblastes WI-38, celui-ci déclenchant une réponse antioxydante.

Comme expliqué dans l'introduction, le vieillissement physiologique résulte de dommages délétères aléatoires occasionnés par le stress oxydatif, en particulier les dommages à l'ADN [6]. Afin de voir si une accumulation de cuivre peut générer la SIPS via un stress oxydatif, il est intéressant de se pencher sur les dommages occasionnés à l'ADN suite à une incubation avec 500 μM de CuSO_4 .

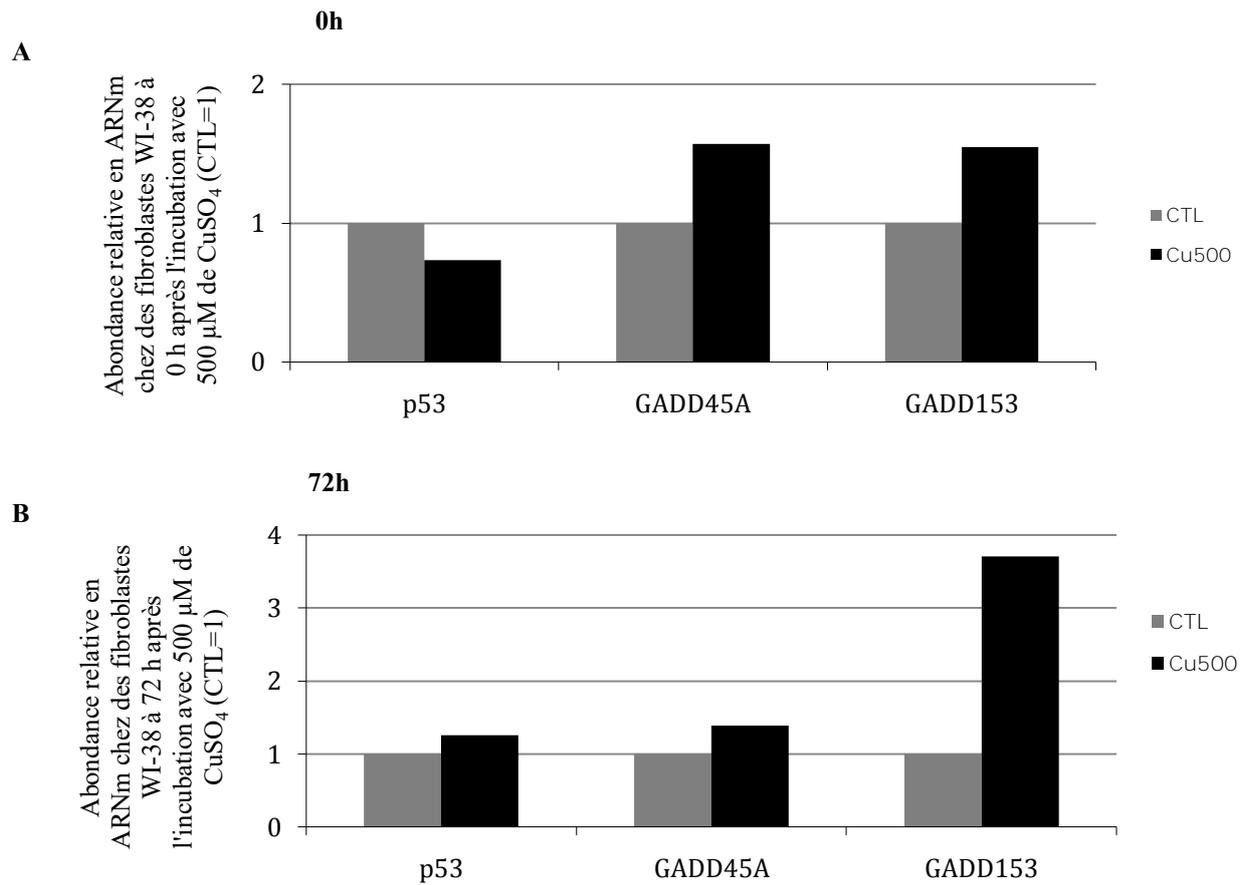


Figure 9 : Le cuivre induit une modification de l'expression des gènes impliqués dans l'arrêt de prolifération occasionné par les dommages à l'ADN. (A) Evaluation de l'abondance relative de l'ARNm de p53, GADD45A et GAD153 dans des fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μ M de CuSO_4 pendant 16 h, comparé aux cellules « contrôles », non incubées avec du CuSO_4 . Le transcrite de 23 kDa a été utilisé comme référence pour effectuer la normalisation. Le niveau d'expression de l'ARNm de p53, GADD45A et GADD153 dans les cellules « contrôles » est considéré égal à 1. **(B)** Evaluation de l'abondance relative en ARNm de p53, GADD45A et GAD153 dans des fibroblastes WI-38 à 72 h après la fin de l'incubation avec 500 μ M de CuSO_4 , comparé aux cellules « contrôles » non incubées avec du CuSO_4 . Le transcrite de 23 kDa a été utilisé comme référence pour effectuer la normalisation. Le niveau d'expression de l'ARNm de p53, GADD45A et GADD153 dans les cellules « contrôles » est considéré égal à 1. Ces deux graphiques sont la représentation d'une seule expériences (n=1) (CTL : contrôles, Cu500 : CuSO_4 500 μ M).

3.3. Etude de l'arrêt de prolifération lié aux dommages à l'ADN chez des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 µM de CuSO₄ pendant 16 h

3.3.1. Analyse de l'abondance relative de l'ARNm de gènes impliqués dans l'arrêt de prolifération lié aux dommages à l'ADN

Plusieurs gènes sont connus pour être impliqués dans l'arrêt de prolifération dans le cadre des dommages à l'ADN. Au cours de cette étude, nous en avons sélectionné trois : il s'agit de p53, GADD45A et GADD153. L'abondance relative de l'ARNm de ces différents gènes a été analysée dans les fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 µM de CuSO₄ pendant 16 h. L'ARN total a été isolé, rétrotranscrit et ensuite analysé par qRT-PCR. Les cellules « contrôles » n'ont pas été incubées avec du CuSO₄. Le gène 23 kDa a été utilisé comme gène de référence pour effectuer la normalisation.

L'abondance relative de l'ARNm de p53, GADD45A et GADD153 a été analysée à 0 h et à 72 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 µM de CuSO₄. Les résultats (**Figure 9A et 9B**) ont montré une augmentation de l'abondance relative de l'ARNm de GADD45A (une augmentation de 1,6 fois) et de GADD153 (une augmentation de 1,8 fois) à 0 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 µM de CuSO₄, comparé aux cellules « contrôles », non incubées avec le CuSO₄. Les valeurs obtenues pour les cellules « contrôles » sont considérées égales à 1. Quant à l'abondance relative de l'ARNm de p53, aucune modification n'était observable. L'activité de p53 ne passe pas forcément par une augmentation de son abondance et donc ceci ne rejette pas l'intervention de p53 dans ce modèle.

A 72 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 µM de CuSO₄, une augmentation plus importante de l'ARNm de GADD153 (une augmentation de 3,7 fois) est observée, comparé aux cellules « contrôles ». Quant à l'abondance relative des ARNm de p53 et de GADD45A, de légères augmentations étaient observables (augmentations inférieures à 1,5 fois) dans les cellules incubées avec 500 µM de CuSO₄ comparé aux cellules « contrôles ».

Ces résultats nous amènent à penser que le cuivre pourrait induire des dommages à l'ADN et que l'arrêt de prolifération se mettrait en place à plus long terme, à savoir 72 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 µM de CuSO₄. Bien entendu, il ne s'agit que des résultats préliminaires obtenus au niveau de l'ARNm, mais la tendance qui se dégage pour GADD153 et GADD45A est particulièrement intéressante.

3.4. Effet d'un antioxydant dans des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 µM de CuSO₄ pendant 16 h

3.4.1. Mesure de la génération d'un stress oxydatif chez des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 µM de CuSO₄ et/ou avec un antioxydant à l'aide d'une sonde fluorescente

En utilisant un antioxydant hydrosoluble (le Trolox) dans l'expérience qui suit, on a voulu déterminer si un stress oxydatif était toujours généré à l'intérieur des fibroblastes WI-38 incubés avec 500 µM de CuSO₄. En effet, l'antioxydant est censé contrecarrer l'effet « pro-oxydant » généré par une incubation avec 500 µM de CuSO₄. Les fibroblastes WI-38 ont été pré-incubés durant 8 h avec 100 µM de Trolox. Après la pré-incubation, les fibroblastes WI-38 ont été incubés pendant 16 h avec la même concentration de Trolox, auquel s'ajoute 500 µM de CuSO₄ ou non. La production de ROS a été évaluée à 0 h après l'arrêt de l'incubation

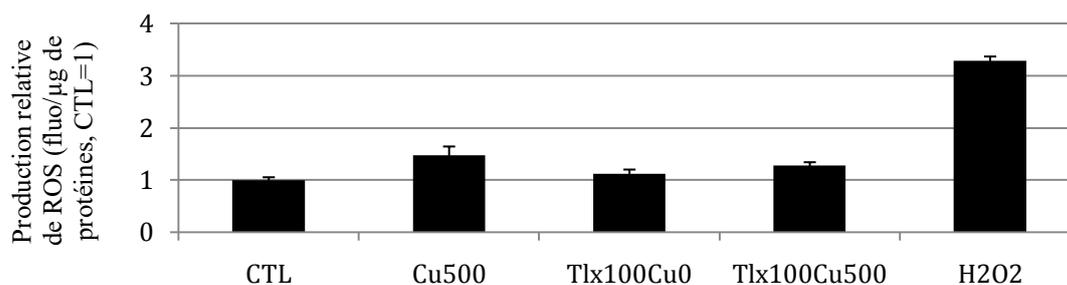


Figure 10 : Mesure de ROS dans des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 μM de CuSO₄ et/ou avec un antioxydant. Mesure de la production de ROS suite à l'oxydation de la sonde fluorescente H₂DCF-DA dans des fibroblastes WI-38 à 0 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 μM de CuSO₄ et/ou avec 100 μM de Trolox pendant 16 h. Les cellules « contrôles » n'ont pas été incubées avec du CuSO₄ ni avec du Trolox. Les cellules incubées 1 h avec 200 μM de H₂O₂ représentent les « contrôles positifs ». Après quantification des protéines (résultat en μg de protéines), toutes les valeurs obtenues ont été rapportées à celles obtenues pour les conditions « contrôles », considérées égales à 1. Les données reprises dans le graphique représentent les valeurs obtenues après 30 min d'incubation avec la sonde H₂DCF-DA. Ce graphique est représentatif de 2 expériences indépendantes (n=2) (CTL : contrôles ; Cu500 : CuSO₄ 500 μM ; Tlx100Cu0 : Trolox 100 μM + CuSO₄ 0 μM ; Tlx100Cu500 : Trolox 100 μM + CuSO₄ 500 μM ; H₂O₂ : H₂O₂ 200 μM).

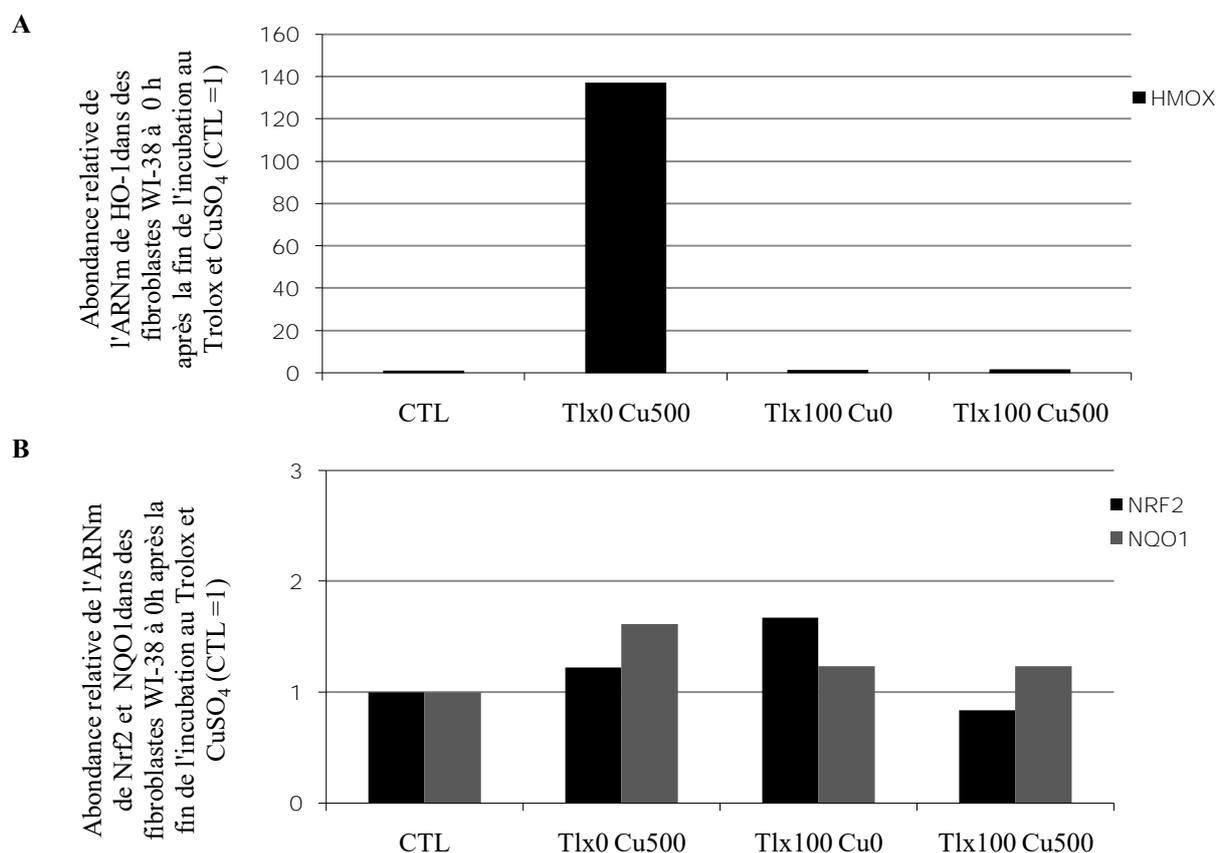


Figure 11 : Analyse de l'abondance relative de l'ARNm des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif. (A) L'abondance relative de l'ARNm de HO-1 a été évaluée dans des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 μM de CuSO₄ et 100 μM de Trolox pendant 16 h, comparé aux cellules « contrôles ». Les cellules « contrôles » ne sont pas incubées avec du CuSO₄ ni avec du Trolox. Le transcrite de 23 kDa a été utilisé comme référence pour effectuer la normalisation. L'abondance relative de l'ARNm de HO-1 dans les cellules « contrôles » est considérée égale à 1. **(B)** L'abondance relative de l'ARNm de NQO1 a été observée dans des fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO₄ et 100 μM de Trolox pendant 16 h, comparé aux cellules « contrôles ». Les cellules « contrôles » ne sont pas incubées avec du CuSO₄ ni avec du Trolox. Le transcrite de 23 kDa a été utilisé comme référence pour effectuer la normalisation. L'abondance relative de l'ARNm de NQO1 dans les cellules « contrôles » est considérée égale à 1. Ces graphiques sont représentatifs de 2 expériences indépendantes (n=2) (CTL : contrôles ; Tlx0Cu500 : Trolox 0 μM + CuSO₄ 500 μM ; Tlx100Cu0 : Trolox 100 μM + CuSO₄ 0 μM ; Tlx100Cu500 : Trolox 100 μM + CuSO₄ 500 μM).

avec le CuSO₄ et/ou avec le Trolox pendant 16 h (**Figure 10**). Les mesures ont également été effectuées sur des cellules « contrôles », non incubées avec le CuSO₄ ni avec le Trolox. Les valeurs obtenues pour chaque condition sont rapportées aux valeurs obtenues pour les cellules « contrôles », considérées égales à 1. Les cellules incubées pendant 1 h avec 200 µM de H₂O₂ représentent le « contrôle positif ».

On observe que la production de ROS dans les fibroblastes WI-38 à 0 h après l'arrêt de l'incubation avec le CuSO₄ augmente dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 µM de CuSO₄ (une augmentation de 1,5 fois), ce qui est en adéquation avec les résultats obtenus précédemment. En ce qui concerne les fibroblastes WI-38 incubés avec 100 µM de Trolox (avec ou sans CuSO₄), on observe une diminution de la production de ROS comparé aux cellules non incubées avec le Trolox.

3.4.2. Analyse de l'abondance relative de l'ARNm des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif chez des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 µM de CuSO₄ et/ou avec un antioxydant pendant 16 h

L'ARN total des fibroblastes WI-38 a été extrait puis rétrotranscrit en ADNc et ensuite analysé via la technique de qRT-PCR, afin d'évaluer le niveau d'expression des gènes associés à la réponse au stress oxydatif. L'abondance relative de l'ARNm de HO-1 Nrf2 et NQO1 a été analysé à 0 heure après l'arrêt de l'incubation avec 500 µM de CuSO₄ et avec 100 µM de Trolox. Les résultats ont confirmé une augmentation importante de l'abondance relative de l'ARNm de HO-1 (une augmentation de 137,2 fois) dans les fibroblastes WI-38 incubés sans Trolox et en présence de 500 µM de CuSO₄, comparé aux cellules « contrôles » (**Figure 11A**). Les cellules « contrôles » ne sont pas incubées avec du CuSO₄ ni avec du Trolox. L'abondance relative de l'ARNm de HO-1 est comparable à celle observable dans les cellules « contrôles » lorsque les cellules sont incubées avec 100 µM de Trolox et sans CuSO₄ ainsi que lorsqu'elles sont incubées avec 100 µM de Trolox et 500 µM de CuSO₄.

L'abondance relative de l'ARNm de NQO1 augmente légèrement (une augmentation de 1,6 fois) dans les fibroblastes WI-38 incubés sans Trolox et avec du 500 µM de CuSO₄, comparé aux cellules « contrôles » (**Figure 11B**). Les cellules « contrôles » ne sont pas incubées avec du CuSO₄, ni avec du Trolox. L'abondance relative de l'ARNm de NQO1 est comparable à celle observable dans les cellules « contrôles » lorsque les cellules sont incubées avec 100 µM de Trolox et sans CuSO₄, ainsi que lorsque les cellules sont incubées avec 100 µM de Trolox et 500 µM de CuSO₄. Quant à l'abondance relative en ARNm de Nrf2, nous ne pouvons rien conclure car les résultats n'étaient pas vraiment cohérents. Il faudrait répéter l'expérience.

3.4.3. Analyse de l'abondance relative de l'ARNm de certains gènes liés à la sénescence chez des fibroblastes WI-38 à 72 h après l'incubation ou non avec 500 µM de CuSO₄ et/ou avec un antioxydant pendant 16 h

Les modifications de l'expression de certains gènes liés à la sénescence ont été évaluées pour p16, p21^{WAF-1}, TGF-β1, la fibronectine et l'apolipoprotéine J à 72 h après l'arrêt de l'incubation avec le CuSO₄ et/ou le Trolox. Des modifications de l'abondance relative de l'ARNm de ces gènes avaient été observées lors de la caractérisation de notre modèle expérimental, c'est pourquoi nous les avons choisis. Les cellules « contrôles » n'ont pas été incubées avec le CuSO₄ ni avec le Trolox, et les valeurs d'abondance relative de l'ARNm de tous ces gènes sont rapportées aux valeurs obtenues pour les cellules contrôles considérées égales à 1.

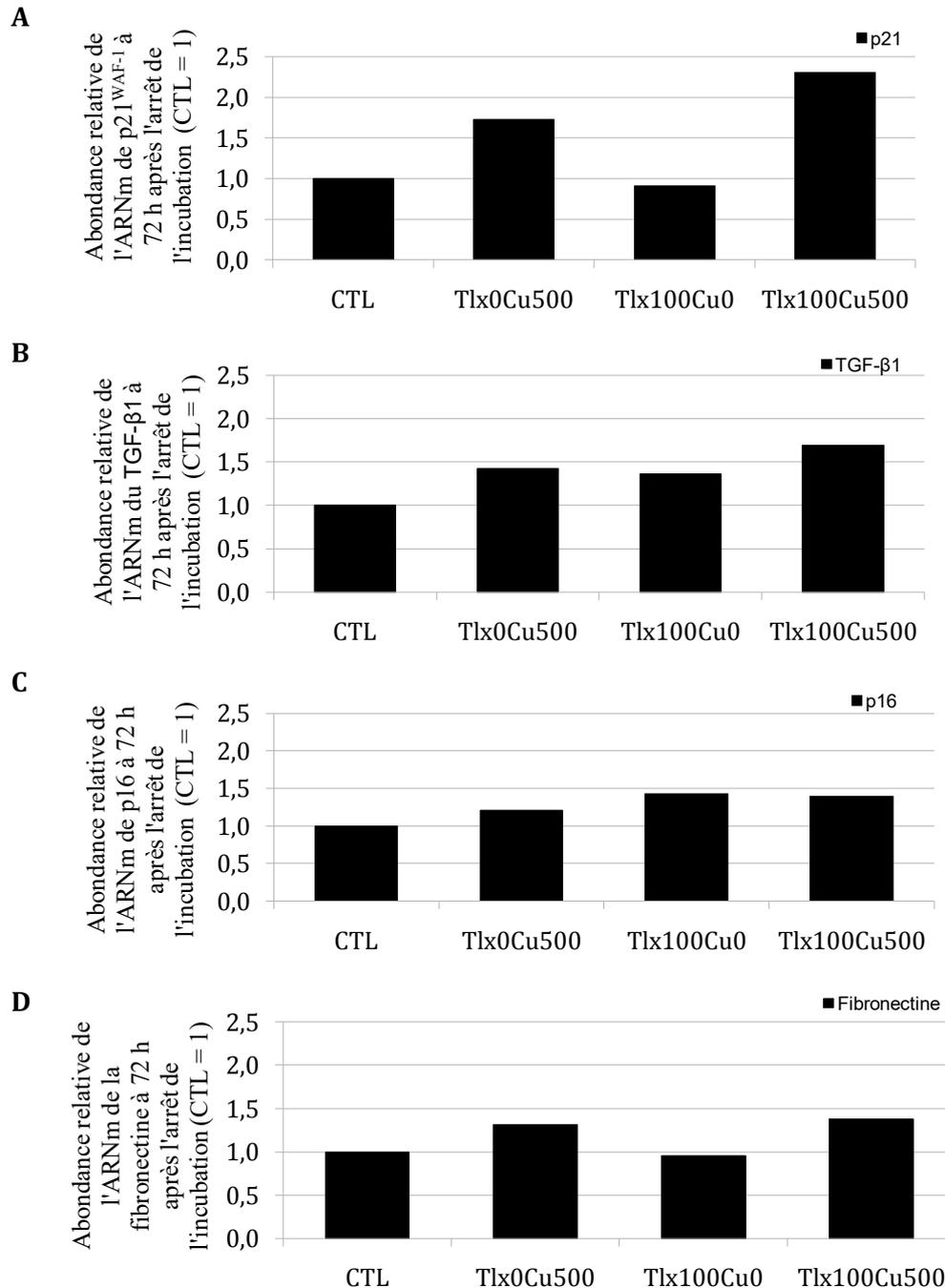


Figure 12 : Analyse de l'abondance relative de l'ARNm de certains gènes liés à la sénescence chez des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 μ M de CuSO_4 et/ou avec un antioxydant. L'abondance relative de l'ARNm de (A) p21^{WAF-1}, du (B) TGF- β 1, de (C) p16, et de (D) la fibronectine a été évaluée dans des fibroblastes WI-38 à 72 h après l'arrêt de l'incubation avec le CuSO_4 et/ou avec le Trolox. Le transcrite de 23 kDa a été utilisé comme référence pour effectuer la normalisation. Les résultats ont été rapportés aux valeurs obtenues pour les cellules « contrôles », non incubées avec le CuSO_4 ni avec le Trolox, qui sont considérées égales à 1. Ces graphiques sont représentatif d'une seule expérience (n=1) (CTL : contrôles ; Tlx0Cu500 : Trolox 0 μ M + CuSO_4 500 μ M ; Tlx100Cu0 : Trolox 100 μ M + CuSO_4 0 μ M ; Tlx100Cu500 : Trolox 100 μ M + CuSO_4 500 μ M).

A 72 h après la fin de l'incubation avec 500 μM de CuSO_4 et/ou 100 μM de Trolox, des modifications dans l'abondance relative de l'ARNm de différents gènes sont observées, quand on les compare aux données obtenues pour les cellules « contrôles ». L'abondance relative de l'ARNm de p21^{WAF-1} (**Figure 12A**), du TGF- β 1 (**Figure 12B**), de p16 (**Figure 12C**) et la fibronectine (**Figure 12D**) est plus importante dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 et sans le Trolox, comparé aux cellules « contrôles ». Les modifications les plus importantes s'observent pour p21^{WAF-1} (une augmentation de 1,7 fois) ainsi que pour le TGF- β 1 (une augmentation de 1,4 fois). L'abondance relative de l'ARNm de p21^{WAF-1} et du TGF- β 1 est assez semblable dans les cellules incubées avec 500 μM de CuSO_4 et 100 μM de Trolox (une augmentation de 2,3 fois pour p21^{WAF-1} et une augmentation de 1,7 fois pour le TGF- β 1).

Les modifications de l'abondance relative de l'ARNm de p16 (une augmentation de 1,2 fois) et de la fibronectine (une augmentation de 1,3 fois) sont relativement peu importantes dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 et sans Trolox. Dans les cellules incubées avec 500 μM de CuSO_4 , l'augmentation de l'abondance relative de l'ARNm de p16 (une augmentation de 1,4 fois) et de la fibronectine (une augmentation de 1,4 fois) est très similaire.

Ces résultats préliminaires (**Figures 10 et 11**) illustrent bien les propriétés antioxydantes du Trolox et pourtant, l'abondance relative de l'ARNm de certains gènes impliqués dans la SIPS n'est pas vraiment affectée dans les fibroblastes WI-38 à 72 h après l'arrêt de l'incubation avec 100 μM de Trolox et 500 μM de CuSO_4 . Que se passe-t-il entre 0 h et 72 h après l'arrêt de l'incubation avec le CuSO_4 et le Trolox ? Un stress oxydatif serait-il généré ?

3.5. Effet du Trolox dans des fibroblastes WI-38 à 24 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h

3.5.1. Mesure de la génération d'un stress oxydatif dans des fibroblastes WI-38 à 24 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 μM de CuSO_4 et/ou avec le Trolox

Nous avons utilisé la sonde $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ afin de mettre en évidence la production de ROS dans des fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μM de CuSO_4 et/ou avec 100 μM de Trolox. Cette production de ROS a été évaluée à 24 h après l'arrêt de l'incubation avec le CuSO_4 et/ou avec le Trolox pendant 16 h (**Figure 13**). Les mesures ont également été effectuées sur des cellules « contrôles », non incubées avec le CuSO_4 ni avec le Trolox. Les valeurs obtenues pour chaque condition sont rapportées aux valeurs obtenues pour les cellules « contrôles », considérées égales à 1. Les cellules incubées pendant 1 h avec 200 μM de H_2O_2 représentent le « contrôle positif ».

On observe que la production de ROS augmente dans les fibroblastes WI-38 incubés 500 μM de CuSO_4 et 100 μM de Trolox (une augmentation de 1,9 fois), comparé aux cellules « contrôles ». Les cellules « contrôles » ne sont pas incubées avec CuSO_4 ni avec le Trolox. Cette augmentation est de l'ordre de celle observée dans les fibroblastes WI-38 incubés uniquement avec 500 μM de CuSO_4 . Ceci est très interpellant car un stress oxydatif serait généré à plus long terme après l'arrêt de l'incubation avec le CuSO_4 . Le fait de contrer le stress oxydatif pendant l'incubation avec le CuSO_4 ne change rien à la production de ROS. Le stress oxydatif détecté à 24 h après l'arrêt de l'incubation avec le CuSO_4 et le Trolox est peut être déclencheur de la SIPS.

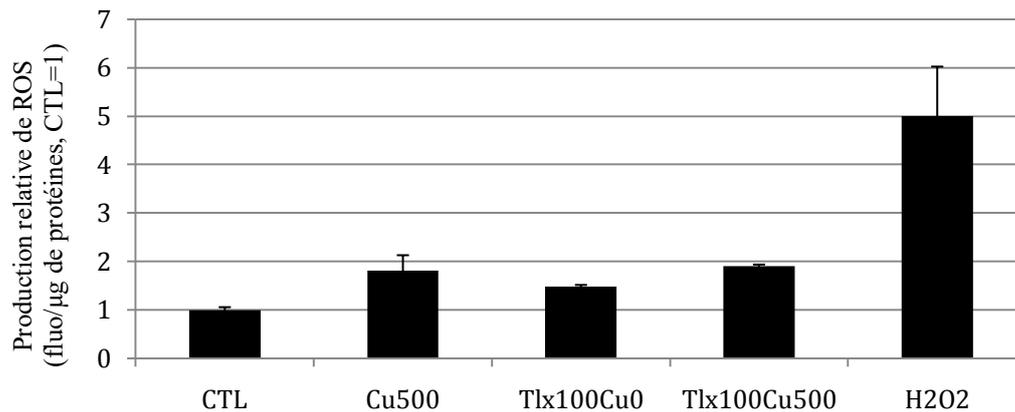


Figure 13 : Stress oxydatif dans des fibroblastes WI-38 à 24 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 µM de CuSO₄ et/ou avec le Trolox. Mesure de la production de ROS suite à l'oxydation de la sonde fluorescente H₂DCF-DA dans des fibroblastes WI-38 à 24 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 µM de CuSO₄ et/ou avec 100 µM de Trolox pendant 16 h. Les cellules « contrôles » n'ont pas été incubées avec du CuSO₄ ni avec du Trolox. Les cellules incubées 1 h avec 200 µM de H₂O₂ représentent les « contrôles positifs ». Après quantification des protéines, toutes les valeurs obtenues ont été rapportées à celles obtenues pour les conditions « contrôles », considérées égales à 1. Ce graphique est représentatif d'une seule expérience (n=1) (CTL : contrôles ; Cu500 : CuSO₄ 500 µM ; Tlx100Cu0 : Trolox 100 µM + CuSO₄ 0 µM ; Tlx100Cu500 : Trolox 100 µM + CuSO₄ 500 µM, H₂O₂ : H₂O₂ 200 µM).

A

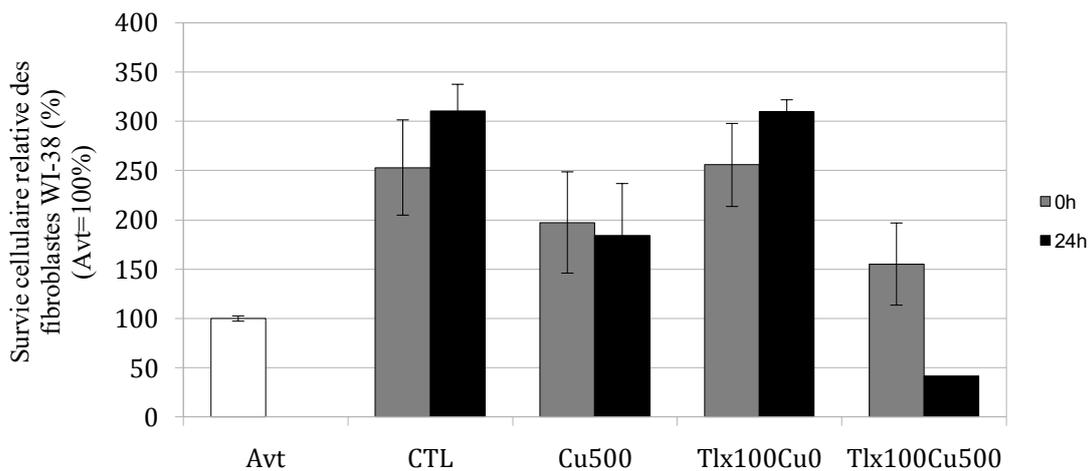


Figure 14 : Evaluation de la viabilité cellulaire des fibroblastes WI-38 après l'arrêt de l'incubation avec 500 µM de CuSO₄ et/ou avec 100 µM de Trolox pendant 16 h. La viabilité cellulaire a été évaluée par la technique du « MTT Assay » à 0 h et à 24 h après l'arrêt de l'incubation. Les cellules « contrôles » n'ont pas été incubées avec du CuSO₄ ni avec du Trolox. Les données obtenues pour les différentes conditions ont été normalisées aux données obtenues pour les cellules avant l'incubation. Ces valeurs obtenues pour les cellules « avant incubation » sont considérées égales à 100 %. Ce graphique est représentatif de deux expériences indépendantes (Avt : avant l'incubation ; CTL : contrôles ; Cu500 : CuSO₄ 500 µM ; Tlx100Cu0 : Trolox 100 µM + CuSO₄ 0 µM ; Tlx100Cu500 : Trolox 100 µM + CuSO₄ 500 µM).

3.5.2. Evaluation de la viabilité cellulaire des fibroblastes WI-38 incubés pendant 16 h avec 500 μM de CuSO_4 et/ou avec le Trolox

Etant donné que l'incubation de 16 h avec le CuSO_4 et le Trolox semble altérer la morphologie des fibroblastes WI-38 à 72 h après l'arrêt de l'incubation, nous avons décidé d'évaluer la viabilité cellulaire de ces fibroblastes à 0 et 24 h après l'arrêt de l'incubation grâce à la technique du « MTT Assay ». Pour rappel, cette technique permet d'établir une corrélation indirecte entre la quantité de MTT réduit et la survie cellulaire.

La survie cellulaire des fibroblastes WI-38 a été évaluée avant, à 0h et à 24 h après une incubation de 16 h avec 500 μM de CuSO_4 et/ou 100 μM de Trolox. Les résultats obtenus pour chaque condition ont été normalisés aux résultats obtenus pour les cellules avant l'incubation au CuSO_4 et/ou Trolox qui sont considérés égal à 100 %.

A 0 h après l'arrêt de l'incubation (**Figure 14**), une concentration de 100 μM de Trolox ne semble pas altérer la survie cellulaire des fibroblastes WI-38. Lorsque les fibroblastes WI-38 sont incubés avec 500 μM de CuSO_4 et 100 μM de Trolox, leur survie cellulaire ne semble pas non plus être altérée.

A 24 h après l'arrêt de l'incubation, une concentration de 100 μM de Trolox ne semble pas altérer la survie cellulaire des fibroblastes WI-38. Par contre, lorsque les fibroblastes WI-38 sont incubés avec 500 μM de CuSO_4 et 100 μM de Trolox, on observe une mortalité importante (environ 50 %).

Ces résultats illustrent malheureusement le fait que l'association entre le Trolox et le CuSO_4 apparaît toxique pour les fibroblastes WI-38 à 24 h après l'arrêt de l'incubation, malgré une viabilité cellulaire qui n'est pas altérée lorsqu'on regarde à 0 h après l'arrêt de l'incubation. Dès lors, l'utilisation d'un autre antioxydant paraît judicieuse si on veut réaliser des expériences à 72 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 μM de CuSO_4 , afin d'étudier les différents biomarqueurs de la sénescence.

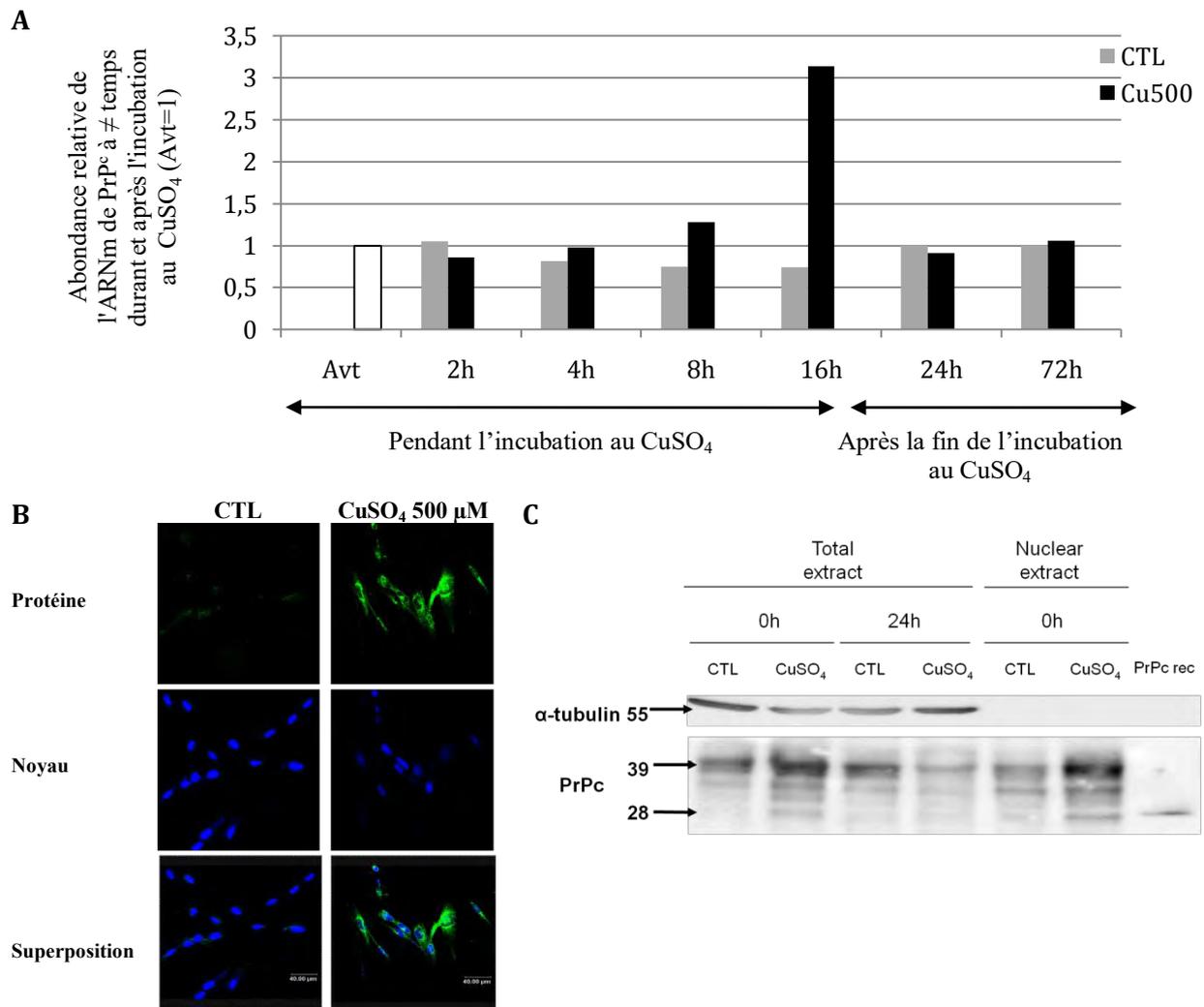


Figure 15 : Le cuivre induit une augmentation de l'expression de PrP^c dans des fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μ M de CuSO₄. (A) Abondance relative de l'ARNm de PrP^c dans des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 μ M de CuSO₄ ainsi que dans les cellules « contrôles ». Les cellules « contrôles » ne sont pas incubées avec du CuSO₄. L'abondance relative de l'ARNm de PrP^c a été analysée à différents temps durant et après l'incubation avec le CuSO₄ (à 24 et 72 h après la fin de l'incubation). Le transcrite de 23 kDa a été utilisé comme référence pour effectuer la normalisation. Les résultats ont été rapportés aux valeurs obtenues avant l'incubation qui étaient considérées égales à 1. (B) Détection par immunofluorescence de l'abondance protéique de PrP^c dans des fibroblastes incubés ou non avec 500 μ M de CuSO₄ pendant 16 h. Les fibroblastes WI-38 ont été incubés avec l'anticorps monoclonal PrP^c et la sonde fluorescente Alexa 488 anti-souris a été utilisée comme anticorps secondaire. Le Topro a été utilisé pour visualiser le noyau. (C) Détection par Western-blot de l'abondance protéique de PrP^c dans les fibroblastes WI-38 incubés avec ou non avec 500 μ M de CuSO₄. Les cellules « contrôles » ne sont pas incubées avec du CuSO₄. L' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge et la protéine prion recombinante humaine a permis de contrôler la spécificité de l'anticorps PrP^c. Ceci est représentatif de 2 expériences indépendantes (n=2) (CTL : contrôles ; Cu500 : CuSO₄ 500 μ M).

4. Etude du rôle de la protéine prion dans les mécanismes de la sénescence induite prématurément par le cuivre

Après avoir abordé l'implication du cuivre dans les mécanismes par lesquels la SIPS pourrait être déclenchée, nous avons mis en évidence dans un premier temps que le cuivre induisait une augmentation de l'expression de PrP^c dans les fibroblastes WI-38. Dans un second temps, nous avons invalidé l'expression de PrP^c afin de voir le rôle potentiel joué par PrP^c dans les mécanismes de SIPS induite par le cuivre.

4.1. Le cuivre induit une augmentation de l'expression de PrP^c dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 µM de CuSO₄ pendant 16 h à travers un stress oxydatif

4.1.1. Analyse de l'abondance relative de l'ARNm de PrP^c dans des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 µM de CuSO₄ pendant différents temps d'incubation

Afin de déterminer si le cuivre engendre une augmentation de l'expression de PrP^c dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 µM de CuSO₄, nous avons extrait l'ARN total à différents temps durant et après l'incubation avec le CuSO₄. Cet ARN a été rétrotranscrit en ADNc et ensuite analysé par qRT-PCR afin d'évaluer le niveau d'expression de l'ARNm de PrP^c à différents temps durant et après l'incubation avec 500 µM de CuSO₄ (**Figure 15A**). Le gène 23 kDa a été utilisé comme gène de référence pour effectuer la normalisation et l'abondance relative de l'ARNm de PrP^c dans les cellules « contrôles » qui est considérée égale à 1.

Les résultats ont montré une augmentation de l'abondance relative de l'ARNm de PrP^c (une augmentation de 3,1 fois) après 16 h d'incubation avec 500 µM de CuSO₄. A 24 h et à 72 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 µM de CuSO₄, l'abondance relative de l'ARNm de PrP^c était revenue au niveau des cellules « contrôles », non incubées avec du CuSO₄. L'augmentation observée à la fin de l'incubation avec le CuSO₄ est donc transitoire.

4.1.2. Etude de l'abondance protéique de PrP^c par marquage en immunofluorescence dans des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 µM de CuSO₄ pendant 16 h

Afin de renforcer les résultats obtenus précédemment, la détection par immunofluorescence a été utilisée afin de déterminer l'abondance protéique de PrP^c dans des fibroblastes WI-38 « contrôles », non incubés avec du CuSO₄ et dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 µM de CuSO₄. A 0 heure après l'arrêt de l'incubation avec le CuSO₄, le signal correspondant à PrP^c apparaît plus important dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 µM de CuSO₄ pendant 16 h, comparé aux cellules « contrôles » (**Figure 15B**). Dans une certaine proportion de fibroblastes WI-38 incubés avec du CuSO₄, un signal apparaissait également dans la région nucléaire et nous avons émis l'hypothèse que PrP^c subissait une translocation nucléaire suite à une incubation avec du CuSO₄. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé des extraits protéiques nucléaires analysés ensuite par Western-blot.

4.1.3. Etude de l'abondance protéique de PrP^c par Western-blot dans des fibroblastes WI-38 incubés ou non avec 500 µM de CuSO₄ pendant 16 h

Afin d'évaluer l'abondance protéique de PrP^c après une incubation de 16 h avec 500 µM de CuSO₄ et voir si une translocation de PrP^c vers le noyau avait effectivement lieu, un Western-blot a été réalisé à l'aide d'extraits nucléaires (**Figure 15C**). Un extrait purifié de PrP^c (protéine PrP^c recombinante humaine) a également été utilisé afin de contrôler que notre anticorps se liait de manière spécifique. L' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. L'abondance protéique de PrP^c à 0 heure après la fin de l'incubation avec 500 µM de CuSO₄ semble être plus importante dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 µM de CuSO₄, comparé aux cellules « contrôles », non incubées avec le CuSO₄. De plus, une translocation nucléaire semble effectivement avoir lieu dans les cellules incubées avec 500 µM de CuSO₄, comparé aux cellules « contrôles » non incubées avec du CuSO₄. A 24 h après l'incubation avec 500 µM de CuSO₄, l'abondance protéique de PrP^c est légèrement diminuée.

Ceci confirme bien notre résultat précédent : une augmentation transitoire de l'expression de PrP^c a lieu dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 µM de CuSO₄.

4.2. Etude du rôle de PrP^c dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence induite pas le cuivre via l'utilisation de siRNA.

Pour évaluer le rôle potentiel de PrP^c dans les mécanismes de SIPS, nous avons décidé d'utiliser des siRNA invalidant l'expression de PrP^c, et de regarder ce qui se passe lorsque PrP^c n'est plus exprimé dans les fibroblastes WI-38. En fonction du résultat obtenu, on pourrait éventuellement déterminer si PrP^c joue un rôle protecteur ou à l'inverse un rôle plus actif dans le déclenchement de la sénescence. En effet, après invalidation de PrP^c, si une augmentation de l'apparition des différents biomarqueurs associés à la sénescence (et donc une aggravation du phénotype sénescence) apparaît après une incubation avec 500 µM de CuSO₄ pendant 16 h, on pourrait en déduire que PrP^c joue un rôle « protecteur ». Tandis que si on observe une diminution de l'apparition des différents biomarqueurs suite à l'invalidation de PrP^c et après une incubation de 16 h avec 500 µM de CuSO₄, on pourrait déduire que le rôle de PrP^c serait plus « actif » dans ces mécanismes.

4.2.1. Mise au point des siRNA invalidant l'expression de PrP^c

Afin d'invalider l'expression de PrP^c, un modèle expérimental a été mis en place. Au jour 0, les fibroblastes WI-38 sont ensemencés dans des boîtes de culture de 25 cm². 24 h après le repiquage, les fibroblastes WI-38 ont été transfectés durant 24 h en présence d'un siRNA spécifique du gène *Prnp* humain, afin d'invalider l'expression de PrP^c. Le siRNA NTS (pour Non-Targeting Smartpool) est utilisé comme « contrôle négatif ». Les fibroblastes transfectés avec du Dharmafect permettent d'évaluer la toxicité liée à la transfection.

L'impact du siRNA invalidant l'expression PrP^c sur l'abondance relative de l'ARNm de PrP^c avait été analysé dans un premier temps dans des fibroblastes non incubés avec 500 µM de CuSO₄ (résultats présentés dans l'article de juin) et une diminution massive de l'abondance relative de PrP^c était observable (une diminution de près de 98%).

Nous avons continué à mettre au point notre procédure expérimentale en incubant avec 500 µM de CuSO₄.

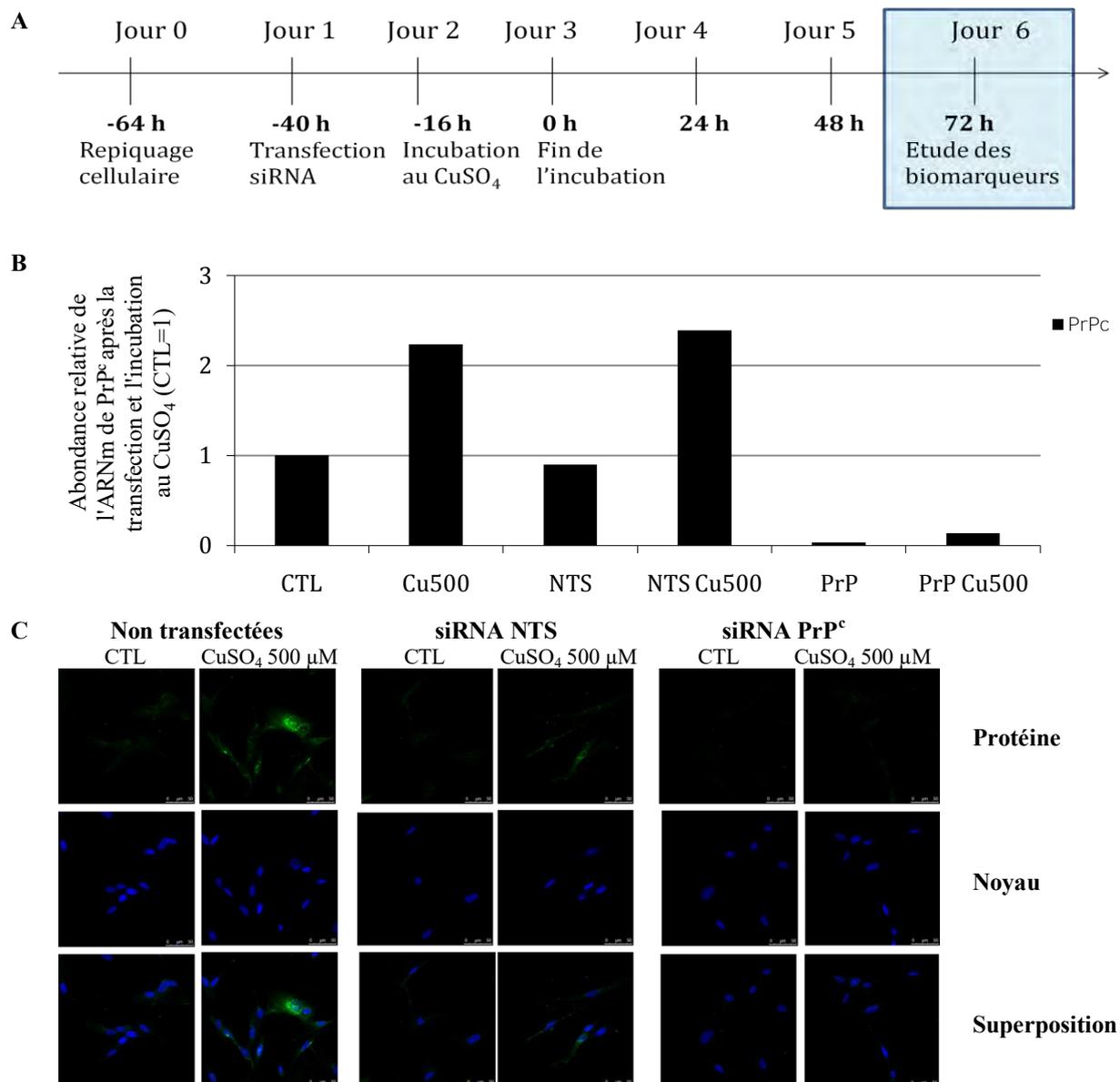


Figure 16 : Invalidation de l'expression de PrP^c dans notre modèle de sénescence induite par le CuSO₄. (A) Modèle expérimental d'invalidation de l'expression de PrP^c dans notre modèle de SIPS au CuSO₄. Au jour 0, les fibroblastes WI-38 sont ensemencés dans des boîtes de cultures de 25 cm² et 24 h après le repiquage (jour 1), ils sont transfectés avec les siRNAs pendant 24 h. Au jour 2, les fibroblastes WI-38 sont incubés ou non avec 500 μM de CuSO₄ durant 16 h. Au jour 3, l'incubation est arrêtée par un rinçage au PBS et les fibroblastes WI-38 sont ensuite incubés avec du BME + 10% de FBS. Au jour 4, soit 24 h après l'arrêt de l'incubation au CuSO₄, les fibroblastes WI-38 sont ensemencés dans des plaques 6-puits à une densité de 20 000 cellules/puits ou dans des plaques 24-puits à une densité de 10 000 cellules/puits. 72 h après la fin de l'incubation au CuSO₄, au jour 6, les différents biomarqueurs de la sénescence sont étudiés. (B) L'abondance relative de l'ARNm de PrP^c a été évaluée dans des fibroblastes WI-38 transfectés avec le siRNA PrP^c à 0 h après l'incubation avec du CuSO₄ 500 μM, comparé aux cellules « contrôles » non transfectées et non incubées avec du CuSO₄. Le transcrite de 23 kDa a été utilisé comme référence pour effectuer la normalisation. Les résultats ont été rapportés aux valeurs obtenues pour les cellules non transfectées qui sont considérées égales à 1. (C) Détection par immunofluorescence de l'abondance protéique de PrP^c dans des fibroblastes ayant subi ou non la transfection ainsi qu'une incubation avec 500 μM de CuSO₄ pendant 16 h. Les fibroblastes WI-38 ont été incubés avec l'anticorps monoclonal PrP^c et la sonde fluorescente Alexa 488 anti-souris a été utilisée comme anticorps secondaire. Le Topro a été utilisé pour visualiser le noyau. Ceci est représentatif de 2 expériences indépendantes (n=2) (CTL : contrôles ; Cu500 : CuSO₄ 500 μM ; NTS : siRNA NTS ; NTSCu500 : NTS + CuSO₄ 500 μM ; PrP : siRNA PrP^c ; PrPCu500 : siRNA PrP^c + CuSO₄ 500 μM)

4.2.1.1. Etude de l'invalidation de l'expression de PrP^c dans des fibroblastes WI-38 juste après l'incubation de 16 h avec le CuSO₄

Nous avons légèrement modifié notre modèle de SIPS de départ (**Figure 16A**). Les fibroblastes WI-38 sontensemencés dans des boîtes de culture de 25 cm² au jour 0. 16 h après le repiquage (jour1), les fibroblastes WI-38 sont transfectés avec les siRNAs (siRNA PrP^c, siRNA NTS) pendant 24 h. Après l'arrêt de la transfection (jour 2), les fibroblastes WI-38 sont incubées avec du BME + 10% de FBS pendant 8 h. Après ce temps de récupération, les fibroblastes WI-38 sont incubés avec 500 µM de CuSO₄ pendant 16 h. Au jour 3, l'incubation est arrêtée par un rinçage au PBS et les cellules sont ensuite incubées avec du BME + 10% de FBS. Au jour 4, soit 24 h après l'arrêt de l'incubation au CuSO₄, les fibroblastes WI-38 sontensemencés dans des plaques 6-puits à une densité de 20 000 cellules/puits ou dans des plaques 24-puits à une densité de 10 000 cellules/puits pour étudier l'activité β galactosidase associée à la sénescence ainsi que le potentiel prolifératif. L'étude des différents biomarqueurs se réalise au 6^{ème} jour, soit 72 h après la fin de l'incubation avec 500 µM de CuSO₄. L'abondance relative de l'ARNm de différents gènes associés à la sénescence est également évaluée au 6^{ème} jour afin d'observer d'éventuelles modifications.

4.2.1.1.1. Effet de l'invalidation de PrP^c sur l'abondance relative de l'ARNm de PrP^c juste après l'incubation de 16 h avec 500 µM de CuSO₄

L'ARN total isolé de fibroblastes WI-38 transfectés ou non avec les siRNA (siRNA invalidant l'expression de PrP^c et le siRNA NTS) durant 24 h puis incubés pendant 16 h avec 500 µM de CuSO₄ a été rétrotranscrit en ADNc et ensuite analysé par qRT-PCR afin d'évaluer l'abondance relative de l'ARNm de PrP^c (**Figure 16B**). Le siRNA NTS a été utilisé comme « contrôle négatif ». L'ARNm de 23 kDa a été utilisé comme référence pour effectuer la normalisation. Les résultats ont été rapportés aux valeurs obtenues pour les cellules non transfectées qui sont considérées égales à 1.

A 0 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 µM de CuSO₄, on observe dans les fibroblastes transfectés avec le siRNA invalidant l'expression de PrP^c une diminution quasi-totale de l'abondance relative de PrP^c (plus de 95 %), par rapport aux cellules non transfectées et aux cellules transfectées avec le siRNA NTS à 72 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 µM de CuSO₄.

4.2.1.1.2. Effet de l'invalidation de PrP^c sur l'abondance protéique de PrP^c suite à l'incubation avec du CuSO₄ pendant 16 h via une technique d'immunofluorescence

La détection par immunofluorescence a été utilisée afin de déterminer l'abondance protéique de PrP^c dans les fibroblastes WI-38 « contrôles » non transfectés avec les siRNA et dans les fibroblastes WI-38 transfectés avec les différents siRNAs (siRNA invalidant l'expression de PrP^c et siRNA NTS) (**Figure 16C**). Les fibroblastes transfectés et non transfectés ont été incubés avec ou sans 500 µM de CuSO₄ pendant 16 h. Le siRNA NTS a été utilisé comme « contrôle négatif ». A 0 heure après l'arrêt de l'incubation avec 500 µM de CuSO₄, le signal correspondant à PrP^c apparaît plus important dans les fibroblastes WI-38 non transfectés que dans les fibroblastes WI-38 ayant subi la transfection. Dans les cellules non transfectées, le signal correspondant à PrP^c apparaît quant à lui plus important dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 µM de CuSO₄, comparé aux fibroblastes WI-38 non incubés avec 500 µM de CuSO₄, ce qui est en adéquation avec les résultats obtenus précédemment.

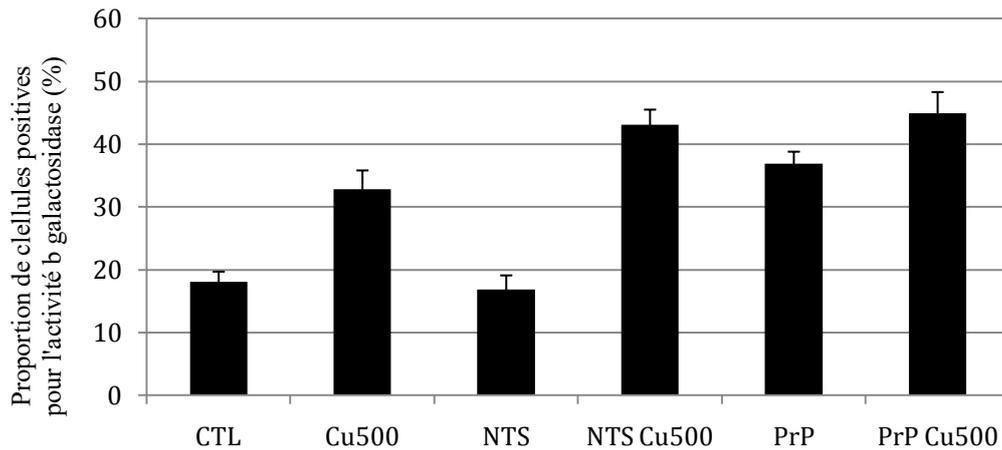


Figure 17 : L'invalidation de l'expression de PrP^c induit l'apparition de biomarqueurs de la sénescence à 72 h après l'arrêt de l'incubation de 16 h avec le CuSO₄. Le pourcentage de cellules positives pour l'activité β -galactosidase associée à la sénescence a été calculé dans des fibroblastes WI-38 transfectés à 72 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 μ M de CuSO₄. Les cellules « contrôles » n'ont pas été transfectées, ni incubées avec le CuSO₄. Ce graphique est représentatif d'une seule expérience (n=1) (CTL : contrôles ; Cu500 : CuSO₄ 500 μ M, NTS : transfectées avec siRNA NTS, NTS Cu500 : transfectées avec siRNA NTS + CuSO₄ 500 μ M ; PrP : transfectées avec siRNA PrP^c, PrP Cu500 : transfectées avec siRNA PrP^c + CuSO₄ 500 μ M).

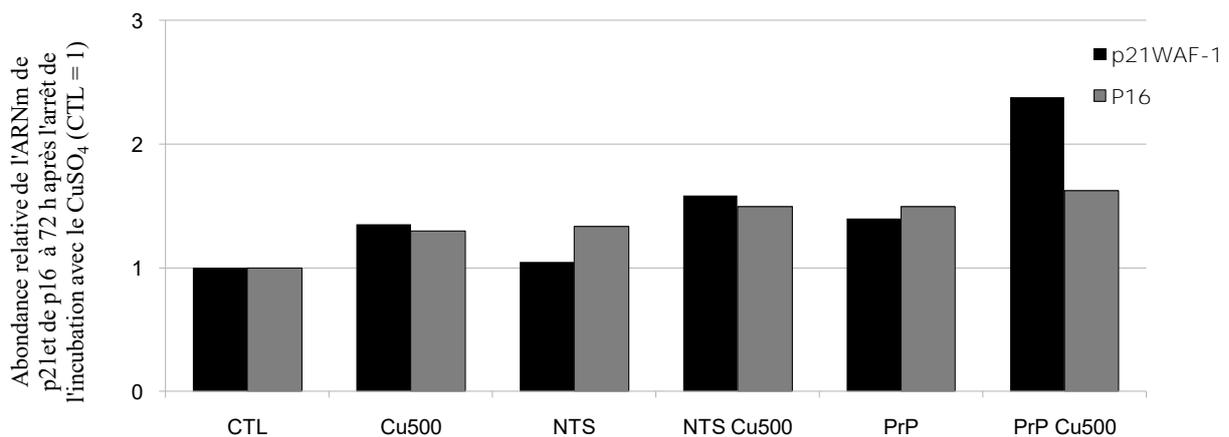


Figure 18 : Effet de l'invalidation de PrP^c sur l'abondance relative des gènes impliqués dans la sénescence L'abondance relative de l'ARNm de p16 et p21^{WAF-1} a été évaluée dans des fibroblastes WI-38 ayant subi la transfection et l'incubation avec 500 μ M de CuSO₄, à 72 h après l'arrêt de l'incubation avec le CuSO₄. Le transcrite de 23 kDa a été utilisé comme référence pour effectuer la normalisation. Les résultats ont été rapportés aux valeurs obtenues pour les cellules non « contrôles », qui n'ont pas été transfectées ni incubées avec du CuSO₄ et qui sont considérées égales à 1. Ce graphique est représentatif d'une seule expérience (n=1) (CTL : contrôles ; Cu500 : CuSO₄ 500 μ M, NTS : transfectées avec siRNA NTS, NTS Cu500 : transfectées avec siRNA NTS + CuSO₄ 500 μ M ; PrP : transfectées avec siRNA PrP^c, PrP Cu500 : transfectées avec siRNA PrP^c + CuSO₄ 500 μ M).

4.2.2. Effet de l'inactivation de PrP^c sur les mécanismes de SIPS

Nous avons vu que la sénescence était caractérisée par différents biomarqueurs. Ici, nous avons choisi d'analyser la prolifération cellulaire, l'activité β -galactosidase associée à la sénescence ainsi que des changements dans le niveau d'expression de certains gènes. Il faut bien se rendre compte que ce ne sont que des résultats préliminaires : les expériences n'ont été réalisées qu'une seule fois. Malheureusement, suite à un souci technique de dernière minute, aucune donnée n'est disponible pour l'étude de la prolifération cellulaire. Nous allons donc nous focaliser uniquement sur les deux autres biomarqueurs.

4.2.2.1. *Activité β -galactosidase associée à la sénescence*

Le pourcentage de cellules positives pour l'activité β -galactosidase associée à la sénescence a été évalué dans des fibroblastes WI-38 ayant subi ou non la transfection durant 24 h, puis incubés ou non avec 500 μ M de CuSO₄, à 72 h après l'arrêt de l'incubation avec le CuSO₄. À l'aide d'un microscope optique, au minimum 400 cellules par puits ont été comptées, ainsi que la proportion de cellules qui apparaissent bleues parmi ces 400 cellules. Ces cellules qui apparaissent bleues représentent les cellules possédant une activité β -galactosidase associée à la sénescence et détectable à pH 6.

Dans les fibroblastes non transfectés et incubés avec 500 μ M de CuSO₄, on observe une augmentation d'environ 2 fois du pourcentage de cellules positives pour l'activité β -galactosidase associée à la sénescence, comparé aux cellules « contrôles » (**Figure 17**). Les cellules « contrôles » sont des fibroblastes WI-38 non transfectés et non incubés avec le CuSO₄. Dans les cellules transfectées avec le siRNA NTS et non incubées avec le CuSO₄, on n'observe pas d'augmentation du pourcentage de cellules positives pour l'activité β -galactosidase associée à la sénescence. Quant aux fibroblastes WI-38 transfectés avec le siRNA invalidant l'expression de PrP^c et incubés ou non avec le CuSO₄, on observe une augmentation du pourcentage de cellules positives pour l'activité β -galactosidase associée à la sénescence. On note une augmentation de 2 fois pour les fibroblastes transfectés et non incubés avec du CuSO₄ et une augmentation de 2,5 fois pour les fibroblastes transfectés et incubés avec 500 μ M de CuSO₄. Cette augmentation est surprenante, car on la retrouve même dans les cellules transfectées avec le siRNA PrP^c mais non incubées avec 500 μ M de CuSO₄.

4.2.2.2. *Modification de l'expression de certains gènes impliqués dans la sénescence*

Les modifications de l'expression de certains gènes liés à la sénescence ont été évaluées pour p16 à 72 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 μ M de CuSO₄. Les résultats à 72 h après l'arrêt de l'incubation (**Figure 18**) révèlent une augmentation de l'abondance relative de l'ARNm de p16 après le traitement avec le siRNA invalidant l'expression de PrP^c dans les fibroblastes WI-38 incubés avec 500 μ M de CuSO₄ (une augmentation de 1,6 fois) par rapport aux cellules non transfectées, ainsi que par rapport aux cellules transfectées avec le siRNA NTS. Dans les fibroblastes WI-38 transfectés avec le siRNA invalidant l'expression de PrP^c et n'ayant pas été incubés avec 500 μ M de CuSO₄, l'abondance relative de l'ARNm de PrP^c (une augmentation de 1,5 fois) est semblable à celle des cellules transfectées avec le siRNA invalidant l'expression de PrP^c et incubées avec 500 μ M de CuSO₄.

Nous avons également analysé l'abondance relative de l'ARNm de p21^{WAF-1} à 72 h après l'arrêt de l'incubation avec 500 μ M de CuSO₄ pendant 16 h. Une augmentation de l'abondance relative de l'ARNm de p21^{WAF-1} de près de 2,5 fois est observée dans les fibroblastes WI-38 transfectés avec le siRNA invalidant l'expression de PrP^c et incubés avec

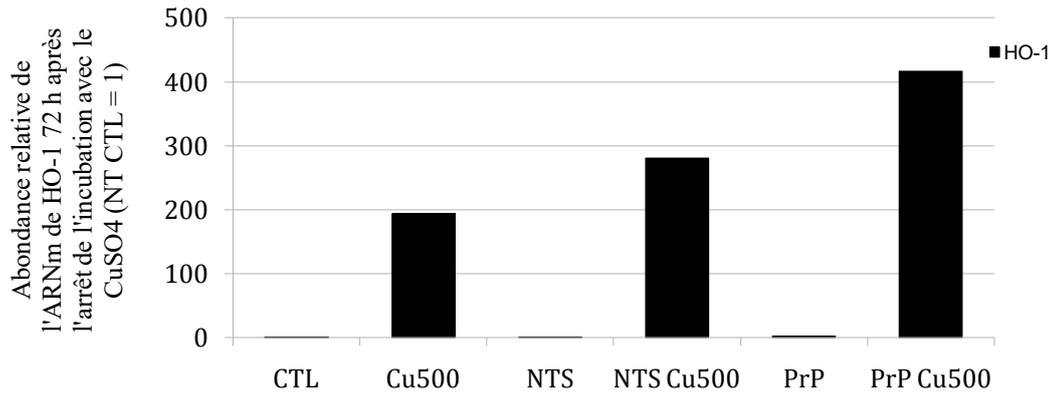


Figure 19 : Effet de l'inactivation de PrP^c sur la réponse antioxydante des fibroblastes WI-38 suite à une incubation de 16 h avec 500 μ M de CuSO₄. L'abondance relative de l'ARNm de HO-1 a été évaluée dans des fibroblastes WI-38 ayant subi la transfection et l'incubation avec 500 μ M de CuSO₄, à 0 h après l'arrêt de l'incubation avec le CuSO₄. Le transcrite de 23 kDa a été utilisé comme référence pour effectuer la normalisation. Les résultats ont été rapportés aux valeurs obtenues pour les cellules « contrôles », non transfectées et non incubées avec du CuSO₄ et qui sont considérées égales à 1. Ce graphique est représentatif d'une seule expérience (n=1) (CTL : contrôles ; Cu500 : CuSO₄ 500 μ M, NTS : transfectées avec siRNA NTS, NTS Cu500 : transfectées avec siRNA NTS + CuSO₄ 500 μ M ; PrP : transfectées avec siRNA PrP^c, PrP Cu500 : transfectées avec siRNA PrP^c + CuSO₄ 500 μ M).

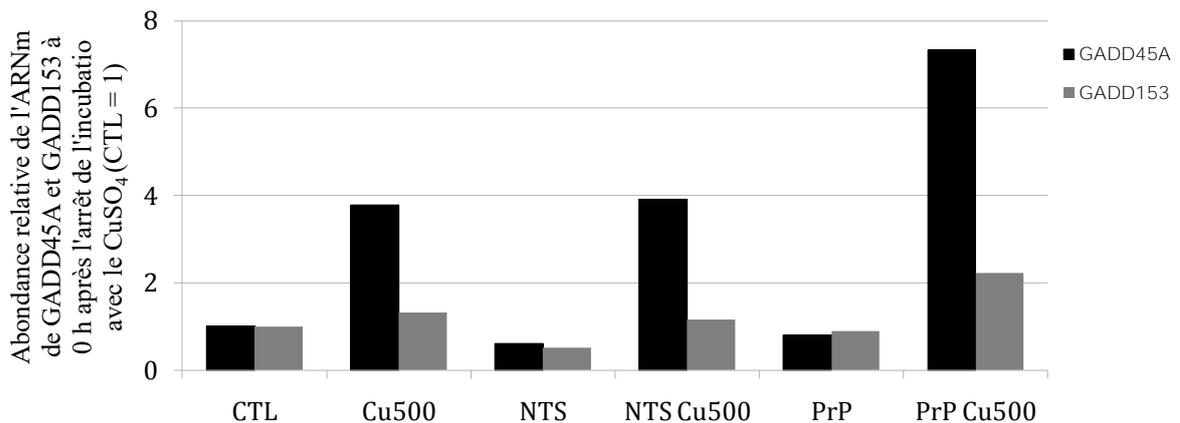


Figure 20 : Effet de l'inactivation de PrP^c sur l'abondance relative de l'ARNm des gènes impliqués dans l'arrêt de prolifération dû aux dommages à l'ADN. L'abondance relative de l'ARNm de GADD45A et GADD153 a été évaluée dans des fibroblastes WI-38 ayant subi la transfection et l'incubation avec 500 μ M de CuSO₄, à 0 h après l'arrêt de l'incubation avec le CuSO₄. Le transcrite 23 kDa a été utilisé comme référence pour effectuer la normalisation. Les résultats ont été rapportés aux valeurs obtenues pour les cellules « contrôles », non transfectées et non incubées avec le CuSO₄ considérées égales à 1. Ce graphique est représentatif d'une seule expérience (n=1) (CTL : contrôles ; Cu500 : CuSO₄ 500 μ M, NTS : transfectées avec siRNA NTS, NTS Cu500 : transfectées avec siRNA NTS + CuSO₄ 500 μ M ; PrP : transfectées avec siRNA PrP^c, PrP Cu500 : transfectées avec siRNA PrP^c + CuSO₄ 500 μ M).

500 μM de CuSO_4 comparé aux cellules non transfectées ainsi qu'aux cellules transfectées avec le siRNA NTS. Dans les fibroblastes WI-38 transfectés avec le siRNA invalidant l'expression de PrP^c et n'ayant pas été incubés avec 500 μM de CuSO_4 , l'abondance relative de l'ARNm de PrP^c est semblable à celle des cellules non transfectées et incubées avec 500 μM de CuSO_4 (une augmentation d'environ 1,5 fois).

Ces résultats préliminaires ne nous permettent pas pour l'instant de proposer un rôle pour PrP^c dans les mécanismes de SIPS. Cependant, il semblerait que le fait d'invalider l'expression de PrP^c augmente l'active β -galactosidase associée à la sénescence, de l'abondance relative de l'ARNm de p16 et p21^{WAF-1} même en absence de CuSO_4 . PrP^c jouerait peut être un rôle protecteur de manière générale vis-à-vis du stress oxydatif et des dommages à l'ADN.

4.2.2.3. Effet de l'invalidation de PrP^c sur l'abondance relative de l'ARNm de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif

Nous avons vu précédemment que PrP^c semblait jouer un rôle lors d'un stress oxydatif. Il est donc intéressant de voir ce qui se passe au niveau des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif lorsque PrP^c est invalidé. Pour ce faire, l'ARN total des fibroblastes WI-38 ayant subis ou non la transfection durant 24 h, puis incubés ou non avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h a été extrait. Cet ARN a ensuite été rétrotranscrit en ADNc puis analysé par qRT-PCR afin d'évaluer l'abondance relative de l'ARNm des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif. L'abondance relative de l'ARNm de HO-1, Nrf2 et NQO1 a été évaluée à 0 h après l'arrêt de la transfection (**Figure 19**).

Les résultats révèlent une augmentation de l'abondance relative de l'ARNm de HO-1 dans les cellules non transfectées mais incubées avec 500 μM de CuSO_4 . Après la transfection, on observe une augmentation de l'abondance relative de l'ARNm de HO-1 dans les cellules incubées avec 500 μM de CuSO_4 , par rapport aux cellules non transfectées et non incubées avec le CuSO_4 . Toutefois, l'abondance relative de l'ARNm de HO-1 augmente plus lors de l'invalidation de PrP^c que dans les cellules transfectées avec le siRNA « NTS ». Quant à l'abondance relative de l'ARNm de Nrf2 et NQO1, aucune modification n'a été observée (résultats non montrés).

4.2.2.4. Effet de l'invalidation de PrP^c sur l'abondance relative de l'ARNm des gènes impliqués dans l'arrêt de prolifération dû aux dommages à l'ADN

Un des rôles joué par PrP^c dans les neurones serait la protection contre les dommages oxydants [74]. On sait qu'un stress oxydatif peut occasionner des dommages à l'ADN. Il est donc intéressant de voir ce qui se passe au niveau des gènes impliqués dans l'arrêt de prolifération dû aux dommages à l'ADN lorsque PrP^c est invalidé. Pour ce faire, l'ARN total des fibroblastes WI-38 transfectés ou non avec les siRNAs durant 24 h, puis incubés ou non avec 500 μM de CuSO_4 pendant 16 h a été extrait à 0 h après l'arrêt de l'incubation avec le CuSO_4 . L'ARN a été ensuite rétrotranscrit en ADNc puis analysé par qRT-PCR afin d'évaluer l'abondance relative de l'ARNm de certains gènes impliqués dans l'arrêt de prolifération occasionné par les dommages à l'ADN, à savoir GADD153 et GADD45A.

Les résultats à 0 h (**Figure 20**) révèlent une augmentation de l'abondance relative de l'ARNm de GADD45A et GADD153 après le traitement avec le siRNA invalidant l'expression de PrP^c dans les fibroblastes incubés avec 500 μM de CuSO_4 (une augmentation d'environ 7 fois pour GADD45A et 2 fois pour GADD153). Une augmentation est également observable dans les

conditions transfectées avec le siRNA NTS, mais cette augmentation est beaucoup plus faible et est de l'ordre de ce qu'on observe dans les cellules non transfectées et incubées avec 500 μM de CuSO_4 . Ici, l'abondance relative de l'ARNm de GADD45A et GADD153 ne semble pas être modifiée dans les cellules transfectées avec le siRNA invalidant l'expression de PrP^c et non incubées avec du CuSO_4 .

Il est difficile d'avoir un avis tranché sur la question du rôle de PrP^c vis-à-vis du stress oxydatif et des dommages à l'ADN étant donné que nous ne pouvons nous baser que sur des résultats préliminaires. Nous avons vu que l'invalidation de PrP^c associée à une incubation de 16 h avec 500 μM de CuSO_4 génère plus de stress oxydatif et probablement plus de dommages à l'ADN et donc induit plus l'expression des gènes GADD.

V. Bibliographie

- [1] R. D. Semba, E. J. Nicklett, et L. Ferrucci, "Does Accumulation of Advanced Glycation End Products Contribute to the Aging Phenotype?," *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, vol. 65, n° 9, p. 963-975, 2010.
- [2] L. HAYFLICK et P. S. MOORHEAD, "The serial cultivation of human diploid cell strains," *Experimental Cell Research*, vol. 25, p. 585-621, Déc. 1961.
- [3] E. L. Schneider et Y. Mitsui, "The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 73, n° 10, p. 3584-3588, Oct. 1976.
- [4] V. J. Cristofalo, R. G. Allen, R. J. Pignolo, B. G. Martin, et J. C. Beck, "Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: A reevaluation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, n° 18, p. 10614-10619, Sep. 1998.
- [5] K. Bayreuther, H. P. Rodemann, R. Hommel, K. Dittmann, M. Albiez, et P. I. Francz, "Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 85, n° 14, p. 5112-5116, Juil. 1988.
- [6] O. Toussaint, E. E. Medrano, et T. von Zglinicki, "Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes," *Experimental Gerontology*, vol. 35, n° 8, p. 927-945, Oct. 2000.
- [7] G. P. Dimri et al., "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, n° 20, p. 9363-9367, Sep. 1995.
- [8] O. Toussaint, V. Royer, M. Salmon, et J. Remacle, "Stress-induced premature senescence and tissue ageing," *Biochemical Pharmacology*, vol. 64, n° 5, p. 1007-1009, Sep. 2002.
- [9] I. P. Trougakos, A. Saridaki, G. Panayotou, et E. S. Gonos, "Identification of differentially expressed proteins in senescent human embryonic fibroblasts," *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 127, n° 1, p. 88-92, Jan. 2006.
- [10] M. Corral-Debrinski, T. Horton, M. T. Lott, J. M. Shoffner, M. F. Beal, et D. C. Wallace, "Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age," *Nature Genetics*, vol. 2, n° 4, p. 324-329, Déc. 1992.
- [11] P. Dumont et al., "Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 28, n° 3, p. 361-373, Fév. 2000.
- [12] O. Bischof, A. Dejean, et P. Pineau, "[A review of cellular senescence: friend or foe of tumorigenesis?]," *Médecine Sciences: M/S*, vol. 25, n° 2, p. 153-160, Fév. 2009.
- [13] D. J. Kurz, S. Decary, Y. Hong, et J. D. Erusalimsky, "Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells," *Journal of Cell Science*, vol. 113, p. 3613-3622, Oct. 2000.
- [14] A. Chrétien et al., "Role of TGF-beta1-independent changes in protein neosynthesis, p38alphaMAPK, and cdc42 in hydrogen peroxide-induced senescence-like morphogenesis," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 44, n° 9, p. 1732-1751, Mai. 2008.
- [15] P. Dumont et al., "Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal

- oxidative stresses in normal human fibroblast,” *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 28, n° 3, p. 361-373, Fév. 2000.
- [16] F. Debacq-Chainiaux et al., “Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway,” *Journal of Cell Science*, vol. 118, n° 4, p. 743-758, Fév. 2005.
- [17] D. G. Johnson et C. L. Walker, “CYCLINS AND CELL CYCLE CHECKPOINTS,” *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 39, n° 1, p. 295-312, 1999.
- [18] Q. M. Chen, “Replicative senescence and oxidant-induced premature senescence. Beyond the control of cell cycle checkpoints,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 908, p. 111-125, Juin. 2000.
- [19] O. Toussaint et al., “From the Hayflick mosaic to the mosaics of ageing. Role of stress-induced premature senescence in human ageing,” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 34, n° 11, p. 1415-1429, Nov. 2002.
- [20] S. Petersen, G. Saretzki, et T. V. Zglinicki, “Preferential Accumulation of Single-Stranded Regions in Telomeres of Human Fibroblasts,” *Experimental Cell Research*, vol. 239, n° 1, p. 152-160, Fév. 1998.
- [21] M. Collado, M. A. Blasco, et M. Serrano, “Cellular senescence in cancer and aging,” *Cell*, vol. 130, n° 2, p. 223-233, Juil. 2007.
- [22] F. Mangialasche et al., “Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment,” *Ageing Research Reviews*, vol. 8, n° 4, p. 285-305, Oct. 2009.
- [23] J. Emerit, M. Edeas, et F. Bricaire, “Neurodegenerative diseases and oxidative stress,” *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomédecine & Pharmacothérapie*, vol. 58, n° 1, p. 39-46, Jan. 2004.
- [24] M. Gilca, I. Stoian, V. Atanasiu, et B. Virgolici, “The oxidative hypothesis of senescence,” *Journal of Postgraduate Medicine*, vol. 53, n° 3, p. 207-213, Sep. 2007.
- [25] T. Fukai, R. J. Folz, U. Landmesser, et D. G. Harrison, “Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease,” *Cardiovascular Research*, vol. 55, n° 2, p. 239-249, Aoû. 2002.
- [26] J. W. Kaspar, S. K. Niture, et A. K. Jaiswal, “Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress,” *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 47, n° 9, p. 1304-1309, Nov. 2009.
- [27] X. Gong, R. Gutala, et A. K. Jaiswal, “Quinone oxidoreductases and vitamin K metabolism,” *Vitamins and Hormones*, vol. 78, p. 85-101, 2008.
- [28] S. W. Ryter et A. M. K. Choi, “Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Metabolism to Molecular Therapy,” *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 41, n° 3, p. 251-260, Sep. 2009.
- [29] P. Rai et al., “Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, n° 1, p. 169-174, Jan. 2009.
- [30] L. Méndez-Acuña, M. V. Di Tomaso, F. Palitti, et W. Martínez-López, “Histone post-translational modifications in DNA damage response,” *Cytogenetic and Genome Research*, vol. 128, n° 1, p. 28-36, 2010.
- [31] S. Rivera-Mancía, I. Pérez-Neri, C. Ríos, L. Tristán-López, L. Rivera-Espinosa, et S. Montes, “The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases,” *Chemico-Biological Interactions*, vol. 186, n° 2, p. 184-199, Juil. 2010.
- [32] P. Zatta et al., “Accumulation of copper and other metal ions, and metallothionein I/II expression in the bovine brain as a function of aging,” *Journal of Chemical Neuroanatomy*, vol. 36, n° 1, p. 1-5, Sep. 2008.
- [33] T. Rao et K. Rao, “New evidence on iron, copper accumulation and zinc depletion and its correlation with DNA integrity in aging human brain regions,” *Indian Journal of*

- Psychiatry*, vol. 52, n° 2, p. 140, 2010.
- [34] C. Q. Scheckhuber et al., "Age-related cellular copper dynamics in the fungal ageing model *Podospora anserina* and in ageing human fibroblasts," *PloS One*, vol. 4, n° 3, p. e4919, 2009.
- [35] C. Q. Scheckhuber et H. D. Osiewacz, "Podospora anserina: a model organism to study mechanisms of healthy ageing," *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, vol. 280, n° 5, p. 365-374, Nov. 2008.
- [36] W. Rachidi, J. Riondel, H. M. McMahon, et A. Favier, "[Prion protein and copper: a mysterious relationship]," *Pathologie-Biologie*, vol. 53, n° 4, p. 244-250, Mai. 2005.
- [37] K. Balamurugan et W. Schaffner, "Copper homeostasis in eukaryotes: teetering on a tightrope," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1763, n° 7, p. 737-746, Juil. 2006.
- [38] P. Zatta et al., "Accumulation of copper and other metal ions, and metallothionein I/II expression in the bovine brain as a function of aging," *Journal of Chemical Neuroanatomy*, vol. 36, n° 1, p. 1-5, Sep. 2008.
- [39] G. J. Brewer, "Iron and copper toxicity in diseases of aging, particularly atherosclerosis and Alzheimer's disease," *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, vol. 232, n° 2, p. 323-335, Fév. 2007.
- [40] L. Banci, I. Bertini, F. Cantini, et S. Ciofi-Baffoni, "Cellular copper distribution: a mechanistic systems biology approach," *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, vol. 67, n° 15, p. 2563-2589, Aoû. 2010.
- [41] S. Lutsenko, "Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 14, n° 2, p. 211-217, Avr. 2010.
- [42] W. Cerpa, L. Varela-Nallar, A. E. Reyes, A. N. Minniti, et N. C. Inestrosa, "Is there a role for copper in neurodegenerative diseases?," *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 26, n° 4, p. 405-420, Oct. 2005.
- [43] E. Gaggelli, H. Kozlowski, D. Valensin, et G. Valensin, "Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis)," *Chemical Reviews*, vol. 106, n° 6, p. 1995-2044, Juin. 2006.
- [44] D. L. Huffman et T. V. O'Halloran, "Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 70, p. 677-701, 2001.
- [45] J. Bertinato et M. R. L'Abbé, "Maintaining copper homeostasis: regulation of copper-trafficking proteins in response to copper deficiency or overload," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 15, n° 6, p. 316-322, Juin. 2004.
- [46] C. Urani, P. Melchiorretto, F. Morazzoni, C. Canevali, et M. Camatini, "Copper and zinc uptake and hsp70 expression in HepG2 cells," *Toxicology in Vitro*, vol. 15, n° 4, p. 497-502, Aoû. .
- [47] S. Seok et al., "Specific activation of the human HSP70 promoter by copper sulfate in mosaic transgenic zebrafish," *Journal of Biotechnology*, vol. 126, n° 3, p. 406-413, Nov. 2006.
- [48] H. F. Poon, V. Calabrese, G. Scapagnini, et D. A. Butterfield, "Free radicals and brain aging," *Clinics in Geriatric Medicine*, vol. 20, n° 2, p. 329-359, Mai. 2004.
- [49] B. Halliwell et J. M. Gutteridge, "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview," *Methods in Enzymology*, vol. 186, p. 1-85, 1990.
- [50] D. R. Lloyd et D. H. Phillips, "Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) Fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links," *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 424, n° 1, p. 23-36, Mar. 1999.

- [51] D. Huster et al., "Consequences of copper accumulation in the livers of the Atp7b-/- (Wilson disease gene) knockout mice," *The American Journal of Pathology*, vol. 168, n° 2, p. 423-434, Fév. 2006.
- [52] K. M. Pan et al., "Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, n° 23, p. 10962-10966, Déc. 1993.
- [53] R. Linden, V. R. Martins, M. A. M. Prado, M. Cammarota, I. Izquierdo, et R. R. Brentani, "Physiology of the prion protein," *Physiological Reviews*, vol. 88, n° 2, p. 673-728, Avr. 2008.
- [54] C. Ryou, "Prions and prion diseases: fundamentals and mechanistic details," *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 17, n° 7, p. 1059-1070, Juil. 2007.
- [55] B. Caughey et G. S. Baron, "Prions and their partners in crime," *Nature*, vol. 443, n° 7113, p. 803-810, Oct. 2006.
- [56] S. B. Prusiner, "Prions," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, n° 23, p. 13363-13383, Nov. 1998.
- [57] R. B. Wickner, H. K. Edskes, F. Shewmaker, et T. Nakayashiki, "Prions of fungi: inherited structures and biological roles," *Nature Reviews. Microbiology*, vol. 5, n° 8, p. 611-618, Aoû. 2007.
- [58] S. B. Prusiner, "Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 216, n° 4542, p. 136-144, Avr. 1982.
- [59] S. J. DeArmond, "Discovering the mechanisms of neurodegeneration in prion diseases," *Neurochemical Research*, vol. 29, n° 11, p. 1979-1998, Nov. 2004.
- [60] K. Basler, "Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene," *Cell*, vol. 46, n° 3, p. 417-428, 1986.
- [61] E. Rivera-Milla et al., "Disparate evolution of prion protein domains and the distinct origin of Doppel- and prion-related loci revealed by fish-to-mammal comparisons," *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 20, n° 2, p. 317-319, Fév. 2006.
- [62] J. A. Wright, P. C. McHugh, M. Stockbridge, S. Lane, S. Kralovicova, et D. R. Brown, "Activation and repression of prion protein expression by key regions of intron 1," *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, vol. 66, n° 23, p. 3809-3820, Déc. 2009.
- [63] O. Nicolas, R. Gavín, et J. A. del Río, "New insights into cellular prion protein (PrPc) functions: the "ying and yang" of a relevant protein," *Brain Research Reviews*, vol. 61, n° 2, p. 170-184, Oct. 2009.
- [64] E. Kraus et U. Femfert, "Proteinase K from the mold *Tritirachium album* Limber. Specificity and mode of action," *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Für Physiologische Chemie*, vol. 357, n° 7, p. 937-947, Juil. 1976.
- [65] L. Kupfer, W. Hinrichs, et M. H. Groschup, "Prion protein misfolding," *Current Molecular Medicine*, vol. 9, n° 7, p. 826-835, Sep. 2009.
- [66] P. M. Rudd, A. H. Merry, M. R. Wormald, et R. A. Dwek, "Glycosylation and prion protein," *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 12, n° 5, p. 578-586, Oct. 2002.
- [67] S. Sutou, M. Kunishi, T. Kudo, P. Wongsrikeao, M. Miyagishi, et T. Otoi, "Knockdown of the bovine prion gene PRNP by RNA interference (RNAi) technology," *BMC Biotechnology*, vol. 7, p. 44-44.
- [68] E. Morel et al., "The cellular prion protein PrP(c) is involved in the proliferation of epithelial cells and in the distribution of junction-associated proteins," *PloS One*, vol. 3, n° 8, p. e3000, 2008.
- [69] Y. Gu, J. Hinnerwisch, R. Fredricks, S. Kalepu, R. S. Mishra, et N. Singh, "Identification of cryptic nuclear localization signals in the prion protein," *Neurobiology of Disease*, vol. 12, n° 2, p. 133-149, Mar. 2003.

- [70] L. Westergard, H. M. Christensen, et D. A. Harris, "The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1772, n°. 6, p. 629-644, Juin. 2007.
- [71] Y. J. Lee et I. V. Baskakov, "Treatment with normal prion protein delays differentiation and helps to maintain high proliferation activity in human embryonic stem cells," *Journal of Neurochemistry*, 2010.
- [72] G. Schmitt-Ulms et al., "Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein," *Journal of Molecular Biology*, vol. 314, n°. 5, p. 1209-1225, Déc. 2001.
- [73] S. Petrakis et T. Sklaviadis, "Identification of proteins with high affinity for refolded and native PrPC," *Proteomics*, vol. 6, n°. 24, p. 6476-6484, Déc. 2006.
- [74] B. Halliwell, "Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?," *Journal of Neurochemistry*, vol. 97, n°. 6, p. 1634-1658, Juin. 2006.
- [75] N. T. Watt, M. N. Routledge, C. P. Wild, et N. M. Hooper, "Cellular prion protein protects against reactive-oxygen-species-induced DNA damage," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 43, n°. 6, p. 959-967, Sep. 2007.
- [76] S. A. Priola et K. L. McNally, "The role of the prion protein membrane anchor in prion infection," *Prion*, vol. 3, n°. 3, p. 134-138, Juil. 2009.
- [77] V. Campana, D. Sarnataro, et C. Zurzolo, "The highways and byways of prion protein trafficking," *Trends in Cell Biology*, vol. 15, n°. 2, p. 102-111, Fév. 2005.
- [78] S. Supattapone, K. Nishina, et J. R. Rees, "Pharmacological approaches to prion research," *Biochemical Pharmacology*, vol. 63, n°. 8, p. 1383-1388, Avr. 2002.
- [79] F. Béranger, A. Mangé, B. Goud, et S. Lehmann, "Stimulation of PrPC Retrograde Transport toward the Endoplasmic Reticulum Increases Accumulation of PrPSc in Prion-infected Cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, n°. 41, p. 38972 - 38977, Oct. 2002.
- [80] Z. Marijanovic, A. Caputo, V. Campana, et C. Zurzolo, "Identification of an intracellular site of prion conversion," *PLoS Pathogens*, vol. 5, n°. 5, p. e1000426, Mai. 2009.
- [81] D. R. Brown et al., "The cellular prion protein binds copper in vivo," *Nature*, vol. 390, n°. 6661, p. 684-687, Déc. 1997.
- [82] P. C. Pauly et D. A. Harris, "Copper stimulates endocytosis of the prion protein," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, n°. 50, p. 33107-33110, Déc. 1998.
- [83] K. Qin, L. Zhao, R. D. Ash, W. F. McDonough, et R. Y. Zhao, "ATM-mediated transcriptional elevation of prion in response to copper-induced oxidative stress," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, n°. 7, p. 4582-4593, Fév. 2009.
- [84] C. J. Choi, A. Kanthasamy, V. Anantharam, et A. G. Kanthasamy, "Interaction of metals with prion protein: possible role of divalent cations in the pathogenesis of prion diseases," *Neurotoxicology*, vol. 27, n°. 5, p. 777-787, Sep. 2006.
- [85] L. Varela-Nallar, E. M. Toledo, M. A. Chacón, et N. C. Inestrosa, "The functional links between prion protein and copper," *Biological Research*, vol. 39, n°. 1, p. 39-44, 2006.
- [86] R. Chiesa et al., "Primary myopathy and accumulation of PrPSc-like molecules in peripheral tissues of transgenic mice expressing a prion protein insertional mutation," *Neurobiology of Disease*, vol. 8, n°. 2, p. 279-288, Avr. 2001.
- [87] A. X. Goh, C. Li, M. Sy, et B. Wong, "Altered prion protein glycosylation in the aging mouse brain," *Journal of Neurochemistry*, vol. 100, n°. 3, p. 841-854, Fév. 2007.
- [88] Y. Yoshioka, N. Ishiguro, et Y. Inoshima, "Proteasome Activity and Biological Properties of Normal Prion Protein: A Comparison between Young and Aged Cattle," *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, Aoû. 2010.

- [89] W. M. Williams, E. R. Stadtman, et J. Moskovitz, "Ageing and exposure to oxidative stress in vivo differentially affect cellular levels of PrP in mouse cerebral microvessels and brain parenchyma," *Neuropathology and Applied Neurobiology*, vol. 30, n°. 2, p. 161-168, Avr. 2004.
- [90] P. K. Smith et al., "Measurement of protein using bicinchoninic acid," *Analytical Biochemistry*, vol. 150, n°. 1, p. 76-85, Oct. 1985.
- [91] L. Zeng, E. W. Miller, C. J. Chang, A. Pralle, et E. Y. Isacoff, "A Selective Turn-On Fluorescent Sensor for Imaging Copper in Living Cells," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, n°. 1, p. 10-11, Jan. 2006.
- [92] D. D. Gougoumas, I. S. Vizirianakis, I. N. Triviai, et A. S. Tsiftoglou, "Activation of Prn-p gene and stable transfection of Prn-p cDNA in leukemia MEL and neuroblastoma N2a cells increased production of PrP(C) but not prevented DNA fragmentation initiated by serum deprivation," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 211, n°. 2, p. 551-559, Mai. 2007.
- [93] M. Murata, P. Gong, K. Suzuki, et S. Koizumi, "Differential metal response and regulation of human heavy metal-inducible genes," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 180, n°. 1, p. 105-113, Juil. 1999.
- [94] M. O. Song et J. H. Freedman, "Expression of copper-responsive genes in HepG2 cells," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 279, n°. 1, p. 141-147, Nov. 2005.
- [95] L. Varela-Nallar, E. M. Toledo, L. F. Larrondo, A. L. B. Cabral, V. R. Martins, et N. C. Inestrosa, "Induction of cellular prion protein gene expression by copper in neurons," *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, vol. 290, n°. 1, p. C271-281, Jan. 2006.
- [96] L. Matos et H. Almeida, "Iron-Citrate Can Induce Cell Senescent Phenotype in Human Fibroblasts in Vitro," *Microscopy and Microanalysis*, vol. 15, n°. 3, p. 15-16, 2009.
- [97] "Effect of copper on extracellular levels of key pro-inflammatory molecules in hypothalamic GN11 and primary neurons." [Online]. Available: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=21819647>. [Accessed: 13-Déc-2010].
- [98] F. Haber et J. Weiss, "The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts," *Proceedings of the Royal Society of London. Series A - Mathematical and Physical Sciences*, vol. 147, n°. 861, p. 332-351, Nov. 1934.
- [99] S. Zdanov, J. Remacle, et O. Toussaint, "Establishment of H₂O₂-induced premature senescence in human fibroblasts concomitant with increased cellular production of H₂O₂," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1067, p. 210-216, Mai. 2006.
- [100] O. I. Aruoma, B. Halliwell, E. Gajewski, et M. Dizdaroglu, "Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide.," *Biochemical Journal*, vol. 273, n°. 3, p. 601-604, Fév. 1991.
- [101] D. Lee, T. R. O'Connor, et G. P. Pfeifer, "Oxidative DNA damage induced by copper and hydrogen peroxide promotes CG→TT tandem mutations at methylated CpG dinucleotides in nucleotide excision repair-deficient cells," *Nucleic Acids Research*, vol. 30, n°. 16, p. 3566-3573, 2002.
- [102] E. M. Sigurdsson et al., "Copper Chelation Delays the Onset of Prion Disease," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n°. 47, p. 46199-46202, Nov. 2003.
- [103] V. A. Lawson, S. J. Collins, C. L. Masters, et A. F. Hill, "Prion protein glycosylation," *Journal of Neurochemistry*, vol. 93, n°. 4, p. 793-801, 2005.
- [104] "Prion Protein Glycosylation Is Not Required for Strain-Specific Neurotropism." [Online]. Available: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=21491631>. [Accessed: 13-Déc-2010].