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

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude de la variation de l'expression génétique sur des fibroblastes au cours de leur vieillissement in vitro

Hamels, Sandrine

Award date:
1994

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

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

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

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

Download date: 30. Jun. 2025

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

ETUDE DE LA VARIATION DE L'EXPRESSION GENETIQUE SUR DES FIBROBLASTES AU COURS DE LEUR VIEILLISSEMENT *IN VITRO*

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

Décembre 94

FACULTES
UNIVERSITAIRES
N.-D. DE LA PAIX
NAMUR

Bibliothèque

FM
B4/1994/18

FM B4/1994/18

301194

Promoteur :J. REMACLE

ETUDE DE LA VARIATION DE L'EXPRESSION GENETIQUE SUR DES FIBROBLASTES AU COURS DE LEUR VIEILLISSEMENT *IN VITRO*

HAMELS Sandrine
Décembre 1994

UBS 6653928
303052

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/72.44.20

Etude de la variation de l'expression génétique sur des fibroblastes au cours de leur vieillissement *in vitro*

HAMELS Sandrine

Résumé

Des travaux antérieurs ont découvert des différences dans la nature et les quantités relatives de protéines synthétisées ou d'ARNm transcrits dans les fibroblastes jeunes très prolifératifs contenant une majorité de morphotypes II ou dans les fibroblastes âgés peu prolifératifs contenant une forte proportion de morphotypes III, IV, V et VI.

Notre travail permettra de mieux caractériser le vieillissement *in vitro* des fibroblastes en mettant en évidence les ARNm propres à chaque morphotype. Nous avons extrait les ARNm propres à certains morphotypes et nous avons décrit comment on peut les purifier par hybridation soustractive utilisant des billes oligotex. Sur ces billes a été synthétisé de l'ADNc à partir des ARNm de la population "driver". Ces ADNc ont été hybridés aux ARNm qui leur sont communs, dans la population "cible", dont on désire retirer les ARNm différents. Trois essais d'hybridation soustractive nous ont permis de retirer des informations fort utiles quant à la continuation de ce travail.

Grâce à ces mises au point, ce travail permettra à court terme de purifier les ARNm propres à chacun des morphotypes du vieillissement *in vitro* des fibroblastes.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Décembre 1994
Promoteur : J. Remacle
Co-promoteur : O. Toussaint

Mes plus vifs remerciements s'adressent à Monsieur le Professeur J. Remacle pour m'avoir accueillie chaleureusement dans son laboratoire et pour m'avoir conseillée tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier Martine Raes pour avoir obtenu des fibroblastes, aux plus jeunes passages en culture possible sur le marché, ainsi que pour son dynamisme.

Ma profonde gratitude va également à Olivier Toussaint et à Long Le qui ont consacré beaucoup de leur précieux temps à me guider tout au long de ce travail, et à me faire partager leurs connaissances et leur goût de la recherche (...ainsi que le jus de pomme fait maison).

Je tiens également à remercier le laboratoire d'immunologie, et plus particulièrement Karl Walravens pour les cellules Véro, ses explications et sa patience.

Un grand merci aussi à Andrée pour son aide lors des cultures cellulaires périlleuses et des extractions d'ARN nombreuses, ainsi que pour sa compétence et sa gentillesse.

Je tiens aussi à remercier François, Patsy et Barbara pour leur aide "cellulaire".

Je remercie Marc pour ses dons en informatique et surtout pour sa bonne humeur.

Enfin, je ne peux oublier la gentillesse et l'humour de tous les membres de l'Unité de Biochimie Cellulaire ainsi que l'ambiance de travail stimulante qu'ils y font régner.

Sans oublier de remercier mes parents qui m'ont permis d'entreprendre ces études et qui m'ont encouragée tout au long de celles-ci, et plus particulièrement durant les moments difficiles.

Table des matières

I. Introduction. 1

1. Le vieillissement cellulaire : 1

2. Les théories du vieillissement : 3
   2.1. Théories génétiques : 3
      2.1.1. Théories génétiques et déterministes : 3
      2.1.2. Théories génétiques et stochastiques : 4
   2.2. Théories environnementales du vieillissement cellulaire: 6
      2.2.1. Hypothèse de l'erreur catastrophique : 6
      2.2.2. Théorie généralisée de l'erreur catastrophique : 6

3. Le seuil critique d'accumulation d'erreurs : 8

4. Thermodynamique des systèmes ouverts : 10
   4.1. La cellule vue comme un système ouvert : 10
   4.2. Implication de la thermodynamique pour expliquer le vieillissement cellulaire (Toussaint, O., et al., 1991) : 11
   4.3. Effets des stress subis par les cellules (Toussaint, O., et al., 1991) : 12
   4.4. Rôle de l'énergie : 13

5. Application du modèle théorique au vieillissement in vitro des fibroblastes : 15
   5.1 Vieillissement normal : 15
      5.1.1. Caractéristiques morphologiques : 15
      5.1.2. Caractéristiques biochimiques : 16
   5.2. Vieillissement accéléré sous l'effet des stress : 17
      5.2.1. Caractéristiques morphologiques : 17
      5.2.2. Caractéristiques biochimiques : 17
   5.3. Conclusion : 18

6. Expression génétique et vieillissement : 19
   6.1. Expression génétique différentielle entre les cellules jeunes et vieilles : 19

7. Techniques permettant de différencier deux populations de cellules : 21
7.1. Hybridation soustractive : 21
7.1.1. Hybridation soustractive utilisant des billes de latex 21
(Figure I.6.): 21
7.1.2. Hybridation soustractive utilisant une immobilisation d'ARNm sur une membrane de nitrocellulose : 22
7.1.3. Hybridation soustractive utilisant le système biotine-streptavidine:23
7.1.4. Hybridation soustractive à l'aide des vecteurs pSPORT 1 et pSPORT 2 (figure I.8.) : 23
7.1.5. Technique d'hybridation soustractive utlisant la PCR 24
(figure I.9.) : 24
7.2. Autres techniques permettant de différencier deux populations de cellules : 25
7.2.1. Synthèse de sondes spécifiques à l'aide de liaisons chimiques (CCLS : chemical cross-linking substraction): 25
7.2.2. Technique de différenciation utilisant une PCR avec des primers arbitraires (RAPD = Random Amplified Polymorphic DNA)..... 26

II. Objectifs. 27

III. Matériels et méthodes. 29

A. Techniques cellulaires

1. Cultures de cellules : 29
1.1. Origine des fibroblastes : 29
1.2. Milieux de culture : 29
1.3. Repiquage des fibroblastes pulmonaires : 30
1.4. Congélation et décongélation des cellules : 31
A. Congélation : 31
B. Décongélation
1.5. Obtention des cellules post-mitotiques par culture des cellules vieilles: 31
1.6. Détermination des types morphologiques (morphotypes) : 32

2. Dosage des protéines : 32
2.1. Réactifs utilisés : 32
2.2. Mode opératoire : 33

3. Estimation de l'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN : 33
3.1. Réactifs utilisés : 33
3.2. Culture de cellules : 34
3.3. Dosage de l'incorporation de thymidine tritiée par la méthode "in situ" modifiée (Klagsbrun, M. et al., 1977) : 34

4. Culture de cellules Véro et infection par le virus respiratoire syncytial bovin (BRSV):34
4.1. Cultures de cellules Véro : 34
4.1.1. Réactifs utilisés : 35
4.1.2. Mode opératoire: 35
4.2. Infection des cellules Véro par BRSV : 36
4.2.1. Réactifs utilisés : 36
4.2.2. Mode opératoire : 36

B. Techniques de biologie moléculaire 37

1. Extraction d'ARN total : 37
1.1. Réactifs utilisés : 37
1.2. Mode opératoire : 38
1.2.1. Rinçage des cellules : 38
1.2.2. Homogénéisation des cellules : 39
1.2.3. Phase de séparation : 39
1.2.4. Précipitation de l'ARN : 39
1.2.5. Lavage de l'ARN : 40
1.2.6. Dissolution de l'ARN : 40
1.2.7. Estimation de la quantité d'ARN : 40
1.2.8. Estimation de la qualité de l'ARN sur gel d'agarose : 41

2. Extraction d'ARNm : 41
2.1. Réactifs utilisés : 42
2.2. Mode opératoire : 42
2.2.1. Hybridation de l'oligonucléotide polyT biotinylé : 42
2.2.2. Lavage des particules paramagnétiques fixées à la streptavidine (SA-PMPs) : 43
2.2.3. Capture et lavage des hybrides oligodT -ARNm : 43

3. Analyse d'amorces (primers) : 44

4. Réactions de restriction : 44
4.1. Réactifs utilisés : 45
4.2.Mode opératoire : 45

5. Purification d'un fragment d'ADN à partir d'un gel d'agarose : 45
5.1. Réactifs utilisés : 46
5.2. Mode opératoire : 46

6. Transcription inverse suivie d'une amplification par PCR (RT-PCR): 47
6.1. Transcription inverse : 47
6.1.1. Réactifs utilisés : 47
6.1.2. Mode opératoire : 48
6.2. Amplification des fragments d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) : 51
Réactifs utilisés et mode opératoire : 51
6.3. Electrophorèse sur gel d'agarose : 53
6.3.1. Réactifs utilisés : 53
6.3.2. Mode opératoire : 53

7. Précipitation de faibles quantités d'ARNm à l'éthanol : 54
7.1. Réactifs utilisés : 54
7.2. Mode opératoire : 54

8. Hybridation soustractive : 55
8.1. Réactifs utilisés : 55
8.2. Mode opératoire (Hara, E., et al., 1991 56
8.2.1. Synthèse de l'ADNc sur les oligo(dT)30 : 56
8.2.2. Hybridation soustractive : 57

IV. Résultats et discussion.....59

I. Sélection des populations fibroblastiques, plus ou moins âgées, en vue d'une hybridation soustractive de leur ARNm :..... 59

1. Choix du type cellulaire :..... 59

2. Détermination des proportions des divers types morphologiques en fonction des passages en culture :..... 60

2.1. Fibroblastes AG04432 :..... 60

2.2. Comparaison avec les fibroblastes HH-8 et WI-38 (figure IV.4.a,b) :..... 61

3. Sélection des passages en culture en vue d'obtenir des proportions de morphotypes permettant de réaliser la soustraction d'ARNm :..... 62

4. Détermination du milieu de culture pour rendre les cellules quiescentes :..... 63

5. Critères d'obtention des quantités suffisantes d'ARNm en fonction des proportions des morphotypes :..... 64

II. Mise au point de la technique d'hybridation soustractive sur support solide sur des cellules en culture :..... 66

1. Extraction d'ARN total et d'ARNm des cellules Véro infectées ou non par le virus BRSV :..... 66

2. Caractérisation des primers utilisés :..... 66

2.1. Amplification du fragment du gène d'actine :..... 66

2.2. Amplification du fragment du gène F :..... 67

2.3. Amplification simultanée des fragments des gènes F et d'actine :..... 68

3. Identification des fragments des gènes d'actine et F amplifiés:..... 68

3.1. Restriction du fragment du gène d'actine :..... 68

3.2. Restriction du fragment du gène F :..... 69

4. Etude du comportement des billes oligotex-dT :..... 70

4.1. Synthèse d'ADNc sur billes :..... 70

4.2. Saturation des billes :..... 71

4.3. PCR à partir de l'ADNc synthétisé sur billes oligotex : 72
4.3.1. Comparaison des résultats obtenus en RT en présence d'un excès de transcriptase inverse et en présence de BSA : 72
4.3.2. Comparaison de la transcription inverse sur billes ou en solution : 72
4.4. Etude de la résistance des complexes ADNc-billes oligotex : 73

5. Hybridation soustractive : 73
5.1. Premier essai d'hybridation soustractive : 73
5.2. Deuxième essai d'hybridation soustractive : 76
5.3. Troisième essai d'hybridation soustractive : 77

V. Conclusions. 79

VI. Bibliographie. 83

Abréviations biochimiques :

ADN	: acide déoxyribonucléique
ADNc	: acide déoxyribonucléique complémentaire
AMV	: avian myeloblastosis virus
AMV-RT	: avian myeloblastosis virus -reverse transcriptase
ARN	: acide ribonucléique
ARNm	: acide ribonucléique messager
ARNt	: acide ribonucléique de transfert
ATP	: adénosine triphosphate
BRSV	: virus respiratoire syncitial bovin
BSA	: bovine serum albumin
CCLS	: cross-linking liaison
CPD	: cumulative population doubling
DEPC	: diéthylpyrocarbonate
DMEM	: Dulbeco's modified Eagle Medium
DMSO	: diméthylsulfoxyde
dNTP	: déoxyribonucléotides
DZQ	: 2,5 diaziridinyl 1-4 benzoquinone 1
EDTA	: acide éthylènediaminetétracétique
EPC-1	: early passage cells 1
EPC-2	: early passage cells 2
ESB	: electrophoresis sample buffer
HEPES	: 4-(2-Hydroxyethyl-)-1-piperazineethanesulfonic acid
HLA	: solution d'hydrolysat de lactalbumine
HSP 70	: heat shock protein 70
kDa	: kilo-dalton
LPC-1	: late passage cells 1
LPC-14	: late passage cells 14

LPC-24 : late passage 24

M : milieu de rinçage

MF I à III : fibroblastes mitotiques de types I à III

MOPS : acide 3-(morpholino)-propanesulfonique

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

Oligotex(dt)30 : particules de latex en polystyrène auxquelles sont liées de façon covalente une séquence de 30 thymidines (polyT)

OPT : OPTI-MEM

P = P(s) : production d'entropie

PBS : phosphate buffer saline

PCR : polymerase chain reaction

PM : poids moléculaire

PMF IV à VII : fibroblastes post-mitotiques de types IV à VII

P° : valeur minimale de production d'entropie

RNase : ribonucléase

RNase H : ribonucléase H

RT : reverse transcription

RT-PCR : reverse trancriptase-polymerase chain reaction

S : entropie

SA-PMPs : particules de streptavidine paramagnétiques

SAG : senescence-associated gene

SDS : dodécyl sulfate de sodium

SMP30 : senescence marker protein 30

TCA : acide trichloracétique

TE : tampon tris-EDTA

THBP : tert-butylhydroperoxyde

TMK : tampon tris-$MgCl_2$-KCl

TNF-alpha : tumor necrosis factor-alpha

U.V. : ultra-violet

^{32}P : phosphore ^{32}

Abréviations biochimiques :

ADN	: acide déoxyribonucléique
ADNc	: acide déoxyribonucléique complémentaire
AMV	: avian myeloblastosis virus
AMV-RT	: avian myeloblastosis virus -reverse transcriptase
ARN	: acide ribonucléique
ARNm	: acide ribonucléique messager
ARNt	: acide ribonucléique de transfert
ATP	: adénosine triphosphate
BRSV	: virus respiratoire syncitial bovin
BSA	: bovine serum albumin
CCLS	: cross-linking liaison
CPD	: cumulative population doubling
DEPC	: diéthylpyrocarbonate
DMEM	: Dulbeco's modified Eagle Medium
DMSO	: diméthylsulfoxyde
dNTP	: déoxyribonucléotides
DZQ	: 2,5 diaziridinyl 1-4 benzoquinone 1
EDTA	: acide éthylènediaminetétracétique
EPC-1	: early passage cells 1
EPC-2	: early passage cells 2
ESB	: electrophoresis sample buffer
HEPES	: 4-(2-Hydroxyethyl-)-1-piperazineethanesulfonic acid
HLA	: solution d'hydrolysat de lactalbumine
HSP 70	: heat shock protein 70
kDa	: kilo-dalton
LPC-1	: late passage cells 1
LPC-14	: late passage cells 14

LPC-24 : late passage 24

M : milieu de rinçage

MF I à III : fibroblastes mitotiques de types I à III

MOPS : acide 3-(morpholino)-propanesulfonique

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

Oligotex(dt)30 : particules de latex en polystyrène auxquelles sont liées de façon covalente une séquence de 30 thymidines (polyT)

OPT : OPTI-MEM

P = P(s) : production d'entropie

PBS : phosphate buffer saline

PCR : polymerase chain reaction

PM : poids moléculaire

PMF IV à VII : fibroblastes post-mitotiques de types IV à VII

P^{o} : valeur minimale de production d'entropie

RNase : ribonucléase

RNase H : ribonucléase H

RT : reverse transcription

RT-PCR : reverse trancriptase-polymerase chain reaction

S : entropie

SA-PMPs : particules de streptavidine paramagnétiques

SAG : senescence-associated gene

SDS : dodécyl sulfate de sodium

SMP30 : senescence marker protein 30

TCA : acide trichloracétique

TE : tampon tris-EDTA

THBP : tert-butylhydroperoxyde

TMK : tampon tris-$MgCl_2$-KCl

TNF-alpha : tumor necrosis factor-alpha

U.V. : ultra-violet

^{32}P : phosphore 32

I. Introduction

1. Le vieillissement cellulaire :

Les premières études gérontologiques ont décrit des changements plus ou moins dégénératifs qui caractérisent le vieillissement d'un individu. Ces études ont montré que des processus relativement constants de détérioration de toutes les fonctions physiologiques apparaissent en fonction de l'âge et sont associés à une vulnérabilité croissante aux stress de toute nature, aux maladies, aux blessures et aux accidents.

Depuis le milieu des années soixante, la gérontologie est grossièrement scindée en deux groupes, l'école du vieillissement dit intégratif et celle du vieillissement cellulaire. Pour la première école, le vieillissement de l'organisme est essentiellement une conséquence de la modification des organes et des mécanismes intégratifs au cours du temps, en d'autres mots, le cerveau, les glandes endocrines et les tissus responsables de l'immunité. Les défenseurs de cette école argumentent que le vieillissement des cellules des tissus périphériques, contrôlés par le système neuro-endocrino-immun, n'est qu'une conséquence des changements opérés dans ce système (Fabris, N., 1991; Goya, R.G., 1991). Les partisants du vieillissement cellulaire se défendent aisément en remarquant que, si il y a des changements dans les systèmes intégratifs, ces modifications trouvent leur origine dans des mécanismes cellulaires, d'où l'intérêt de l'étude du vieillissement cellulaire (Cutler, R.G., 1991a).

La compréhension du vieillissement cellulaire est compliquée du fait qu'elle doit incorporer beaucoup d'investigations à divers niveaux fonctionnels et structuraux de la cellule. Une raison de cette complexité est aussi que le vieillissement est un phénomène général affectant toutes les fonctions de tout type de cellule, qu'il se divise rapidement, lentement ou même pas du tout (Toussaint, O. et Remacle, J., 1994a).

On sait de manière très générale que tout type cellulaire subit les conséquences du temps qui passe, chacun à sa manière selon sa position, sa structure, son degré d'utilisation,... L'universalité de ce mécanisme fait penser qu'il doit exister, sinon des mécanismes, au moins des facteurs communs au vieillissement de tous les types cellulaires. La recherche de ces facteurs a été permise par le développement de modèles de vieillissement cellulaire *in vitro*. En cultivant les cellules dans un milieu de composition connue et dans des conditions

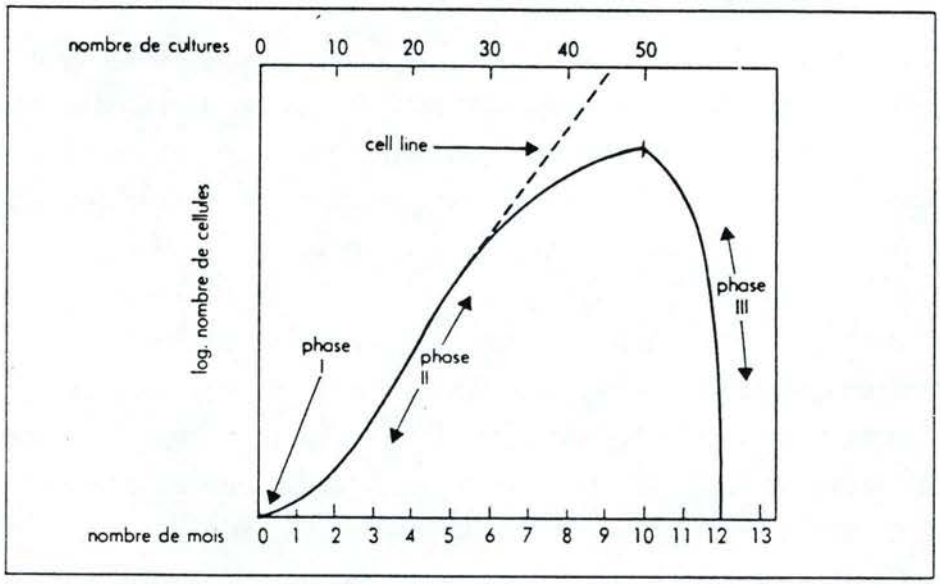


Figure I.1. Représentation schématique en trois phases de l'évolution d'une culture au cours des subcultures successives. La phase I représente la mise en culture de l'explant. La phase II est caractérisée par une croissance exponentielle du nombre de cellules nécessitant de nombreux repiquages. La phase III, finale, montre un ralentissement de plus en plus marqué du rythme des mitoses, qui finissent par stopper totalement avant que les cellules ne dégénèrent et meurent. Pour des cellules venant de certaines espèces, les cellules peuvent donner des lignées à potentiel prolifératif infini : "cell line" sur la figure (à partir de Hayflick, L., 1977).

environnementales standardisées, on élimine les variations dues à l'environnement et l'on peut ainsi mettre en évidence les mécanismes propres au vieillissement des cellules (Hayflick, L., 1977).

En 1961, Hayflick et Moorhead publiaient "The serial cultivation of human diploid cell strains", article majeur qui décrivait la mise en culture de fibroblastes humains provenant de poumons foetaux. Les résultats majeurs qui en émergeaient étaient premièrement, l'apparence normale des cellules (morphologie, caryotype diploïde), deuxièmement une croissance limitée de la culture, et enfin, la division de l'évolution de la culture en trois phases. La phase I représente la mise en culture de l'explant après digestion enzymatique partielle des échantillons. La phase II est caractérisée par une croissance rapide entre chaque repiquage. La phase III, finale, montre un ralentissement de plus en plus marqué du rythme des mitoses, qui finissent par stopper totalement avant que les cellules ne dégénèrent et meurent (Hayflick, L. et Moorehead, P.S., 1961) (Figure I.1., d'après Hayflick, L., 1977). Lors de ces différentes phases, de multiples modifications morphologiques et biochimiques apparaissent progressivement (Hayflick, L., 1977) .

Plus récemment, Bayreuther et ses collaborateurs ont montré que les fibroblastes ainsi cultivés passaient progressivement d'un type de morphologie à un autre et que ce passage se faisait toujours suivant un ordre bien précis. Ils ont identifié trois types fibroblastiques mitotiques appellés MF I, II et III, avec MF pour "Mitotic Fibroblasts", et quatre types fibroblastiques post-mitotiques PMF IV, V, VI et VII, avec PMF pour "Post-Mitotic Fibroblasts". Le dernier stade (PMF VII) représente la cellule en stade VI dans sa phase de dégénérescence (Bayreuther, K. *et al.*, 1988) (Figure I.2. d'après Bayreuther, K., *et al.*, 1988).

De nombreuses théories explicatives ont vu le jour au cours des trente dernières années suite à l'accumulation de toutes ces données concernant la durée de vie limitée et constante des cellules normales en culture (pour une revue : Hayflick, L., 1985; Toussaint, O. et Remacle, J., 1994). Voyons à présent les théories classiques du vieillissement cellulaire.

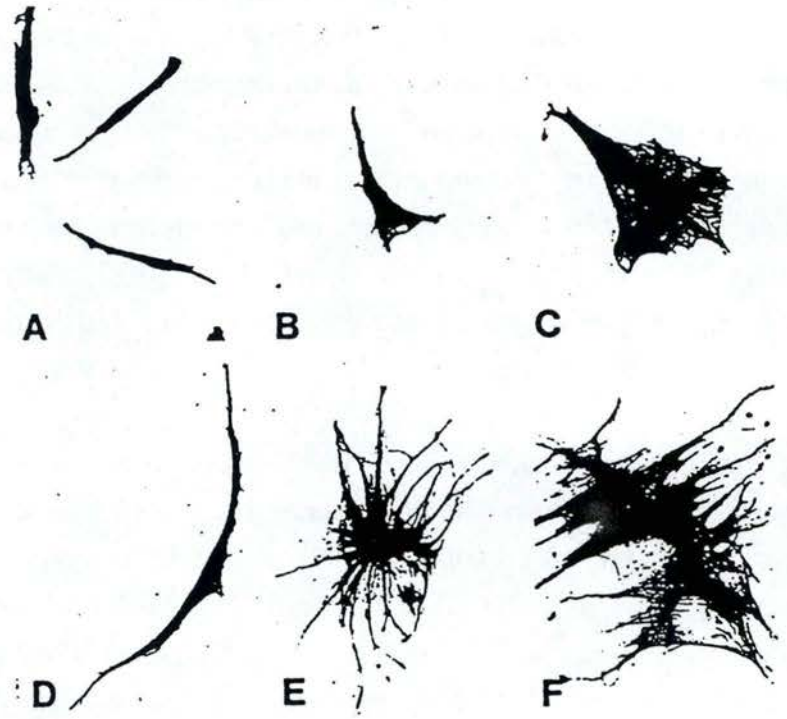


Figure I.2. Passage des fibroblastes HH-8 en culture par leurs types morphologiques successifs. Bayreuther *et al.* (1988) ont identifié trois types fibroblastiques mitotiques nommés MF I, II et III et quatre types fibroblastiques post-mitotiques nommés PMF IV, V, VI et VII. **A**. MF I. **B**. MF II. **C**. MF III. **D**. PMF IV. **E**. PMF V. **F**. PMF VI. (grossissement 100 x). (A partir de Bayreuther, K., *et al.*, 1988). Le dernier stade, PMF VII, correspondant au PMF VI dans sa phase de dégénérescence, n'est pas repris sur cette figure.

2. Les théories du vieillissement :

Ces théories peuvent être classées selon différents modes, conduisant chaque fois à la formation de groupes de théories plus ou moins homogènes. Nous allons considérer un mode de classement des théories du vieillissement cellulaire se basant sur la nature et l'origine des mécanismes qui peuvent conduire au vieillissement. Nous détaillerons premièrement les théories génétiques du vieillissement, faisant intervenir un aspect de l'expression ou de la structure du génome. Ces théories peuvent être soit déterministes, si l'on postule l'existence de gènes qui programment le vieillissement de manière directe, ou stochastique si l'on considère les possibilités d'altérations au hasard du génome au cours du temps. Deuxièmement, nous expliciterons les théories environnementales, donnant un rôle prépondérant aux effets néfastes de l'environnement cellulaire. Ces théories sont toutes stochastiques puisqu'il est impossible de prédire précisément quelles sont les composants cellulaires qui sont modifiés par des interactions avec l'environnement (Toussaint, O. et Remacle, J., 1994a).

Pour fixer l'esprit, rappelons qu'un phénomène est régi par des lois stochastiques s'il comporte des variables aléatoires qui font que ce phénomène est en partie le fruit du hazard et doit être étudié en faisant appel à des calculs probabilistes. Par contre, un phénomène sera gouverné par des lois déterministes si un nombre limité de variables connues permettent de le décrire et évoluent exactement de la même manière à chaque occurence du phénomène considéré, sans faire appel à un calcul probabiliste.

2.1. Théories génétiques :

2.1.1. Théories génétiques et déterministes :

La machinerie génétique de la cellule était une cible de choix pour la création des théories déterministes puisqu'elle détient l'information responsable de l'existence et de la stabilité du système cellulaire. Pour que le vieillissement puisse s'expliquer par des théories qui soient à la fois génétiques et déterministes, il doit exister un nombre restreint de gènes présents tout au cours de la vie d'une cellule ou d'une lignée cellulaire et régissant le vieillissement. Ces gènes doivent, soit être responsables d'une cascade d'expressions et/ou répressions qui s'enchaînent au cours de la vie depuis la création de l'oeuf, soit être capables de déterminer un moment à

partir duquel d'autres gènes devront être activés ou réprimés, entraînant le vieillissement de la cellule. Un exemple de groupe de théories est la théorie d'activation d'un programme après la période de reproduction ou après une modification environnementale, et faisant intervenir des facteurs neuronaux ou des hormones (Kirkwood, T.B.L. et Cremer, T., 1982).

2.1.2. Théories génétiques et stochastiques :

a) Théorie de la régulation génique :

Chaque espèce possède un ensemble unique de gènes qui assurent le développement et la reproduction. Leur activation ou leur répression séquentielle, débutant lors de la fertilisation, détermine la durée de développement et contrôle l'apparition de la période de reproduction. Selon Kanungo (Kanungo, M.S., 1980), la durée de la phase de reproduction dépend de la capacité de défense de l'organisme face à certains facteurs néfastes. Ces facteurs, comme les modifications physico-chimiques du génome, sont dus à des modifications du métabolisme qui peuvent allumer certains gènes indésirables ou affecter l'action de gènes essentiels. Par exemple, au cours de la phase adulte, des métabolites comme certaines hormones ou leurs dérivés peuvent influençer l'expression de certains gènes qui sont exprimés alors qu'ils ne devraient pas l'être, ou l'inverse.

En conclusion, selon cette théorie, le vieillissement sera la conséquence d'un déséquilibre entre les différents facteurs qui ont permis notamment le maintien de la phase de reproduction.

b) Théorie de la différenciation terminale et de l'association de gènes au vieillissement :

Pour Cutler, le vieillissement cellulaire est dû à des modifications de l'expression génique qui entraînent une différenciation terminale des cellules ("dysdifferentiation") (Cutler, R.G., 1985). Ici les modifications de la régulation génique ne sont pas liées à la phase de reproduction mais sont dues à certains effets néfastes précis du métabolisme dont les effets du métabolisme de l'oxygène, source de radicaux libres qui altèrent la plupart des bio-molécules (Cutler, R.G., 1991b). Donc, d'après cette théorie, le vieillissement n'est pas le résultat d'un programme génétique qui exprime des gènes spécifiques mais il est contrôlé par la régulation des mécanismes de protection et de défense qui agissent contre des réactions défavorables. Il

faut donc tenir compte des moyens de défense face aux altérations dues à l'environnement comme par exemple les réactions des radicaux libres. Plus la régulation des gènes permet une lutte efficace contre les radicaux libres, plus une espèce aura une longévité importante; ce qui peut s'appliquer à toute une série de couples attaques-défenses présents dans le système cellulaire (Cutler, R.G., 1982; Cutler, R.G., 1991b).

c) Théorie de l'instabilité du génome :

Selon cette théorie, l'expression des gènes est modifiée au cours de l'âge et cette variation serait due à l'instabilité du génome. L'expression des gènes en ARNm puis en protéines peut être affectée par des instabilités de différentes natures. Des modifications au niveau de l'ADN lui-même peuvent aussi avoir lieu. Pour Strehler (Strehler, B.L., 1986), l'instabilité du génome est la cause première du vieillissement. Par exemple, la perte au hasard d'une ou plusieurs copies de certains gènes au cours du temps serait suffisante pour expliquer les modifications des fonctions cellulaires au cours du vieillissement, ainsi que des modifications au niveau des structures de repliement de l'ADN, des mutations dans l'ADN,... pourraient expliquer une modification de l'expression génétique.

En conclusion, ces théories stochastiques donnent à l'environnement cellulaire une part importante qui est de réaliser des dommages au hasard dans l'ADN ou de modifier son expression. Le fait que ces dommages auront ou non des conséquences sur le vieillissement dépendra de la nature générale du génome, au niveau de sa stucture et de ses relations avec les protéines nucléaires, de son organisation, de ses possibilités de régulation et d'expression, de l'état de différenciation de la cellule,...

Dans ces théories, le génome est considéré comme la cible de choix pour toute une série de dommages. Par contre, pour les théories environnementales, le milieu extérieur de la cellule est responsable de la perte d'homéostasie cellulaire, qui touche tous les composants cellulaires.

2.2. Théories environnementales du vieillissement cellulaire:

2.2.1. Hypothèse de l'erreur catastrophique :

En 1963, Orgel soutenait que la détérioration des fonctions et des structures cellulaires s'accroît lorsque des erreurs s'infiltrent dans la machinerie de synthèse protéique, engendrant ainsi des erreurs dans la synthèse de nouvelles protéines. Si ces erreurs ne sont pas rapidement corrigées, alors la théorie prévoit que le niveau d'erreurs peut s'amplifier et devenir finalement incontrôlable, provoquant une véritable catastrophe au niveau du fonctionnement cellulaire (Orgel, L.E., 1963).

On a démontré que la fidélité de la traduction de l'ARN en protéines peut diminuer au cours du vieillissement. Toutefois, ces résultats ne sont pas une preuve pour la théorie d'Orgel car la fréquence des erreurs apparues ne semble pas suffisante pour entraîner l'erreur catastrophe. De plus il existe de toute façon d'autres mécanismes d'altération des protéines comme toute une série de modifications post-traductionnelles (Houben, A. *et al.*, 1984; Stadtman, E.R., 1988). On s'aperçut donc vite que la théorie de l'erreur catastrophique était trop limitée et qu'en réalité de nombreuses autres causes peuvent donner lieu à des réactions en chaîne défavorables à la survie de la cellule.

2.2.2. Théorie généralisée de l'erreur catastrophique :

En 1973, Orgel élargissa sa pensée en introduisant l'idée que la dégradation cellulaire peut être provoquée non plus seulement par des infidélités de synthèse protéique mais aussi par des altérations de l'ADN mitochondrial et nucléaire ou du métabolisme énergétique, par la peroxydation lipidique des membranes, etc. Cette théorie généralisée maintenait cependant le concept d'une propagation en chaîne d'un facteur défavorable à la cellule (Orgel, L.E., 1973). Cette théorie accepte donc que toute une gamme de phénomènes néfastes liés aux interactions entre la cellule et son environnement peut avoir lieu, et regroupe l'ensemble des théories stochastiques du vieillissement cellulaire, qu'elles soient génétiques ou non.

Parmi ces théories se trouvent la théorie des radicaux libres ou la théorie des liens intermoléculaires (Harman, D., 1956; Harman, D., 1980; Poot, M., 1991; Sohal, R.S. et Allen, R.G., 1986; Sohal, R.S. et Allen, R.G., 1990).

En conclusion, la théorie généralisée de l'erreur catastrophique permet de comprendre que toutes les théories classiques du vieillissement ne s'excluent pas l'une l'autre. Il doit en effet exister une intégration entre les facteurs stochastiques et les facteurs de l'expression génétique régissant l'augmentation du niveau d'erreurs à l'intérieur de la cellule. Cette théorie est un premier pas vers l'unification des théories du vieillissement autour de concepts plus généraux qui considèrent les effets de toutes les sources d'altération de la cellule au cours de son vieillissement.

Par contre, cette théorie ne dit pas comment le niveau d'erreurs s'amplifie de manière explosive à partir d'un certain moment alors que, jusque là, il était maintenu à un niveau contrôlable par la cellule. Il est évident qu'il doit exister au sein du système cellulaire des processus qui permettent de maintenir la structure et les fonctions cellulaires intactes pendant de longues périodes, vu le nombre impressionnant de possibilités d'augmentation du niveau d'erreurs, dues à toutes les altérations possibles par l'environnement.

Strehler (Strehler, B.L., 1986) propose qu'une augmentation de la longévité des espèces animales n'a pu se faire qu'à la suite d'une évolution compensatoire des systèmes de protection pour maintenir l'état des cellules et des tissus face à ces causes d'altérations. On trouve déjà ici l'idée de la nécessité du maintien d'un équilibre entre les altérations diverses et les moyens mis en oeuvre pour s'y opposer.

Holliday (Holliday, R., 1988) remarque que l'on a élaboré une ou des nouvelles théories du vieillissement suite à la découverte de chaque nouveau mécanisme de protection. En dépit des différences qui existent entre ces théories, Holliday les réunit autour du concept global de l'altération de l'entretien de la structure et des fonctions cellulaires. A partir d'un certain moment, les mécanismes de défense ne sont plus capables d'assurer cet entretien, la mort cellulaire est alors irrémédiable. Cet état irréversible a été repris sous le nom de concept de seuil critique d'accumulation d'erreurs, rejoignant dans sa phase finale la théorie généralisée de l'erreur catastrophique proposée en 1973 par Orgel (Remacle, J. *et al.*, 1992a; Toussaint, O. et Remacle, J., 1994b).

3. Le seuil critique d'accumulation d'erreurs :

Le concept de seuil critique d'accumulation d'erreurs montre le lien entre les contraintes génétiques qui déterminent la constitution de toute la cellule et la pression de l'environnement qui induit les erreurs et les modifications de tous les constituants cellulaires. A différents niveaux de son organisation, la cellule possède des systèmes de défense, de réparation et d'élimination des dommages, qui sont programmés par le génome au niveau de leur intensité, de leur relations entre eux ou de leur induction et ce, en fonction de l'état de différenciation des cellules. Ces moyens de protection déterminent l'augmentation du niveau d'erreurs et la survie des cellules face aux modifications de toute nature.

Le concept de seuil critique d'accumulation d'erreurs propose que la mort cellulaire surviendra lorsque ces systèmes de défenses ne seront plus capables, pour diverses raisons, de résister à ces altérations constantes des constituants cellulaires. Ce concept propose, non seulement que la mort de la cellule survient après que la cellule ait été soumise à un stress trop intense, mais aussi que des stress à la limite de la létalité peuvent entraîner la mort de la cellule si l'on baisse le niveau des défenses spécifiques de ce stress, ou inversément, qu'un stress létal peut devenir sublétal si l'on peut augmenter suffisamment le niveau des défenses face à ce stress. Parmi ces systèmes de défense, on compte par exemple le système anti-oxydant qui lutte contre les radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire continuellement produits dans les cellules aérobies.

Ce concept peut-il être utilisé dans des conditions rencontrées par des tissus *in vivo* ?

Que ce soit dans les études des facteurs améliorant ou diminuant la résistance de mitochondries confrontées aux radicaux libres, de cellules confrontées à l'hypoxie, à des antibiotiques générant des radicaux libres, au peroxyde d'hydrogène, aux peroxydes organiques (Toussaint, O. *et al.*, 1993), ... pour citer des exemples bien connus, on est toujours dans des conditions où les stress sont très intenses et provoquent, à court ou à moyen terme, la mort d'une très grande proportion des cellules considérées. Ces situations ne sont pas transposables au vieillissement "normal" des cellules dans un tissu *in vivo*. Dans sa définition brute, le concept de seuil critique peut cependant être appliqué à des situations pathologiques où la mort cellulaire est impliquée. Ainsi la mort cellulaire peut survenir dans des conditions anormales telles que la production de radicaux libres lors d'une intoxication avec une molécule qui génère des radicaux libres, lors de l'inflammation ou lors de certaines maladies chroniques,... Dans ces conditions anormales, il est utile de définir les facteurs principaux responsables des effets

cytotoxiques et les agents qui permettent de rétablir l'équilibre entre l'intensité des stress et les moyens de défense dans le but d'améliorer la survie cellulaire (Remacle, J. *et al.*, 1992b; Toussaint, O. *et al.*, 1992a).

Cependant, le concept de seuil critique d'accumulation d'erreurs ne permet pas d'expliquer comment un individu ou un tissu vieilli dans des conditions normales, où la mort cellulaire n'est pas toujours impliquée, ni comment le niveau d'erreur augmente au cours du vieillissement normal des cellules. La question est donc plutôt de savoir ce qui se passe pendant le vieillissement pour finalement aboutir au seuil critique et par là à la mort.

En conclusion, la mort cellulaire n'est pas toujours une condition nécessaire au vieillissement de l'organe (Holliday, R., 1988). Dans cette optique, une modification dégénérative du fonctionnement cellulaire serait une condition suffisante pour expliquer la difficulté croissante de maintenir l'homéostasie, difficulté qui est observée pour la plupart des organes et de leurs fonctions physiologiques. La question est de savoir comment une cellule finit par connaître une augmentation de son niveau d'erreurs concomitante à une perte d'efficacité de ses fonctions.

Strehler (Strehler, B.L., 1986) a suggéré d'approcher cette question en appliquant la théorie de la thermodynamique des systèmes ouverts au vieillissement des cellules. Cette théorie a permis une approche globale de l'évolution du système cellulaire au cours du temps de vie. Dans cette théorie, on porte surtout l'attention sur deux processus : d'une part, l'évolution du niveau d'erreurs et, d'autre part, la production d'énergie dans les cellules et son utilisation pour de multiples fonctions cellulaires. Cette théorie permet d'expliquer comment le niveau d'erreurs augmente à la suite de diminutions des possibilités de réaction de la cellule face aux stress de toute nature pour arriver finalement à un seuil critique où la cellule dégénère et meurt. Voyons à présent cette théorie plus en détail.

4. Thermodynamique des systèmes ouverts :

4.1. La cellule vue comme un système ouvert :

La cellule peut être considérée comme un système ouvert et globalement très bien régulé qui s'organise en fonction des conditions externes et de la réponse de ses différents constituants. De ce point de vue, la cellule se comporte en accord avec les lois de la thermodynamique des systèmes ouverts, où des échanges de matière et d'énergie ont lieu. La thermodynamique des processus irréversibles est subdivisée en deux domaines : d'une part, le domaine proche de l'équilibre décrit par des lois linéaires et d'autre part, le domaine loin de l'équilibre décrit par des lois non linéaires.

Dans le premier domaine, le système ouvert proche de l'équilibre, dans son état stationnaire, va fonctionner à un minimum de production d'entropie interne au système. Il retrouvera ce minimum après chaque fluctuation et sera stable aussi longtemps qu'il ne dévie pas au-delà de ce domaine linéaire proche de l'équilibre. Si la variation d'entropie au cours du temps s'écrit dS / dt, elle peut être décomposée en 2 termes (diS + deS) / dt, avec deS / dt étant l'échange d'entropie avec l'extérieur du système ouvert considéré et diS / dt, la production d'entropie interne au système.

Les systèmes ouverts loin de l'équilibre ne reviennent pas forcément à l'état stationnaire de départ après une fluctuation, car il n'existe pas de critères de stabilité pour garantir l'élimination totale des fluctuations et le retour à l'état stationnaire de départ. Au contraire, les fluctuations peuvent être amplifiées et amener une modification importante de l'évolution du système. Les systèmes non linéaires peuvent en fait avoir plus d'un état stationnaire. Si ces sytèmes ne sont pas stables, cela signifie que lorsqu'ils sont perturbés, il ne vont pas forcément s'adapter par de petites modifications temporaires de leurs paramètres thermodynamiques. Un système ouvert loin de l'équilibre quittera son état stationnaire si une perturbation ou une modification initiale quelconque s'amplifie jusqu'à une valeur critique. Alors le système cherchera un nouvel état stationnaire ou disparaîtra (Nicolis, G. et Prigogine, I., 1977).

Une cellule peut-être considérée comme étant, à un moment donné, à un état stationnaire où l'entropie produite à l'intérieur du système est constamment égale à l'entropie reçue par l'extérieur du système (Babloyantz, A., 1986). Cependant, si l'on suit le système au cours du temps, cela n'est plus vrai. En effet, si toute l'entropie produite dans la cellule était exportée totalement à l'extérieur, la cellule serait éternelle, ce qui n'est pas le cas des cellules normales.

Ce que l'on observe au contraire dans les systèmes ouverts et plus particulièrement dans les cellules est une diminution progressive de la production d'entropie correlée avec une diminution au cours du temps de l'entropie qui est exportée à l'extérieur du système (Toussaint, O. *et al.*, 1991).

L'entropie produite dans un système ouvert, tel qu'une cellule, représente la différence entre l'entropie qu'il est possible de libérer à partir des molécules qui entrent dans le système et celles qui le quittent. On comprend dès lors que cette production d'entropie est directement liée à la quantité d'énergie libre totale disponible dans la cellule du fait de ses transformations métaboliques, cette énergie libre disponible étant en partie finalement transformée en entropie après utilisation par la cellule. La diminution de la production d'entropie interne d'une cellule est liée à une diminution de la capacité de transformer l'énergie libre en travail avec le temps, pour une quantité donnée de substrat énergétique pénétrant dans la cellule. En d'autres mots, le fonctionnement général de la cellule serait moins efficace du fait d'altérations diverses dans son fonctionnement comme l'augmentation d'erreurs dans les protéines synthétisées, l'accumulation des déchets, un découplage partiel des mitochondries,... et finalement la modification de certaines relations structurelles entre les composants cellulaires. D'autre part, la diminution de la production d'entropie provient aussi d'une baisse générale de la production d'énergie libre par la cellule. En effet, la production d'entropie est directement liée à l'intensité de production de chaleur par le métabolisme, elle même correlée avec une baisse de la respiration observée au cours du vieillissement (Toussaint, O., *et al.*, 1991).

Selon cette interprétation, les systèmes biologiques vont montrer une diminution générale de leur niveau de fonctionnement, et donc de leur métabolisme, résultant des perturbations venant de l'environnement cellulaire ou d'une dérégulation générale du métabolisme contrôlé génétiquement. Une particularité majeure des cellules considérées sous cet angle est qu'elles doivent sans cesse optimiser tous les processus demandeurs d'énergie libre, en tenant compte à la fois de leur état de différenciation et des interactions avec leur environnement pour maintenir leurs structures et leurs fonctions (Toussaint, O. *et al.*, sous presse).

4.2. Implication de la thermodynamique pour expliquer le vieillissement cellulaire (Toussaint, O., *et al.*, 1991) :

Si d'un côté, il est vrai que le vieillissement est un phénomène complexe variant d'un type cellulaire à l'autre principalement suivant son état de différenciation et son espèce d'origine, il existe par contre pour toute cellule un caractère commun du vieillissement : l'existence de processus irréversibles, donc dépendant du temps, et conduisant graduellement à la mort

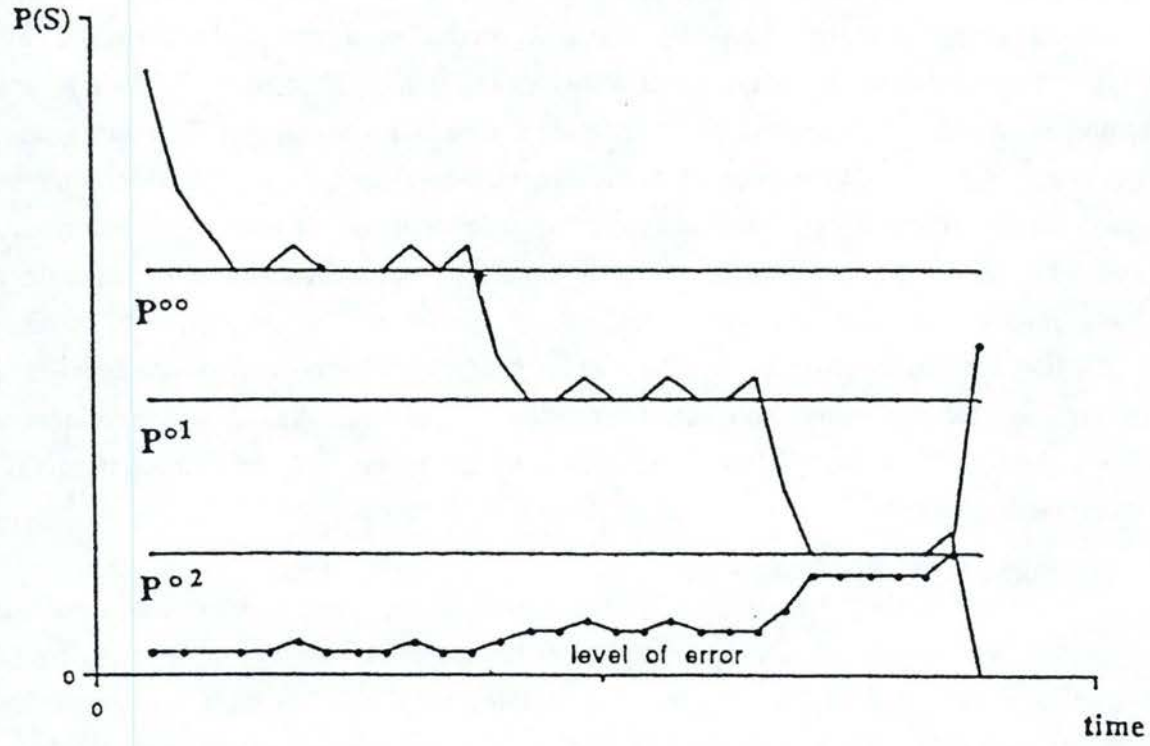


Figure I.3. Evolution de la production d'entropie (P(S) = diS / dt) en fonction du temps dans un système ouvert loin de l'équilibre. Les différents niveaux de Po (Po_1, Po_2,...,Po_i) représentent les différents états stationnaires de P(S) qui peuvent exister après une fluctuation provoquant une déstabilisation de l'état stationnaire de départ. En même temps, le niveau des erreurs à l'intérieur du système va augmenter, cela conduisant finalement à une déstabilisation totale et irréversible du système (A partir de Toussaint, O., *et al.*, 1991).

cellulaire. Si la cellule est considérée comme un système loin de l'équilibre, elle fonctionne à un moment donné à un minimum de production d'entropie. Mais comme il existe d'autres minima possibles (Figure I.3.), la cellule peut passer de l'un à l'autre au cours du processus de vieillissement.

Les systèmes de défense, de protection et de réparation doivent être considérés dans ce processus car ils préviennent l'accumulation des erreurs, évitant ainsi une diminution précoce de la production d'entropie. Sans les systèmes de défense, l'accumulation des erreurs serait tellement rapide que la cellule mourrait beaucoup plus rapidement. L'évolution de la cellule vers des états de production d'entropie plus faible doit donc tenir compte du rôle de défense joué par les multiples systèmes qui protègent la cellule contre les divers stress rencontrés au cours de la vie.

4.3. Effets des stress subis par les cellules (Toussaint, O., *et al.*, 1991) :

Les stress subis pour les cellules ont été répartis en trois groupes suivant leur importance relative par rapport au niveau des systèmes de défense.

Le premier groupe concerne les stress de faible intensité qui sont omniprésents (tels que les faibles fluctuations de pH, de température, de concentration en radicaux libres, ...). Ces stress de faible intensité conduisent à une légère augmentation du niveau d'erreurs qui sont corrigées immédiatemment par la cellule grâce à ses systèmes de défense. Lorsque le système cellulaire utilise ses systèmes de défense et de réparation pour corriger ou éliminer les erreurs, il va exporter en dehors de la cellule la chaleur et / ou les produits provenant des réactions métaboliques impliquées. Cette correction nécessite une utilisation d'énergie libre qui va donc augmenter temporairement la production d'entropie libre. Si le retour à l'état antérieur de production d'entropie est possible, il y a maintien de la stabilité. Lorsque les erreurs seront corrigées, la production d'entropie reviendra au niveau correspondant à l'état stationnaire (Figure I.4.(A) et (B)).

Mais il faut aussi prévoir que, même si des erreurs irréversibles sont produites suite au stress, le système cellulaire pourra se comporter de telle manière que les autres fonctions pourront contre-balancer ces erreurs irréversibles. Cette situation correspond ainsi à une deuxième réaction possible de la cellule face à ces stress, c'est-à-dire une induction temporaire ou définitive de mécanismes de protection incluant certaines protéines ou enzymes modifiant temporairement ou définitivement l'ensemble du fonctionnement cellulaire. Dans tous les cas cependant, le système reviendra à un état stationnaire de production d'entropie identique à celui de départ, tout aussi longtemps que ces mécanismes de compensation seront efficaces.

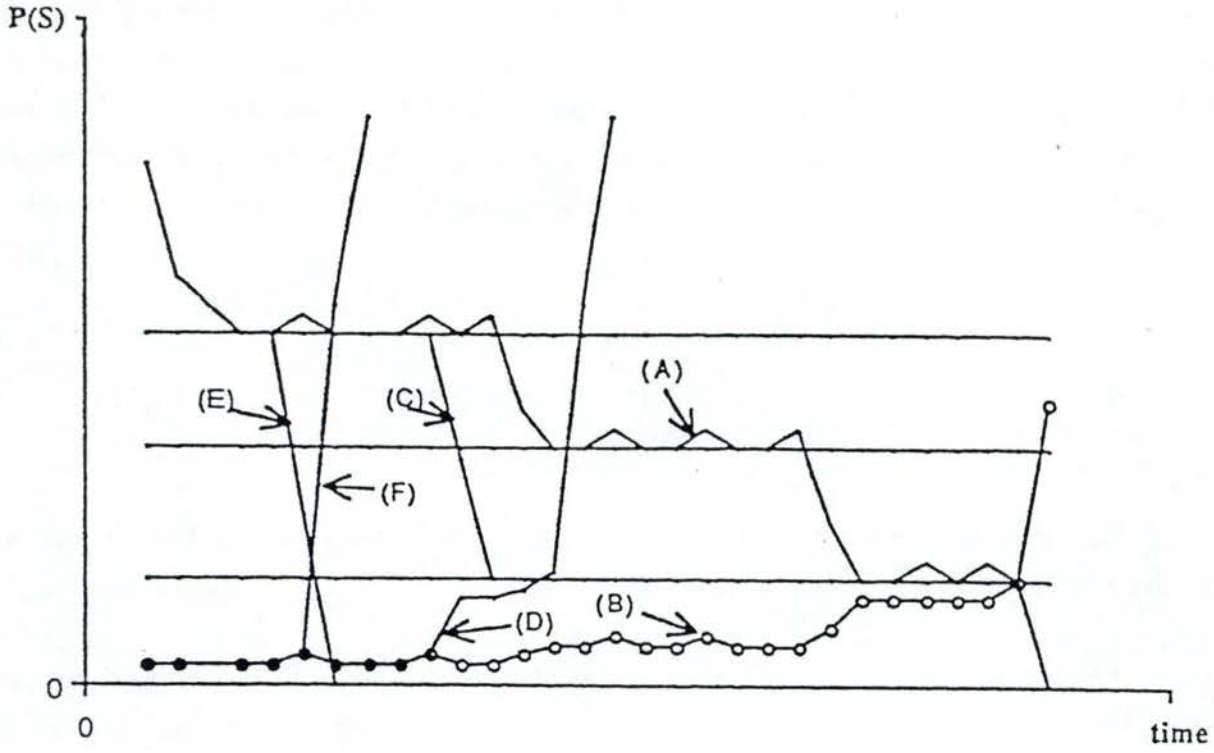


Figure I.4.

Effet des stress faibles sur la production d'entropie. Le système réagit de manière à revenir à sa production d'entropie initiale (A) et à son niveau d'erreurs initial (B).

Effet de stress plus intenses sur la producyion d'entropie. Un stress peut déstabiliser le système si bien qu'il chute dans un nouvel état stationnaire caractérisé par une production d'entropie plus faible (C) et un niveau d'erreurs plus élevé (D) que dans la situation initiale. La capacité de résister à des stress subséquents sera plus faible et le seuil critique d'accumulation d'erreurs sera plus facilement atteint.

Effet de stress très intenses sur la production d'entropie. Le niveau d'erreurs devient tellement élevé lors du stress que le système ne peut pas trouver de nouvel état stationnaire et finit donc par disparaître (E et F) (A partir de Toussaint, O., *et al.*, 1991).

Le second groupe de stress correspond à des stress répétés sur une courte période de temps ou à des stress intenses mais non létaux résultant de situations tout à fait anormales pour les cellules. Dans ces situations, il n'y aura pas seulement une faible augmentation de la production d'entropie mais les systèmes de défense spécifiques de la cellule pourront être dépassés et même être altérés. De nombreuses erreurs ou modifications apparaîtront ainsi à divers niveaux de l'organisation de la cellule et d'autres systèmes de défense devront à leur tour être mis en oeuvre pour protéger la cellule. Si les systèmes de défense sont capables de corriger les erreurs, alors la cellule reste thermodynamiquement stable. Par contre, si ces systèmes de défense ne corrigent pas assez vite ces erreurs, d'autres constituants cellulaires pourront être irréversiblement touchés, de même que certaines fonctions régulatrices. Dans ce cas, la thermodynamique des systèmes ouverts prévoit que les perturbations initiales laisseront une empreinte et vont déstabiliser la cellule qui devra rechercher un nouvel état stationnaire. Le comportement de la cellule face à de tels stress dépendra fortement de l'intensité et de la vitesse de réparation face à l'intensité du stress. Soit la cellule trouve ce nouvel état stationnaire caractérisé par une production d'entropie plus faible et un niveau d'entropie interne plus élevé (Figure I.4. (C) et (D)). Soit elle ne le trouve pas et alors elle dégénère et meurt.

Le troisième groupe comprend les stress létaux où les erreurs sont tellement nombreuses et s'étendent à trop de constituants cellulaires, si bien que la cellule ne pourra plus retrouver un état stationnaire. On atteint directement le seuil critique d'accumulation d'erreurs et la cellule meurt (Figure I.4. (E) et (F)).

Avec l'âge, les cellules ne résisteront pas de la même façon à un stress de même intensité. En effet, le niveau d'erreurs y est plus élevé que dans les cellules jeunes, et la rapidité et l'intensité de la réponse des systèmes de défense cellulaire face aux stress sont diminuées, le tout étant régi par une baisse dans la rapidité et l'intensité du métabolisme énergétique face à la demande accrue en énergie libre pour répondre au stress. Ainsi, les cellules vieilles vont passer plus facilement vers des états de production d'entropie plus faible de telle manière que leur potentiel de défense ainsi que l'induction des systèmes de réparation vont devenir de plus en plus faibles. Finalement, le niveau d'erreurs va être tel que la cellule ne pourra plus maintenir le métabolisme de base nécessaire à sa survie. Ce sera l'étape finale de la cellule puisqu'elle ne pourra plus résister à aucun stress. Voyons à présent plus en détail le rôle du métabolisme énergétique dans ce processus.

4.4. Rôle de l'énergie :

Comme nous l'avons déjà suggéré, le niveau d'énergie cellulaire est un paramètre essentiel qui détermine la résistance cellulaire en conditions de stress et influence donc le

vieillissement cellulaire. Environ 40 pourcents de l'énergie totale entrant dans le catabolisme de la cellule est transformée en énergie riche en liens phosphodiesters de l'ATP et en NADPH. Cette énergie libre peut-être utilisée par la cellule pour permettre de réaliser des fonctions demandant des quantités d'énergie variables pour le maintien de sa propre structure par le turn-over de ces composants, par ses mouvements ou par ses interactions avec son environnement,... (Toussaint, O., *et al.*, sous presse; Toussaint, O. et Remacle, J., 1993). De plus la cellule possède de nombreux systèmes de régulation permettant une réponse aux stress. Par exemple, la Heat Shock Protein 70 (HSP 70) est induite dans des conditions d'hypoxie sévère. Puisque l'hypoxie résulte en une diminution du contenu cellulaire en ATP, un manque d'ATP a été suspecté d'être responsable de cette induction, ce qui a été montré expérimentalement (Benjamin, I.J. *et al.*, 1992).

Au delà de ce type de stress particulier étant responsable directement d'une diminution du niveau d'ATP, le métabolisme énergétique est aussi impliqué dans la réponse à d'autres stress. C'est ainsi que l'on observe une augmentation du transport de glucose dans de nombreuses situations de stress, ce qui indique un besoin accru d'énergie libre pour la défense cellulaire (Pasternak, C.A. *et al.*, 1991)

On a démontré expérimentalement ce besoin accru en énergie par l'observation d'un effet synergique de mortalité cellulaire lorsque les cellules connaissent de manière concomittante une diminution de leur taux de renouvellement d'ATP, par exemple en découplant partiellement les mitochondries, et un stress, par exemple dû aux radicaux libres ou à l'éthanol. A l'opposé, quand des substrats énergétiques sont présents pendant le stress, la résistance au stress est accrue, de même que la quantité d'ATP cellulaire à la fin du stress (Toussaint, O. *et al.*, 1994). De plus, la présence de molécules énergétiques diminue la vitesse de passage des fibroblastes d'un morphotype à l'autre à la suite de différents stress (Toussaint, O., *et al.*, sous presse).

En conclusion, les cellules peuvent subsister dans un nombre fini d'états stationnaires dans lesquels elles optimalisent leur production d'énergie en diminuant le plus possible leur production d'entropie tout en s'opposant au maximum de leurs capacités au passage à l'état stationnaire suivant le plus probable.

5. Application du modèle théorique au vieillissement *in vitro* des fibroblastes :

5.1 Vieillissement normal :

Le système d'étude des cellules *in vitro* et plus particulièrement le modèle de Hayflick ne peut pas être appliqué à tous les types cellulaires de l'organisme adulte car en général les cellules différenciées ne se divisent plus, ou très peu, et d'autres perdent leurs caractéristiques en se dédifférenciant lorsqu'elles sont maintenues en culture.

Par contre, les fibroblastes en culture représentent un bon modèle pour tester le modèle théorique décrit ci-dessus. En effet, nous avons déjà cité Bayreuther et ses collaborateurs qui ont montré que les fibroblastes passent progressivement d'un type de morphologie à un autre et que ce passage se fait toujours suivant un ordre bien précis : MF I, II, III puis PMF IV, V, VI et VII (figure I.2). Etant donné que ce processus est graduel et bien reproductible, ces auteurs ont proposé que ce modèle de culture représente un système cellulaire qui se différencie progressivement par l'expression d'un processus discontinu, lié à un programme génétique dépendant du temps et du nombre de générations de cellules. Pour eux, le vieillissement cellulaire représente les étapes d'un processus de différenciation qui affecte l'ensemble des cellules de l'organisme (Bayreuther, K., *et al.*, 1988). Cependant, nous montrerons plus bas que l'environnement peut avoir un effet sur ce processus.

5.1.1. Caractéristiques morphologiques :

Bayreuther et al. ont décrit sept types de fibroblastes dans la lignée HH-8 (fibroblastes dermiques humains) (Bayreuther, K., *et al.*, 1988) et WI-38 (fibroblastes de poumons foetal humain) (Bayrauther, K. et Gogol, J., 1993; Toussaint, O., *et al.*, 1992b) morphologiquement et biochimiquement distincts. Les morphotypes MFI sont des petites cellules en forme de fuseau et très réfringentes en microscopie de phase, les morphotypes MFII sont des petites cellules épithéloïdes grossièrement rectangulaires et les morphotypes MFIII sont des cellules plus grandes à l'aspect plus triangulaire. Viennent ensuite les cellules post-mitotiques viables (PMF IV à VI). Les morphotypes IV sont de longues cellules en forme de fuseau dont les contours sont crénelés, les morphotypes V sont de grandes cellules épithéloïdes avec un rapport noyau / cytoplasme plus élevé, critères qui s'accentuent pour les morphotypes VI. Enfin, les

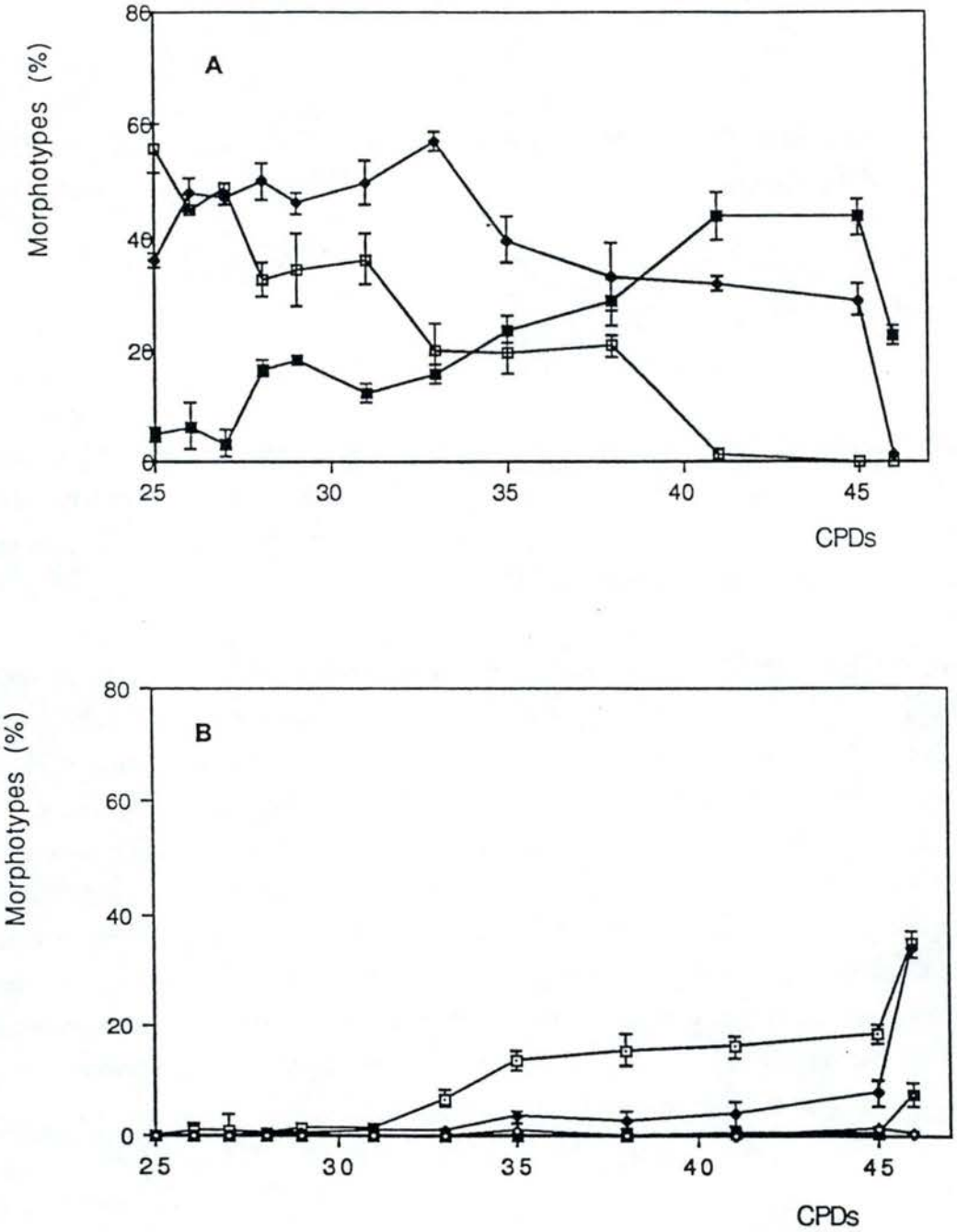


Figure I.5. Proportion des morphotypes des fibroblastes WI-38 en fonction des passages en culture (ou CPD pour Cumulation Population Doublings).

A : morphotypes mitotiques MF I (-□-) , MF II (-◆-), MF III (-■-).

B : morphotypes post-mitotiques PMF IV (-□-), PMF V (-◆-), PMF VI (-■-), PMF VII (-◇-)

(A partir de Toussaint, O., *et al.*, 1992 b).

morphotypes VII sont des cellules en dégénérescence (figure I.2.). Si l'on observe l'évolution des morphotypes MFI, MFII et MFIII en fonction du nombre de générations, on constate qu'aux premières générations, les cellules de type MFI sont majoritaires mais que progressivement, elles sont remplacées par les morphotypes MFII puis finalement par les cellules MF III qui deviennent majoritaires à la fin de la culture. Les cellules PMF IV, V, VI et VII ne sont présentes que dans toutes les dernières générations au moment où les cellules ne se divisent plus ou très peu, et leurs proportions augmentent après le dernier passage en culture, lorsque la culture est formée de cellules post-mitotiuqes uniquement. La figure I.5. donne l'évolution des proportions des morphotypes des fibroblastes de la souche WI-38 en fonction des passages en culture.

5.1.2. Caractéristiques biochimiques :

L'analyse de l'expression protéique des cellules suivant un processus de différenciation peut se faire à l'aide des électrophorèses en gel 2D. Cette technique permet de séparer, d'identifier et de quantifier un mélange complexe de protéines grâce à la combinaison dans un premier temps, de l'électrofocalisation et, deuxièmement, d'une électrophorèse sur de grands gels plats, en conditions dénaturantes. La séparation est basée sur des propriétés indépendantes des protéines : à savoir d'une part la charge, mise en évidence par le point isoélectrique lors de l'électrophorèse dans la première dimension, et d'autre part le poids moléculaire qui détermine la mobilité des complexes protéines-SDS dans les gels polyacrylamide au cours de l'électrophorèse dans une seconde dimension.

Une prévision du modèle théorique est que, lorsque la cellule passe d'un état stationnaire à un autre, elle va s'adapter à un nouvel état en réajustant et en réorganisant son génome, c'est-à-dire en modifiant l'expression de ses gènes. Lors d'un passage vers des cellules de morphotype âgé, par une transition naturelle ou sous l'effet de stress, on peut donc s'attendre a ce qu'il y ait toute une série de polypeptides protéiques qui soient induits alors que d'autres verraient leur synthèse déprimée ou réprimée.

Francz et al. (Francz, P.I. *et al.*, 1989) ont montré que chacun des 7 morphotypes cellulaires présentent des polypeptides spécifiques. 14 marqueurs protéiques spécifiques de ces morphotypes ont été trouvés au niveau de la fraction cytoplasmique et nucléaire, 24 autres faisant partie des protéines membranaires et des protéines secrétées. Les PMF VII, comprenant les fibroblastes en dégénérescence, montrent des changements de protéines très importants. La nature de ces marqueurs polypeptidiques n'est pas encore parfaitement connue. Grâce à des anticorps monoclonaux dirigés contre ces marqueurs, on espère purifier les polypeptides spécifiques des différents morphotypes.

5.2. Vieillissement accéléré sous l'effet des stress :

5.2.1. Caractéristiques morphologiques :

Comme prévu par le modèle théorique expliqué plus haut, l'accélération du passage par les différents morphotypes peut se produire lors de stress de diverse nature agissant sur l'ADN comme l'exposition aux rayons U.V, à la mitomycine C, à des champs magnétiques intenses (Rodeman, H.P., 1989; Rodeman, H.P. *et al.*, 1989a; Rodeman, H.P. *et al.*, 1989b). Cela pourrait se comprendre si on imagine que ces stress agissent uniquement sur l'ADN, accélérent aussi le processus de différenciation. Cependant d'autres facteurs qui n'ont pas une action directe ou unique sur l'ADN comme l'éthanol ou les hydroperoxydes, accélèrent également le passage de ces cellules par leurs divers morphotypes (Toussaint, O. *et al.*, 1992b). Une telle augmentation est dépendante de l'intensité et de la durée du stress. Par exemple, des incubations succesives avec du tert-butylhydroperoxide ou de l'éthanol provoquent bien le passage de proportions appréciables de cellules de leur morphotype présent aux suivants. L'effet résultant de trois stress sous tert-butylhydroperoxide ou de cinq stress sous éthanol est très marqué avec une importante réduction des proportions de morphotypes I et II et en même temps une augmentation des morphotypes III, IV et V (Toussaint, O., *et al.*, sous presse). Il y a clairement un changement d'un type cellulaire au suivant et non une sélection d'un morphotype donné en un autre quelconque.

5.2.2. Caractéristiques biochimiques :

Si l'on veut montrer que les stress entraînent bien l'apparition des polypeptides correspondant aux morphotypes plus âgés apparaissant après ces stress, il faut tenir compte de l'existence de deux réponses cellulaires consécutives.

La première consiste en l'induction de protéines de défense spécifiques du stress encourru (pour une revue : Holbrook, N.J. et Fornace, A.J., 1991) . Par exemple, la synthèse de protéines de phase aigue comme l'interleukine 1 ou le facteur de nécrose tumorale (TNF-α) peuvent aussi être induites lors de la réaction de la cellule au stress (Alam, T. *et al.*, 1992; Kwon, H.M. *et al.*, 1992; Smardo, F.L. *et al.*, 1992). Des enzymes impliqués dans la réparation des dommages peuvent aussi être induites comme la O-6-methylguanine-ADN méthyltransférase, l'hème oxygénase, l'ubiquitine, les protéines de choc thermique (Fritz, G. et Kaina, B., 1992),... Beaucoup d'autres protéines induites ne sont pas ou peu spécifiques de la nature des stress subis par la cellule. On peut penser que quelques unes d'entre elles, au moins, font partie du système global régulateur qui, après le stress, va réorienter l'emploi de l'énergie

cellulaire vers des voies prioritaires de la cellule, afin de maintenir l'intégralité de la cellule et sa survie. Notons aussi que beaucoup de ces protéines sont en relation directe avec le contrôle de la croissance et de la différenciation cellulaire (Toussaint, O., *et al.*, sous presse).

Si le stress a été assez intense pour faire passer les cellules vers des morphotypes plus âgés, on peut observer la seconde réponse de la cellule au stress, à savoir l'apparition définitive des polypeptides spécifiques de ceux-ci, ce qui correspond à une régulation de l'expression génétique spécifique à chaque morphotype. Des changements identiques dans l'expression de protéines spécifiques sont observés quand on compare une population cellulaire contenant un morphotype fibroblastique donné apparaissant en cours de vieillissement spontané, avec une population contenant le même morphotype fibroblastique mais dont le vieillissement a été induit expérimentalement par des stress. De plus, les morphotypes fibroblastiques dont l'apparition est spontanée ou induite expérimentalement ne montrent pas seulement une expression spécifique du morphotype, mais aussi une quantité identique de toutes les autres protéines non spécifiques du morphotype considéré (Rodeman, H.P., *et al.*, 1989a).

5.3. Conclusion :

Les stress accélèrent le passage d'un morphotype fibroblastique à un autre dans un sens précis, ceci étant garanti par les caractéristiques autant morphologiques que biochimiques de chaque morphotype. Ces caractéristiques se retrouvent de façon similaire au cours du vieillissement normal ou après un vieillissement accéléré sous l'effet de stress, seul un facteur de temps différencie leur apparition.

Dans cette optique le passage des fibroblastes d'un morphotype à l'autre peut être considéré comme une réorganisation du comportement cellulaire entraînant l'expression des protéines nécessaires à la survie et ayant lieu soit au cours du vieillissement normal soit au cours du vieillissement accéléré sous l'effet des stress. D'ailleurs, en plus de l'apparition des polypeptides à chaque morphotype, on a observé des gènes spécifiquement transcrits dans les cellules jeunes ou vieilles. Quels sont ces gènes?

6. Expression génétique et vieillissement :

De manière générale, l'étude de l'expression génétique est essentielle afin de comprendre l'effet du temps sur le comportement cellulaire, donc de comprendre le vieillissement cellulaire. Ainsi il est possible d'étudier *in vitro* l'expression génétique des fibroblastes embryonnaires qui ont un nombre maximum de générations spécifiques de l'espèce et du tissu d'origine, lorsque les cultures sont réalisées dans des conditions standardisées, avec un minimum de stress excepté les traitements à la trypsine et une augmentation de la tension en oxygène de l'atmosphère normale par rapport à la tension en oxygène tissulaire rencontrée *in vivo*.

6.1. Expression génétique différentielle entre les cellules jeunes et vieilles :

En première approche, des expériences de microinjection d'ARNm de cellules vieilles dans des cellules jeunes ont montré l'inhibition de la synthèse d'ADN dans ces dernières, montrant bien qu'il existe une différence au niveau de l'expression génétique des cellules vieilles et des cellules jeunes. Dogget et al. (Doggett, D.L. *et al.*, 1992) ont identifié un total de 11 gènes pour lesquels l'ARNm est exprimé différemment dans les fibroblastes jeunes quiescents et les fibroblastes vieux quiescents (en condition d'arrêt du cycle cellulaire, en phase G0). Deux gènes, EPC-1 et EPC-2, dont les taux en ARNm diminuent dans les cellules vieilles, ont été séquencés mais ne correspondent à aucune séquence connue. Deux gènes, dont l'expression de l'ARNm est élévé dans les cellules vieilles, sont des gènes mitochondriaux codant pour la sous-unité 4 de la NADH déshydrogénase et pour le cytochrome b. Cette équipe a aussi identifié sept autres gènes avec un niveau élevé d'ARNm dans les cellules vieilles dont trois (LPC-1, LPC-14 et LPC-24) ont été partiellement séquencés et ne correspondent à aucune séquence connue.

D'autres travaux montrent qu'il semble exister une famille d'effecteurs négatifs de la croissance des fibroblastes exprimés dans les cellules vieilles. Parmi ceux-ci se trouveraient le facteur SUSM-1 (Spiering, A.L. et Smith, J.R., 1991), les gènes spécifiques d'arrêt de croissance (gas : growth arrest specific genes) (Spiering, A.L. et Smith, J.R., 1991) et la protéine antiproliférative appelée prohibitine (McClung, J.K., 1989). Wistrom et Villeponteau ont découvert un gène associé au vieillissement (SAG : senescence-associated gene) qui aurait aussi une fonction de protéine régulatrice (Wistrom, C. et Villeponteau, B., 1992). Ces facteurs négatifs pourraient être régulés anormalement dans les cellules vieilles conduisant ainsi à un arrêt du cycle cellulaire. Ils pourraient agir contre l'action de facteurs favorisant la prolifération puisque ces derniers semblent être réprimés dans les cellules post-mitotiques.

D'autres facteurs pourraient être impliqués comme la diminution de la longueur des télomères au cours du vieillissement, diminution qui n'a pas lieu dans les cellules immortelles et dans les cellules germinales. Cette diminution de longueur pourrait être attribuée à l'expression de l'activité de la télomérase, qui est une ribonucléoprotéine (Allsopp, R.C. *et al.*, 1992; Counter, C.M. *et al.*, 1992). Tous les paramètres affectant l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-prolifératifs ne sont pas encore bien connus et la disponibilité en énergie pourrait en faire partie.

Il existe encore d'autres gènes préférentiellement exprimés dans les fibroblastes âgés comme la vimentine (Satoh, Y. *et al.*, 1994), le facteur d'élongation I alpha, l'ICFBP-3 et d'autres préférentiellement exprimés dans les cellules jeunes comme c-fos (Brenneisen, P. *et al.*, 1994; Fujita, T. *et al.*, 1992a), cdc2, cycA et cycB (Dulic, V. *et al.*, 1993). Un autre marqueur du vieillissement a été trouvé dans le poumon et le foie de rat : la protéine 30 (SMP 30 : senescence marker protein 30) dont l'expression diminue au cours du vieillissement. La séquence en acides aminés, déduite à partir de l'ADNc, suggère qu'elle n'a pas d'homologie remarquable avec une autre protéine connue et que cette protéine aurait une fonction régulatrice importante (Fujita, T., *et al.*, 1992a; Fujita, T. *et al.*, 1992b).

Notre travail s'insère dans ces recherches dont le but est de différencier l'expression génétique entre les cellules vieilles et les cellules jeunes. Il serait intéressant d'observer à quel moment exact ces gènes spécifiques du vieillissement apparaissent, c'est pourquoi nous voulons étudier la différence d'expression génétique non plus sur un ensemble de morphotypes cellulaires comme fait précédemment, mais sur un morphotype cellulaire à la fois. Pour ce faire, nous voudrions employer une méthode d'hybridation soustractive. L'hybridation soustractive est une méthode qui s'est beaucoup étendue dans le domaine du clonage de gènes exprimés de façon différentielle.

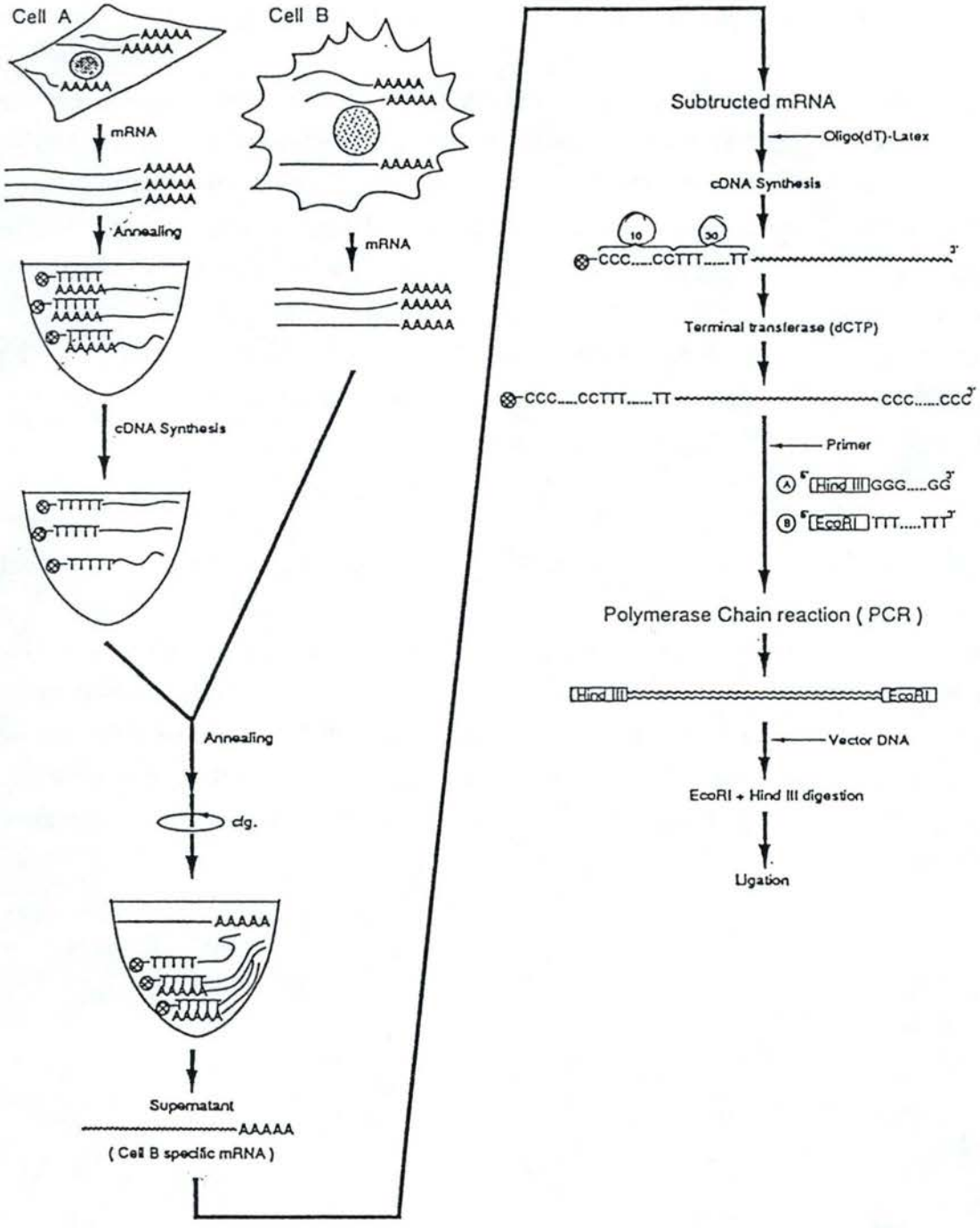


Figure I.6. Schéma représentatif de la technique d'hybridation soustractive utilisant les billes de latex (Hara, E. *et al.*, 1991; Satoh, Y. *et al.*, 1994). Pour de plus amples explications, voir le texte.

7. Techniques permettant de différencier deux populations de cellules :

Il existe de nombreuses techniques permettant de trouver un gène exprimé de façon différentielle dans des cellules en culture ou dans des tissus. Nous allons présenter les principales variantes de ces techniques utlisant ou non l'hybridation soustractive. Nous justifierons le choix opéré parmi ces variantes en fonction de nos objectifs et de nos contraintes expérimentales dans l'objectif du travail.

7.1. Hybridation soustractive :

7.1.1. Hybridation soustractive utilisant des billes de latex (Figure I.6.):

Une première technique d'hybridation soustractive utilise des particules de latex en polystyrène auxquelles sont liés de façon covalente une séquence de 30 thymidines (polydT) (Hara, E. *et al.*, 1991; Satoh, Y., *et al.*, 1994). Appelons ces billes oligotex$(dT)_{30}$. Ces billes sont résistantes aux agents fortement alcalins, à la température et aux détergents.

Cette technique fut employées dans l'identification de 3 gènes du vieillissement associés à la sénescence des cellules humaines (Satoh, Y., *et al.*, 1994).

L'ARNm est extrait des deux populations à différencier. On appelera la population A ou driver la population qui sert à sélectionner les ARNm de la population d'intérêt (dite population B ou cible) dont on veut purifier les ARNm spécifiques c'est-à-dire différents de ceux présents dans la population driver. Dix µg d'ARNm de la population driver sont mis en présence de billes oligotex$(dT)_{30}$ pour que le polyA des ARNm s'hybride au polyT des billes. A partir de cet ARNm sur bille, avec comme amorce la séquence polydT, on synthétise de l'ADNc par transcription inverse. L'ARNm est ensuite enlevé et il reste à ce moment de l'ADNc sur billes. L'ADNc sur billes est mis en présence d'un µg d'ARNm extrait des cellules cibles. Pour empêcher l'hybridation non spécifique, on bloque les polyA$^+$ des ARNm des cellules cibles avec un oligonucléotide polyT. L'oligonucléotide polyT restant des billes et les polyT de l'ADNc sur billes des cellules driver sont masqués par hybridation avec un oligonucléotide polyA. L'hybridation entre les ADNc driver et les ARNm cibles communs se fera ensuite. Il ne

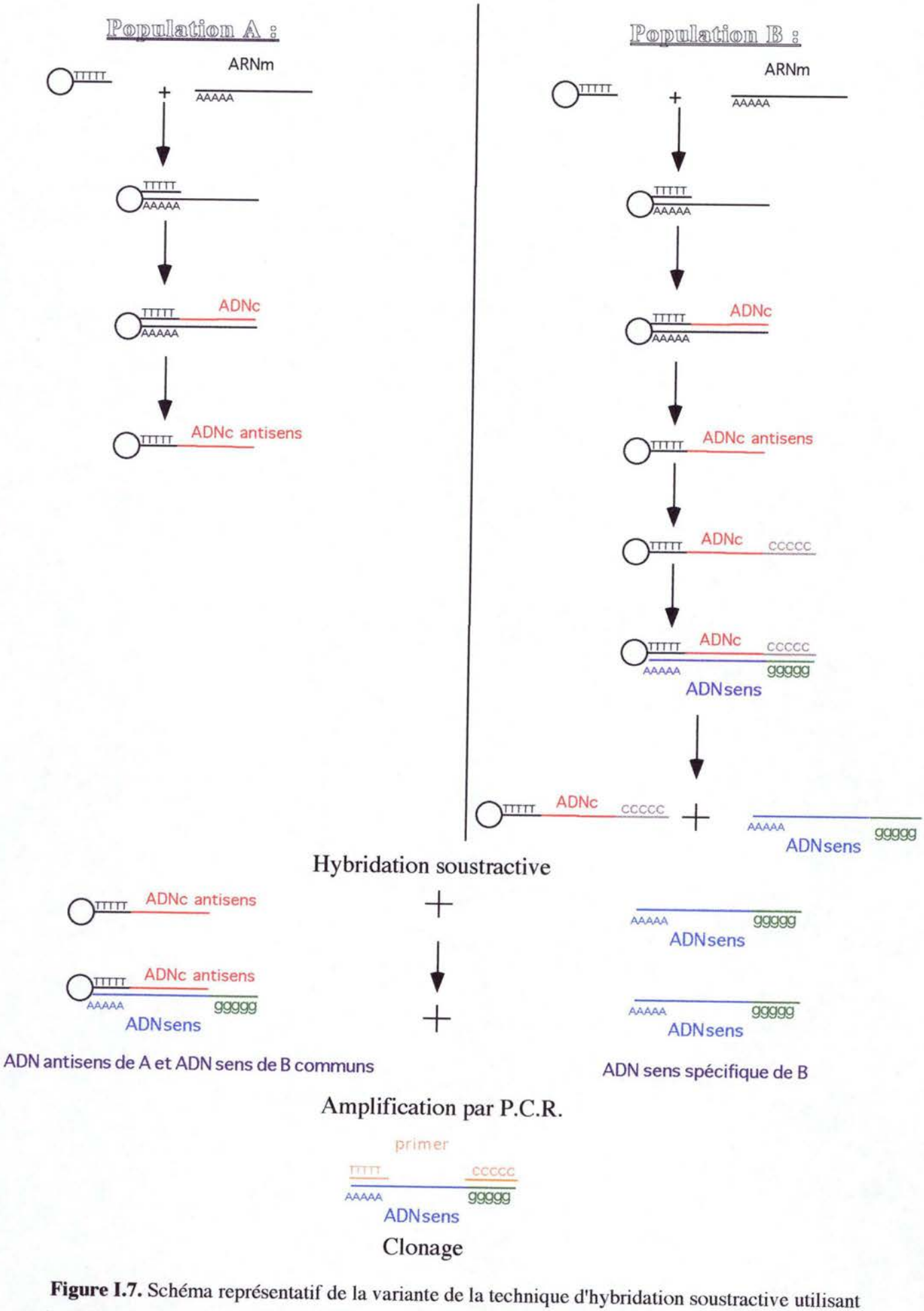


Figure I.7. Schéma représentatif de la variante de la technique d'hybridation soustractive utilisant les billes de latex proposée par Hara, E. et Campisi, J., 1994. Pour de plus amples explications, voir le texte.

restera dans le surnageant que l'ARNm spécifique des cellules cibles. Après élimination des billes portant les hybrides ADNc-ARNm communs par centrifugation, cet ARNm spécifique sera remis en présence de billes oligotex(dT)30 et de l'ADNc sera synthétisé de la même façon que précédemment. Une séquence de polydC est alors ajoutée du côté 3' de l'ADNc par l'action d'une transférase terminale. Ce qui permettra une amplification par PCR grâce à des primers polyA et polyG liés à des sites de restriction facilitant ainsi le clonage de l'ADN spécifique des cellules cibles.

Il existe une variante employant aussi des billes oligotex(dT)30 dont le principe est légèrement différent (Hara, E. et Campisi, J., 1994) (figure I.7.). De l'ADNc sur billes est synthétisé à partir de dix µg d'ARNm de chaque population cellulaire (driver et cible). On ajoute du côté 3' de l'ADNc sur billes de la population cible une séquence de polyC, ce qui permettra une amplification de cet ADNc anti-sens sur billes à partir d'un primer polyG. On obtient alors un ADN sens spécifique de la population cible. L'ADNc anti-sens sur billes de la population driver est mis en présence de l'ADN sens spécifique de la population cible. Des hybrides ADNc anti-sens de la population driver et ADN sens de la population cible communs se forment, il reste dans le surnageant l'ADN sens spécifique de la population cible (B). Cet ADN sera amplifié par PCR et cloné. L'avantage de la deuxième méthode fait passer l'ARNm de la population cible par une étape de synthèse en ADN, et l'ADN est plus facile à manipuler que l'ARN vu que ce dernier peut être dégradé très facilement par les RNases. De plus, il ne faut pas purifier à nouveau l'ARNm en cas de problème celui-ci étant copié sous forme d'ADNc.

7.1.2. Hybridation soustractive utilisant une immobilisation d'ARNm sur une membrane de nitrocellulose :

Cette technique fut employée pour différencier l'expression génétique de deux tissus différents (Maréchal, D. *et al.*, 1993).

Dans cette méthode, on synthétise tout d'abord de l'ADNc simple brin à partir de 3 µg d'ARNm du tissu d'intérêt. On fixe 10 µg d'ARNm de l'autre tissu driver sur membrane de nitrocellulose par dot blot. L'ADNc de la population d'intérêt est ensuite mis en présence d'une membrane de nitrocellulose contenant l'ARNm du driver. Après hybridation, les hybrides ADNc-ARNm communs se trouvent sur la membrane et l'ADNc simple brin spécifique se trouve dans le surnageant. Après clonage, on obtient une banque de cet ADNc d'intérêt.

L'avantage de cette technique est sa simplicité. *Les inconvénients* sont que l'hybridation sur membrane est plus longue que l'hybridation en solution et que cette méthode

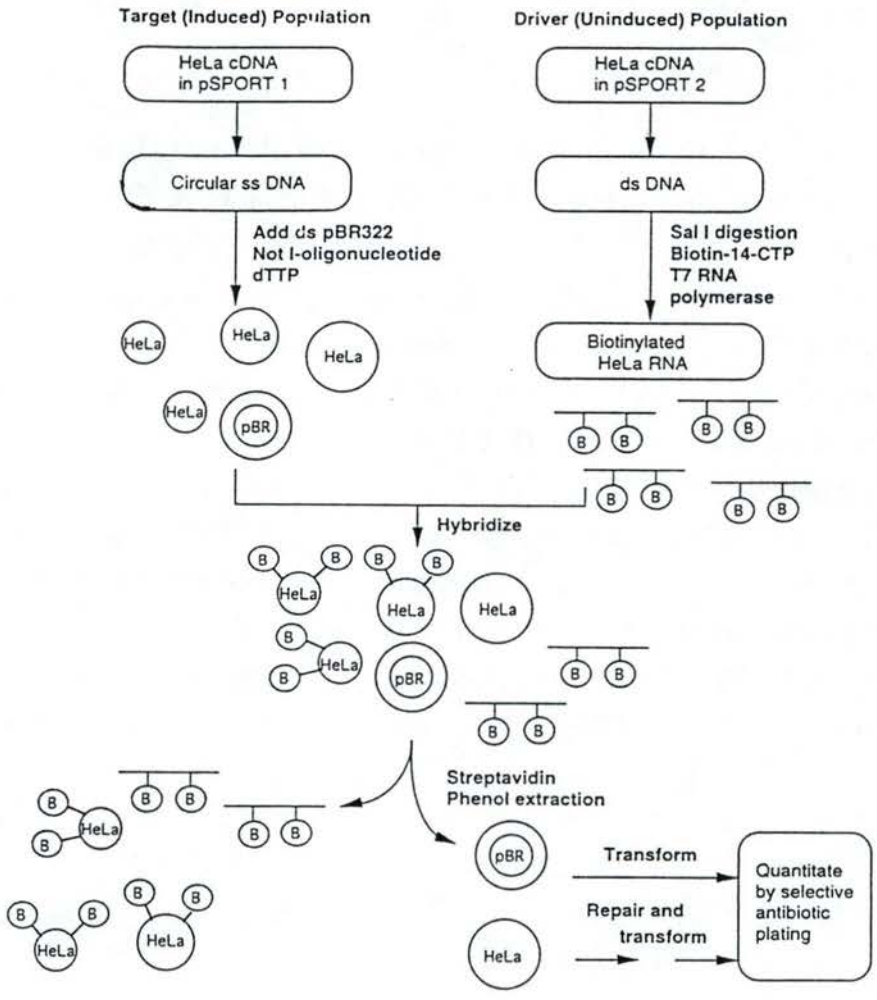


Figure I.8. Schéma représentatif de la technique d'hybridation soustractive à l'aide des vecteurs pSPORT 1 et pSPORT 2 (Gruber, C.E. *et al.*, 1994). Pour de plus amples explications, voir le texte.

demande beaucoup d'ARNm, ce qui fait qu'elle est surtout utilisée pour les tissus et non pour les cellules en culture. En effet, il faut être certain que toutes les séquences communes (ADN) se sont bien fixées sur les ARN du filtre.

7.1.3. Hybridation soustractive utilisant le système biotine-streptavidine :

Dans cette technique, 10 à 30 µg d'ARNm de la population cellulaire driver sont mélangés à de la biotine photoactivable. Après exposition à la lumière émise par une ampoule ("sunlamp"), la photobiotine forme des liens stables avec les acides nucléiques simples ou doubles brins. De l'ADNc est synthétisé à partir de l'ARNm de la population cellulaire d'intérêt (d'une quantité 10 fois moindre que l'autre population). Cet ADNc et l'ARNm biotinylé sont mis en présence l'un de l'autre. A ce moment, des hybrides ADNc-ARNm communs se forment. On ajoute ensuite de la streptavidine permettant de fixer l'ARNm marqué à la biotine ainsi que les hybrides ADNc-ARNm biotinylés. Ceux-ci seront extraits grâce à une extraction au phénol-chloroforme (ou retenu sur une colonne par chromatographie). L'ADNc simple brin non hybridé spécifique est récupéré et analysé (Sive, H.L. et St John , T., 1988; Welcher, A.A. *et al.*, 1986).

L'avantage de cette technique est que l'affinité de la biotine pour l'avidine est telle que l'on peut s'assurer de la formation d'un complexe stable, rapidement formé et spécifique.

Les inconvénients de cette technique sont qu' il y a une perte de matériel lors de l'étape de l'extraction au phénol-chloroforme et que cette méthode utilise une grande quantité d'ARNm.

7.1.4. Hybridation soustractive à l'aide des vecteurs pSPORT 1 et pSPORT 2 (figure I.8.) :

A partir de l'ARNm des cellules cibles et des cellules driver, de l'ADNc est synthétisé par transcription inverse. Ensuite, l'ADNc de ces 2 populations cellulaires est cloné dans 2 plasmides différents, pSPORT 1 et pSPORT 2. L'ARNm des cellules cibles est cloné dans le plasmide pSPORT 1 qui permet de préparer de l'ADN simple brin spécifique de ces cellules. On bloque par la suite la région polyA$^+$ de l'ADN simple brin venant de pSPORT 1 par hybridation avec un oligonucléotide polyT, ceci pour empêcher l'hybridation de l'ADNc cible pSPORT1 simple brin et de l'ARN biotinylé du driver. L'ADNc des autres cellules est cloné dans le plasmide pSPORT 2, celui-ci permet la préparation d'ADN double brin spécifique de ces cellules. On transcrit *in vitro* cet ADN en ARN que l'on biotinile grâce à l'utilisation de T7 ARN polymérase et de dCTP biotinylés. On met alors en présence l'ADN simple brin cible,

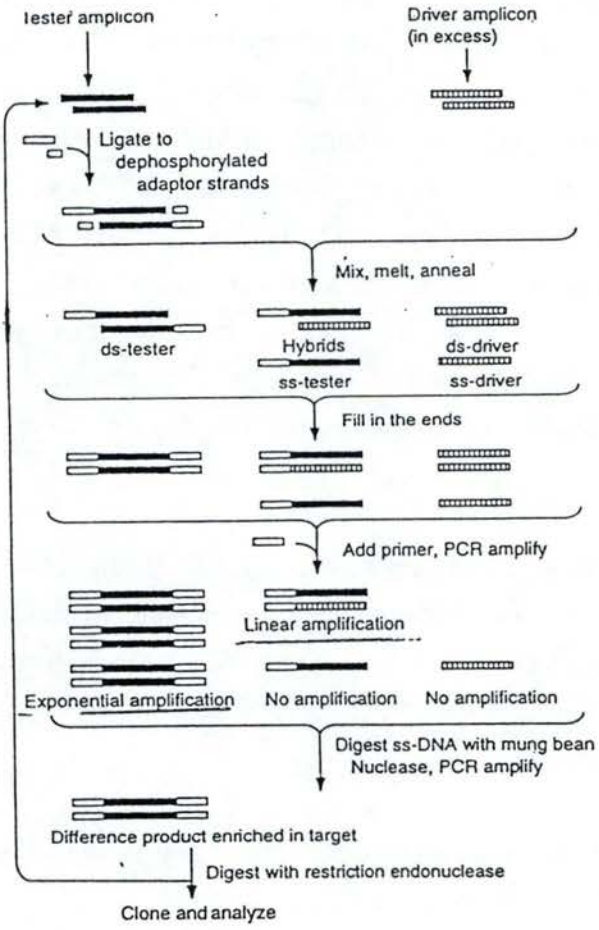


Figure I.9. Schéma représentatif de la technique d'hybridation soustractive utilisant la PCR (Lisitsyn, N. *et al.*, 1993). Pour de plus amples explications, voir le texte.

dont le polyA est bloqué, et l'ARN biotinylé de la population driver. Les séquences de l'ADN cible complémentaires à l'ARN driver biotinylé s'hybrideront à ce dernier (séquences communes) et les molécules biotinylées seront éliminées par fixation à la streptavidine suivie d'une extraction au phénol. Il reste alors l'ADNc simple brin spécifique des cellules d'intérêt. Soit on électropore ce plasmide simple brin directement, soit on construit un double brin à partir du simple brin ce qui augmente le rendement d'électroporation.

Du plasmide de pBR322 est ajouté à la préparation de l'ADN simple brin circulaire dans le but de quantifier la "soustraction" (Gruber, C.E. *et al.*, 1994).

Les avantages de cette technique sont que cette méthode est sûre, précise, spécifique et quantitative. Elle utilise peu d'ARNm, juste ce qu'il faut pour faire une banque d'ADNc. Donc il ne faut plus réextraire l'ARNm des cellules pour recommencer la soustraction. Cette méthode n'a pas les désavantages des PCR.

Les inconvénients de cette technique sont que la préparation d'une banque n'est pas toujours une expérience évidente et que cette méthode est plus lourde, plus compliquée et comprend un nombre élevé d'étapes.

7.1.5. Technique d'hybridation soustractive utlisant la PCR (figure I.9.) :

Premièrement, il faut réduire la complexité de l'ADN du tester et du driver en préparant une portion représentative de chaque génome, ce que l'on appelle un amplicon. L' ADN de départ est coupé par un ensemble d'enzymes de restriction qui coupent de façon peu fréquente, puis lié à des oligonucléotides adaptateurs et amplié par PCR. Seuls les fragments inférieurs à un kb sont amplifiés. On obtient ainsi les amplicons pour les drivers et les testers. Les adaptateurs sont enlevés par clivage et on remet des nouveaux adaptateurs seulement aux testers du côté 5' et pas aux drivers. Ensuite vient l'étape d'hybridation soustractive-amplificative, où on mélange les amplicons testers avec un excès d'amplicons drivers et on ajoute la Taq polymérase. De cette façon, seules les molécules testers "ré"hybridées avec elles-même ont un adaptateur 5' à chaque fin du duplex double brin et peuvent donc être amplifiées. L'ADN simple brin restant est digéré par une nucléase. Cette étape est répétée plusieurs fois afin d'éliminer tout ce qui est commun aux deux populations cellulaires. L'ADN cible est alors amplifié et cloné, prêt à l'analyse (Lisitsyn, N. *et al.*, 1993).

Les avantages de cette technique sont que cette méthode permet l'enrichissement des séquences cibles malgré la complexité du génome, qui demande peu de matériel de départ (10 µg d'ADN) et n'utilise pas de technique de séparation physique comme l'utilisation de colonne

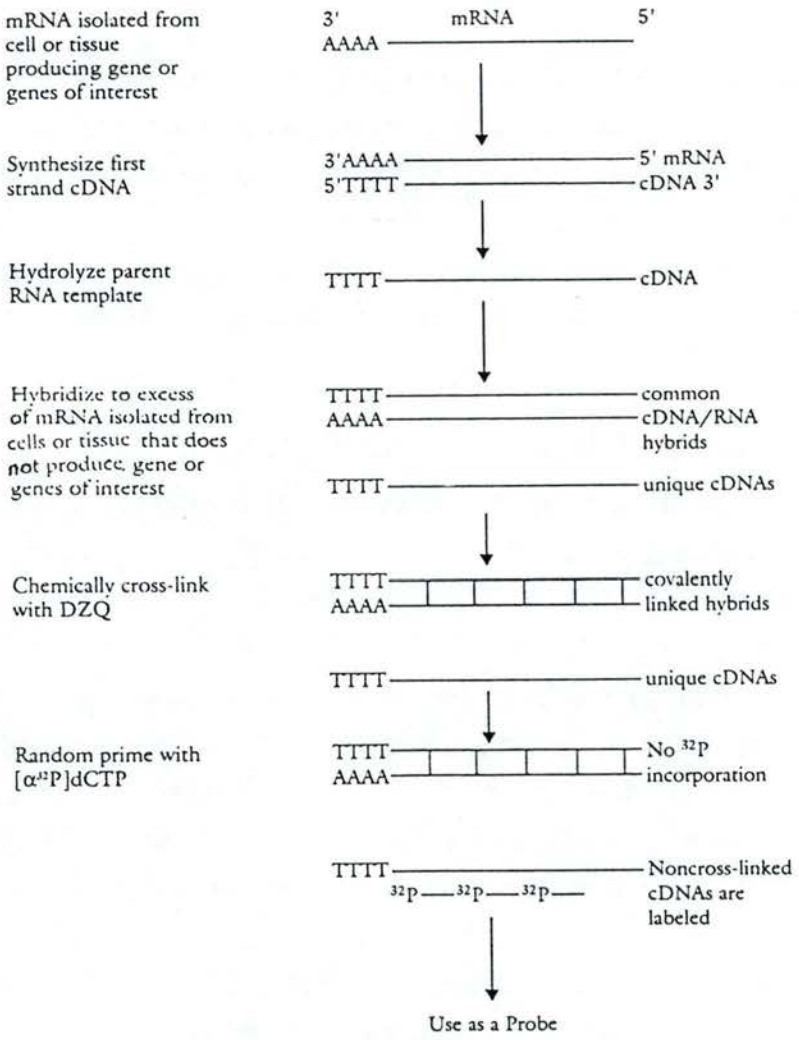


Figure I.10. Schéma représentatif de la technique d'hybridation soustractive à l'aide de liaisons chimiques (CCLS) (Hampson, I.N. *et al.*, 1994). Pour de plus amples explications, voir le texte.

de chromatographie.

Un inconvénient de cette technique est que la technique PCR peut-être une source d'artéfacts.

7.2. Autres techniques permettant de différencier deux populations de cellules :

7.2.1. Synthèse de sondes spécifiques à l'aide de liaisons chimiques (CCLS : chemical cross-linking substraction):

Le principe général de cette technique repose sur la formation d'hybrides stables par des liaisons covalentes entre de l'ADNc et de l'ARNm (figure I.10.). De l'ADNc simple brin est synthétisé à partir d'ARNm isolé des cellules exprimant le ou les gène(s) d'intéret. Après avoir hydrolysé l'ARNm ayant servi de matrice (template), l'ADNc restant est hybridé à une quantité d'ARNm, isolé des cellules, de 5 à 10 fois plus grande que celle extraite de la population cellulaire tester. Les hybrides ADNc-ARN communs sont alors liés de manière covalente avec du DZQ (2,5 diaziridinyl 1-4 benzoquinone 1, qui est un agent potentiel anti-tumeur) liant chimiquement les paires de base 5'-G-C-3'. L'étape d'hybridation est répétée un certain nombre de fois. Dans la solution se trouve à ce moment l'ARNm ne s'hybridant pas à l'ADNc, l'hybride ADNc-ARNm et l'ADNc simple brin spécifique des cellules exprimant le ou les gène(s) d'intéret. Grâce à une polymérase, la Sequenase II, une sonde sera produite à partir de cet ADNc d'intéret grâce à des primers aléatoires. La Sequenase II ne peut pas réagir avec de l'ARN, n'a pas d'activité exonucléasique et n'est pas capable de déplacer le double brin, donc ne réagit qu'avec l'ADNc simple brin (Hampson, I.N. *et al.*, 1994; Hartley, J.A. *et al.*, 1991).

L'avantage de cette méthode est qu'elle n'utilise pas une séparation physique des doubles brins des simples brins par des colonnes de chromatographie, ce qui entraîne à la fois des pertes de matériel et une séparation incomplète. L'efficacité de liaisons 5'-G-C-3' par le DZQ est de 100 % (J.A. Hartley et al., 1991); ce qui permet de dire que tous les hybrides ADNc-ARN sont liés de manière covalente. Si cela n'était pas le cas, des faux positifs pourraient apparaître.

L'inconvénient de cette technique est que l'on emploie une quantité d'ARNm de 3 à 5 µg des cellules exprimant le ou les gène(s) d'intérêt et de 10 µg d'ARNm de la population driver. Ces quantités d'ARNm peuvent facilement devenir un facteur limitant si l'on utilise des cellules cultivées.

7.2.2. Technique de différenciation utilisant une PCR avec des primers arbitraires (RAPD = Random Amplified Polymorphic DNA) :

On extrait l'ADN des deux populations cellulaires à différencier et on fait une amplification par PCR avec des primers arbitraires (primers d'environ 10 nucléotides). Ainsi en utilisant différentes paires de primers, on essaye d'amplifier tout le génome. On réalise une électrophorèse sur gel d'agarose à partir de deux banques d'ADN ainsi obtenues et on observe les différences spécifiques de chaque population par la présence ou l'absence d'une ou plusieurs bandes d'ADN en comparant les profils de migration. Ces fragments d'ADN spécifiques observés pourraient servir comme sondes pour le screening des banques de gènes et leur séquence pourrait aussi être comparée aux séquences enregistrées dans des banques de données (Murano, S. *et al.*, 1993). Cette technique est aussi applicable sur l'ARN total ou sur l'ARNm moyennant la transcription inverse.

L'avantage de cette technique est que la PCR utilise peu de matériel. Cette méthode est rapide mais la reproductibilité et l'intensité des bandes sur gel dépendent de beaucoup de paramètres différents comme la température d'hybridation des primers, la concentration en sels,...

L'inconvénient de cette technique est que ce ne sont pas des fragments entiers de gènes qui sont amplifiés.

Une variante de cette technique emploie une transcription inverse suivie d'une PCR utilisant comme primer en 5' un oligonucléotide polyT plus deux bases au hasard (par exemple : 5'-T_{11}CA) (Liang, P. et Pradee, A.B., 1992). Ce qui permet de n'amplifier que le seizième de la population totale des ARNm. Les seconds primers s'hybridant en 3' sont des primers arbitraires d'une longueur de 6 à 7 bp, ceux-ci s'attachant donc à différentes positions par rapport au premier primer. On obtiendra des fragments amplifiés de taille variable. Cette étape est suivie d'un clonage, d'un séquençage et d'une identification.

Les avantages de cette technique sont qu'elle est rapide et qu'elle utilise peu d'ARNm (1µg).

Un inconvénient de cette technique est que l'on part de l'ensemble des gènes cellulaires.

II. Objectifs

Un certain nombre d'études ont comparé les protéines ou les ARNm des cellules vieilles ou jeunes. La plupart des protéines ou des ARNm découverts sont impliqués dans le processus d'arrêt de la mitose, qui a lieu lors du passage des cellules mitotiques à des cellules post-mitotiques. Or, nous avons vu dans l'introduction que le vieillissement des fibroblastes n'est pas seulement caractérisé par cet arrêt des mitoses, mais aussi par un passage progressif par divers types cellulaires mitotiques (morphotypes MF I à MF III) puis post-mitotiques (morphotypes PMF IV à VII). Notre travail s'insère dans la recherche des protéines ou des ARNm spécifiques de chacun de ces morphotypes successifs.

Nous avons aussi vu dans l'introduction de ce travail que chaque morphotype, que l'on retrouve au cours du vieillissement des fibroblastes WI-38 et HH-8 ou *in vivo*, est caractérisé par l'expression de protéines spécifiques que ce soit lors du vieillissement cellulaire spontané ou en conditions de stress. L'identification de ces protéines est souvent rendue difficile par leur présence en très faible quantité sur les gels d'électrophorèse. Nous nous proposons donc d'analyser non plus les protéines mais les ARNm qui codent pour ces protéines. L'isolement des ARNm sera réalisé à partir de certains morphotypes obtenus lors du viellissement normal. Nous avons d'abord déterminé l'âge des cultures permettant d'obtenir des populations cellulaires contenant les proportions voulues des morphotypes, dont nous allons extraire l'ARNm.

Après l'isolement de l'ARNm de ces morphotypes, nous tenterons de soustraire tous les ARNm spécifiques d'un morphotype particulier à l'aide d'une procédure d'hybridation soustractive, choisie parmi un large choix de techniques possibles en fonction de nos contraintes expérimentales.

Ces contraintes sont premièrement que la quantité d'ARNm obtenue à partir d'une population plus ou moins homogène de fibroblastes en culture n'est pas très importante. Deuxièmement, l'obtention de populations riches en proportion du morphotype voulu et contenant suffisamment de cellules s'est révélée être une étape très longue de ce travail. Il fallait donc opter pour une technique nécessitant relativement peu de temps de manipulation pour espérer terminer le travail dans le cadre d'un mémoire.

Nous avons décidé d'employer la technique d'hybridation soustractive utilisant des billes de latex car cette technique prend théoriquement moins de temps et peut fonctionner avec des faibles quantités d'ARNm. De plus, cette technique a déjà été développée et employée par Satoh *et al.*(1994) et Hara *et al.*(1991) pour analyser un gène impliqué dans le vieillissement cellulaire *in vitro*.

A long terme, ce travail permettra de constituer des banques de gènes contenant ces fragments d'ADN spécifiques. Par cette méthodologie, les gènes impliqués dans le vieillissement seront comparés aux banques informatiques de gènes connus pour une identification possible, ou la découverte de nouveaux gènes.

Dans le cadre de ce mémoire, l'objectif du travail fut premièrement d'extraire les ARNm à partir de populations fibroblastiques d'un morphotype particulier et deuxièmement de soustraire les ARNm spécifiques d'une population cellulaire d'un morphotype particulier.

Vu les difficultés d'obtenir l'ARNm en grande quantité à partir des fibroblastes AG04432, nous avons décidé de mettre au point la technique d'hybridation soustractive utilisant des billes de latex sur un modèle expérimental simplifié. En fonction du matériel disponible, nous avons choisi de différencier l'ARNm des cellules Véro infectées par le virus BRSV à celui des cellules Véro non infectées. L'hybridation soustractive sera réalisée par du cDNA des cellules non infectées (driver) synthétisé sur bille Latex sur un mélange (cible) aux proportions connues des ARNm des cellules infectées et non infectées.

A la fin de ces soustractions, seuls les ARNm viraux devraient être présents, puisque les ARNm cellulaires seront éliminés. Les ARNm communs (cellulaires) et soustraits (viraux) seront suivis au cours de l'expérience, après chaque étape de soustraction, en utilisant comme marqueurs les gènes de l'actine des cellules Véro et le gène F du virus BRSV. Ces marqueurs pourront être détectés par la RT-PCR en employant des primers appropriés.

Dans ce modèle expérimental, les cellules Véro étant transformées, nous n'avons pas de problème lié au nombre de passages en culture. L'emploi des gènes marqueurs et de la technique RT-PCR rendrait plus facile le suivi et le contrôle de l'hybridation soustractive et permettrait de tester la sensibilité de la RT-PCR dans ce contexte expérimental en vue du clônage ultérieur dans l'étude génétique du vieillissement.

III. Matériels et méthodes

A. Techniques cellulaires :

1. Cultures de cellules :

N.B. Les produits chimiques habituels sont de chez Merck, Allemagne, sauf spécification.

1.1. Origine des fibroblastes :

Nous avons utilisé des fibroblastes de poumon qui proviennent d'explants de poumon d'un foetus humain (avortement thérapeutique) de 15 semaines. Ces cellules sont mises en culture selon la méthode classique décrite par Hayflick (Hayflick, L. et Moorehead, P.S., 1961). Ces fibroblastes (AG04432) sont fournis par le NIA Aging Cell Repository (Corriel Institute for Medical Research,NJ, USA) à la treizième génération en culture.

1.2. Milieux de culture :

-OPT : milieu de culture OPTI-MEM (Gibco, Grande-Bretagne) :
composé du milieu minimum essentiel de Eagle (MEM), du tampon HEPES (25 mM) et du bicarbonate de sodium (2,4 g/l), additionné d'hypoxanthine, de thymidine et de facteurs de croissance. De plus, nous enrichissons ce milieu avec du pyruvate de sodium 1 mM, de la L-glutamine 2 mM et du mercaptoéthanol 50 µM.

-OPT + Sérum : milieu OPTI-MEM contenant un pourcentage défini de sérum de veau foetal (PAA, Autriche).

- M : milieu de base de Eagle utilisé pour le rinçage (BME, Flow, Grande-Bretagne).

Le sérum de veau foetal est conservé à -20°C et les milieux de culture sont conservés à 4°C. Ils sont réchauffés à 37°C avant chaque utilisation.

1.3. Repiquage des fibroblastes pulmonaires :

Ces cellules sont cultivées classiquement dans des boîtes de culture de 75 cm^2 (Cel Cult, Grande-Bretagne). Lorsque les cellules arrivent à confluence, ce qui représente une densité moyenne de 80 000 cellules/cm^2 (avec un maximum de 1,2 x 10^5 cellules/cm^2), elles sont réparties en 2 ou en 4 boîtes de la manière suivante.

Après rinçage de la boîte de culture avec 10 ml de milieu M, 2 ml de trypsine sont ajoutés (trypsine : solution stérile de trypsine à 0,25 % dans une solution A Gibco (0,4 g/l KCl; 2,2 g/l $NaHCO_3$; 6,8 g/l NaCl, 1,0 g/l glucose ; 0,005 g/l rouge de phénol) (Gibco, Grande-Bretagne)). On laisse la trypsine agir pendant environ une minute à température ambiante, tout en surveillant le détachement des cellules au microscope à contraste de phase. Ensuite la trypsine est décantée et la boîte est placée à 37°C durant 10 minutes afin d'accélérer le processus de détachement des cellules.

Lorsque la grande majorité des cellules est détachée, on ajoute 10 ml de OPT + sérum 10 %, le sérum contenant des inhibiteurs de trypsine. On récupère alors les cellules en agitant le milieu avec une pipette Pasteur afin de rompre les aggrégats cellulaires et de détacher toutes les cellules.

A ce moment, deux gouttes de la suspension cellulaire peuvent être prélevées pour réaliser un comptage de cellules à l'aide d'un hématocymètre (chambre de Neubauer) (Brand, Allemagne).

On ajoute par la suite de l'OPT + sérum 10 % (30 ou 70 ml en fonction du repiquage en 2 ou en 4). Les cellules sont alors transférées dans des boîtes de culture de 75 cm^2 ou dans des boîtes multi-puits (Cel-Cult, Angleterre), par volume de 20 ml, ou par volume de 1 ml, respectivement.

De l'air contenant 5 % de CO_2 est insufflé dans le milieu de culture pour permettre au bicarbonate présent dans le milieu de tamponner le milieu à pH 7,4 environ. Les boîtes de culture sont alors mises à 37°C. Après quelques jours, si les cellules ne sont pas confluentes, un renouvellement du milieu s'impose afin de réapprovisionner les cellules en éléments nutritifs. Si les cellules sont confluentes, il convient de les repiquer à nouveau.

1.4. Congélation et décongélation des cellules :

A. Congélation :

Les cellules sont détachées de la boîte de culture suivant la méthode décrite ci-dessus. Après centrifugation à 1000 rpm pendant 10 minutes (Hettich Universal, Allemagne), le culot est resuspendu dans 0,4 ml d'OPT + Sérum 40 % et mis dans un cryotube stérile (Nunc, Danemark). Juste avant la congélation, on ajoute 0,4 ml d'OPT + DMSO 10 % (). Le DMSO est utilisé comme agent cryoprotecteur.

La congélation est réalisée grâce à un appareil à congélation (PTLD 75, L'Air Liquide, Belgique) dont la diminution de la température de congélation est programmée. La température est abaissée de 1°C par minute jusqu'à -40°C puis rapidement jusqu'à -100°C. Le cryotube contenant les cellules est ensuite stocké dans de l'azote liquide, à -196°C. Ce processus permet une conservation des cellules sans modification du nombre de divisions possibles après la décongélation.

B. Décongélation :

La décongélation est une étape rapide qui se déroule en moins de 60 secondes. L'ampoule de cellules stockée dans de l'azote liquide est immédiatement plongée dans un bain à 40°C. Une fois décongelées, les cellules sont centrifugées pendant 10 minutes à 1000 rpm (Hettich Universal, Allemagne). Le surnageant est éliminé tandis que le culot est resuspendu dans de l'OPT + sérum 10 % avant d'être transféré dans une boîte de culture de 75 cm^2. Le lendemain, le milieu est renouvelé.

1.5. Obtention des cellules post-mitotiques par culture des cellules vieilles:

Quand les fibroblastes ne se divisent plus après le repiquage, donc qu'ils arrivent à leur dernier passage, on repique les cellules à une densité de 1800 cellules / cm^2 dans une boîte de culture de 75 cm^2 (Brenneisen, P. *et al.*, 1994). On laisse les cellules dans une étuve dont l'atmosphère intérieure contient 5 % de CO_2, en changeant le milieu une fois par semaine. Les populations stationnaires de fibroblastes post-mitotiques ont été maintenues ainsi pendant plus de 120 jours. Ensuite, on observe une mortalité de plus en plus élevée au cours du temps.

1.6. Détermination des types morphologiques (morphotypes) :

Pour la détermination des morphotypes, les cellules à différents passages sont cultivées à faible densité (700 cellules/cm^2 soit 200 000 cellules par boîte) dans des boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre (Falcon, Angleterre) préalablement quadrillées à l'aide d'une aiguille montée. Après 24 heures en conditions normales, ces cellules sont fixées pendant 10 minutes dans une solution aqueuse de formaldéhyde à 3,7 % dilué dans du PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4) après deux rinçages dans du PBS. Ensuite, les cellules sont incubées dans une solution d'éthanol à 70 % v/v pendant 10 minutes. Les boîtes sont séchées à 42°C. La coloration des cellules est réalisée au Bleu de Coomassie pendant 30 secondes. Pour préparer 100 ml de ce colorant, 50 mg de Bleu de Coomassie sont ajoutés dans 100 ml de la solution suivante : acide acétique (Janssen Biochimica, Belgique) : méthanol : H_2O (v : v / 9 : 45 : 46) comme décrit par Bayreuther et al. (1988). Ce colorant est filtré sur papier Wattman avant utilisation. On rince ensuite à l'eau distillée et on laisse sécher à 40°C. Les comptages des différents morphotypes sont effectués en microscopie de phase à deux reprises par deux expérimentateurs.

2. Dosage des protéines :

2.1. Réactifs utilisés :

- Tampon PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4).
- Carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3) 2 %.
- Tartrate de sodium et potassium 2 %.
- Sulfate de Cuivre ($CuSO_4$) 1 %.
- Hydrate de sodium (NaOH) 1 N.
- Réactif de Folin-Ciocalteu dilué 2 fois.
- Albumine bovine 200 µg/ml (Sigma, USA) utilisée comme étalon.

2.2. Mode opératoire :

Après avoir rincé les cellules cultivées 2 fois avec du PBS dans des boîtes de 24 puits, les protéines cellulaires sont homogénéisées et dénaturées en incubant les cellules dans 1 ml de NaOH 0,5 N pendant 30 minutes, duquel on reprend 0,4 ml pour un dosage de protéines suivant la méthode décrite par Lowry et al. (Lowry, O.H. *et al.*, 1951). On ajoute 2 ml d'une solution composée de 1 ml de solution tartrate, 100 ml de solution Na_2CO_3 et de 1 ml de solution $CuSO_4$. La solution est incubée pendant 5 à 15 minutes maximum. Le Folin est ajouté en agitant fortement et immédiatement. A la trentième minute, on lit l'absorbance au spectrophotomètre à 660 nm. La concentration en protéines du test est calculée en utilisant la formule ci-dessous:

$$C_{test} = (A_{test} \times C_{étalon} \times dilution) / A_{étalon},$$

avec A_{test} et $A_{étalon}$ respectivement pour les absorbances test et étalon moins le blanc, et $C_{étalon}$ égal à 200µg / ml.

3. Estimation de l'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN :

Afin de déterminer à quelle concentration en sérum les cellules ne se divisent plus, nous avons réalisé un test d'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN.

3.1. Réactifs utilisés :

- Milieux OPT , OPT + sérum soit à 10 %, 0,2 %, 0,1 % ou 0,05 %, OPT + HLA 0,2 % : milieu OPTI-MEM contenant 0,2 % de solution d'hydrolysat de lactalbumine 10 % (Gibco, Grande-Bretagne).
- Milieu de rinçage M.
- Acide trichloracétique (TCA) 5 % (CH_3COOH, Farmitalia Carlo Erba, Italie).
- HCl 0,5 N, NaOH 0,5 N.
- Thymidine tritiée (NET-027 x, NEN Products, Allemagne). Activité spécifique de 20,0 Ci/mMole; à raison de 1,0 mCi/ml. On réalise un stock de 100 µCi/ml d'OPT en présence de sérum 1 % ou 10 %.
- Aqua-luma (Lumac, Pays-bas).

3.2. Culture de cellules :

Les cellules sont repiquées à 50.000 cellules par puits dans des boîtes multi-compartimentées de 24 puits (2 cm^2 / puits), (Cel-Cult, Angleterre).

24 heures après le repiquage des cellules, le milieu de culture est remplacé par 1 ml de milieu OPT contenant soit HLA 0,2 %, soit sérum 10 %, 0,2 %, 0,1 % ou 0,05 %.

Après 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 jours d'incubation dans ce milieu, les cellules sont incubées avec 5 µl de thymidine tritiée pendant 24 heures.

3.3. Dosage de l'incorporation de thymidine tritiée par la méthode "in situ" modifiée (Klagsbrun, M. et al., 1977) :

Cette étape est réalisée non stérilement. Après les incubations avec de la thymidine tritiée, les puits sont décantés et rincés 3 fois avec 1 ml de milieu M, ceci afin d'enlever la thymidine tritiée qui n'aurait pas été incorporée par les cellules. Ensuite, les cellules sont rincées 2 fois avec 2 ml de TCA 5 % par cupule et une fois avec de 2 ml d'H_2O distillée par cupule. Chacun de ces rinçages doit être réalisé délicatement afin de ne pas détacher les cellules. On récupère les cellules de la façon suivante : on ajoute 250 µl de NaOH 0,5 N par puits. Après 15 minutes, on ajoute 250 µl de HCl 0,5 N pour neutraliser. Après agitation, on prélève 400 µl de chaque cupule et les dépose dans une fiole servant à mesurer la radioactivité. On ajoute 5 ml d'Aqua Luma qui est un milieu scintillant servant à amplifier les signaux émis par la radioactivité. On agite fortement le tout et on réalise un comptage du nombre de désintégration par minute pendant trois minutes grâce à un compteur à scintillation (Beckman LS 6000 IC, Belgique).

4. Culture de cellules Véro et infection par le virus respiratoire syncytial bovin (BRSV) :

4.1. Cultures de cellules Véro :

Les cellules Véro utilisées proviennent de ATCC (American Type Culture Collection, USA). Ce sont des cellules de rein de singe vert d'Afrique adulte, conservées sous forme de

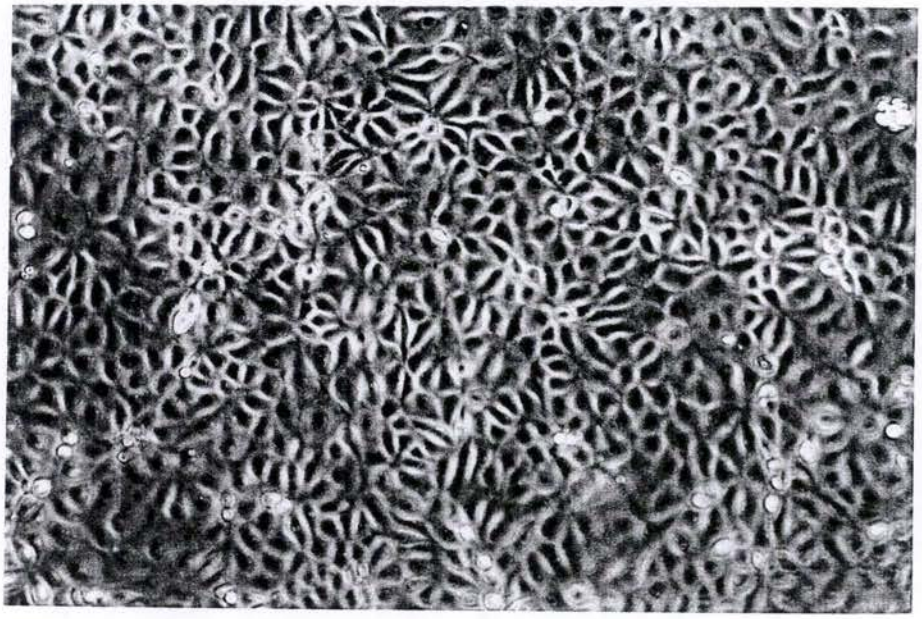


Figure III.1. Cellules Véro à confluence deux jours après un repiquage à dilution 1 / 4.

lignée continue permanente. Ces cellules nous ont été gracieusement fournies dans les meilleures conditions par le Laboratoire d'Immunologie du Professeur J.J. Letesson des FUNDP de Namur.

4.1.1. Réactifs utilisés :

- Milieu DMEM : (Dulbeco's modified Eagle Medium, Gibco, Grande-Bretagne)
milieu de culture composé de 4,5 g de glucose / l, auquel sont ajoutés des antibiotiques (solution de 100 unités / ml de pénicilline et 100 µg / ml de streptomycine; Gibco, Grande-Bretagne).

- DMEM + Sérum : milieu de culture contenant un pourcentage défini de sérum de veau foetal (Gibco, Grande-Bretagne)

- Trypsine + EDTA : solution stérile de trypsine 0,25 % et EDTA 0,02 % préparée dans une solution saline modifiée de Puck (Gibco, Grande-Bretagne).

-Milieu de rinçage : milieu DMEM sans sérum.

Les solutions de trypsine et de sérum de veau foetal sont conservées à -20°C et tous les autres milieux à 4°C. Ils sont réchauffés à 37°C avant chaque utilisation.

4.1.2. Mode opératoire:

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture de 175 cm^2 (Falcon, Angleterre). Lorsque les cellules sont confluentes, ce qui représente une densité moyenne de 1,15 x 10^5 cellules / cm^2 (figure III.1.), on les repique en 4 ou en 8 de la manière suivante. Après rinçage de la boîte de culture avec 20 ml de milieu de rinçage, on ajoute 5 ml de trypsine / EDTA qu'on laisse agir à 37°C pendant 5 à 10 minutes, tout en surveillant le détachement des cellules au microscope à contraste de phase. Lorsque la grande majorité des cellules est détachée, on ajoute 20 ml de milieu DMEM + 10 % de sérum, on les récupère dans un tube stérile, et on centrifuge à 1000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est alors enlevé et le culot est resuspendu dans 8 ml ou 4 ml de milieu DMEM + sérum 10 % (pour les repiquer en 8 ou en 4), tout en agitant le milieu avec une pipette Pasteur afin de rompre les aggrégats cellulaires. On reprend 1 ml de cette solution par boîte de 175 cm^2. On ajoute ensuite 50 ml de milieu DMEM + sérum 10 %. Les boîtes sont placées à 37°C dans l'étuve à 5 % de CO_2.

4.2. Infection des cellules Véro par BRSV :

Le virus respiratoire syncytial bovin est un des principaux agents responsables des infections des voies respiratoires inférieures des jeunes bovins. Ce virus est classé dans la famille des Paramyxoviridae, dans le genre Pneumovirus. C'est un virus enveloppé à ARN linéaire. 93 % de cet ARN est simple brin et de polarité négative. Les 7 % restants forment les régions Leader et Trailer du génome viral. D'une taille d'environ 15 kilobases, le génome viral code pour 10 protéines distinctes, qui sont traduites durant l'infection virale. Une des 2 protéines de l'enveloppe, la protéine de fusion F, permet principalement la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule cible. L'entrée de la nucléocapside et du matériel génétique viral peut alors avoir lieu. En outre, elle entraîne la formation de syncitia entre les cellules ainsi infectées. La protéine F, active, se présente sous forme de deux sous-unités provenant du clivage dans la cellule infectée de la protéine précurseur F_0 de 70 kilodaltons (KDA) N-glycolisée. Ces deux sous-unités, F1, d'un poids moléculaire (PM) estimé de 48 kDa, et F2, d'un PM estimé de 22 kDa sont reliées entre elles par des ponts disulfures (McIntosh, K. et Chanock, R.M., 1990).

4.2.1. Réactifs utilisés :

Le virus utilisé est nommé RB94 et provient d'une souche bovine trouvée par Wellemans à l'INRV (Institut National de Recherches Vétérinaires, Uccle, Belgique).

4.2.2. Mode opératoire :

Lorsque les cultures de cellules Véro arrivent à confluence, le milieu est décanté. Ces cellules sont rincées avec du milieu de rinçage et on ajoute 8 ml de virus dont le titre viral est de 10^5 / ml et 12 ml de milieu DMEM + 2 % de sérum. Après une nuit d'infection, on enlève le milieu et on ajoute 40 ml de milieu DMEM + sérum 2 % dans les boîtes de culture.

4 jours après l'infection, on extrait l'ARNm de ces cellules infectées et en parallèle des cellules Véro non infectées, elles-mêmes mises dans 40 ml de milieu DMEM + sérum 2 % pendant 4 jours.

B. Techniques de biologie moléculaire :

1. Extraction d'ARN total :

De manière générale, les brins d'ARN sont plus difficiles à manipuler que les brins d'ADN parce qu'ils sont très rapidement détruits par les ribonucléases (RNases). Celles-ci sont extrêmement actives et très résistantes aux conditions physico-chimiques généralement inhibitrices pour la plupart des enzymes. Tout travail sur l'ARN doit donc être effectué en conditions ne permettant pas la présence de RNases (conditions dites RNase-Free, c'est-à-dire en employant des solutions RNase-Free et en portant des gants).

1.1. Réactifs utilisés :

- PBS : Tampon phosphate 10 mM stérile additionné de NaCl 0,9 %(pH 7,4).

- Trizol^{TM} : (Gibco, Grande-Bretagne).
  Cette solution commerciale permet l'isolation de l'ARN de cellules en culture ou de tissus en une étape. Elle consiste en une solution monophasique de phénol et de guanidine isothiocyanate. Cette méthode est une dérivée de la méthode d'isolation en une seule étape dévelopée par Chomczynski et Sacchi (Chomczynski, P. et Sacchi, N., 1987). Pendant la lyse et l'homogénéisation de l'échantillon, le Trizol maintient l'intégrité de l'ARN, tout en lysant les cellules et en dissolvant les composants cellulaires.

- Chloroforme, isopropanol, éthanol 75 % v/v.

- SDS : Sulfate de sodium dodécyl ($C_{12}H_{25}NaO_4S$). Une solution stock de SDS 10 % est préparée avec de l'eau désionisée.

- H_2O RNase-Free :
  H_2O déionisée traitée au DEPC (diéthylpyrocarbonate, $C_6H_{10}O_5$, Janssen Chimica, Belgique). Pour traiter l'H_2O au DEPC, incuber l'H_2O avec 0,1 % de DEPC pendant une nuit sous hotte.
  Le lendemain, on autoclave pendant 15 minutes à 120°C. Ce traitement enlève les traces de DEPC restantes, qui pourraient modifier les résidus purines de l'ARN par carboxyméthylation.

- Agarose : (Ultra Pure Grade Agarose, Bio Rad, Belgique).

- MOPS 10 x concentré (pH 7) :

(acide 3-(morpholino)-propanesulfonique, Sigma, USA).
Solution comprenant du MOPS 0,2 M de l'acétate de sodium 0,05 M et de l'EDTA 0,01 M. Cette solution est autoclavée pendant 15 minutes à 120°C et stockée à l'abri de la lumière.

-ESB (Electrophoresis Sample Buffer) :

Tampon pour échantillon d'électrophorèse composé de:
- Formamide 0,75 ml (Sigma, USA).
- MOPS 10x 0,15 ml (Sigma, USA).
- Formaldéhyde 0,24 ml (Fluka, Suisse).
- Glycérol 0,1 ml.
- Bleu de Bromophénol (0,1g / ml) 0,08 ml (Janssen Chimica, Belgique).
- H_2O 0,1 ml.

- Bromure d'éthidium 500 µg/ml : (Sigma, USA).

Tout le matériel utilisé doit être RNase-Free et la manipulation doit se faire avec des gants pour éviter toute contamination par des RNases.

1.2. Mode opératoire :

1.2.1. Rinçage des cellules :

Les cellules se trouvant dans des boîtes de culture sont rincées 2 fois avec du PBS à température ambiante.

1.2.2. Homogénéisation des cellules :

La lyse cellulaire se fait directement dans la boîte de culture en ajoutant 1 ml de Trizol par 10 cm^2 de superficie de boîte de culture. Une quantité insuffisante de Trizol peut entraîner une contamination de l'ARN par de l'ADN. Les homogénats cellulaires sont passés plusieurs fois à travers une pipette Pasteur et on laisse incuber la boîte à plat pendant une dizaine de minutes tout en agitant de temps en temps. Après ces dix minutes, on enlève la solution contenant l'homogénat cellulaire et on le met dans un tube à centrifuger Corex de 30 ml (Corex, USA) préalablement nettoyé avec du SDS 1 %, rincé avec de l'H_2O RNase Free et mis au four à 180°C pendant 8 heures. On laisse l'homogénat à température ambiante pendant 5 minutes afin de permettre la dissociation complète des complexes nucléoprotéiniques.

1.2.3. Phase de séparation :

Du chloroforme est ajouté à raison de 0,2 ml pour 1 ml de Trizol utilisé pour l'homogénéisation initiale. On agite la solution vigoureusement pendant 15 secondes et on la laisse incuber à température ambiante pendant 2 à 3 minutes. On centrifuge à 12.000 g pendant 20 minutes à 4°C dans une centrifugeuse Sorvall (Sorvall RC 5B, refrigerated superspeed centrifuge, Dupont), à rotor basculant HB4. Après centrifugation, la solution est séparée en une phase phenol-chloroforme rouge, dans le fond du tube, en une interphase et en une phase aqueuse supérieure incolore. La phase supérieure, contenant l'ARN, est récupérée et placée dans un autre tube Corex.

1.2.4. Précipitation de l'ARN :

L'ARN est précipité par de l'isopropanol à raison de 0,5 ml pour 1 ml de Trizol de départ. Après mélange, cette solution est incubée pendant 20 minutes à température ambiante. On centrifuge à 12000 g pendant 20 minutes à 4°C dans la centrifugeuse Sorvall avec le rotor HB4. On enlève le surnageant.

1.2.5. Lavage de l'ARN :

Le culot d'ARN est lavé avec de l'éthanol 75 % froid à raison de 1 ml pour 1 ml de Trizol. On mélange l'échantillon en agitant fortement au vortex et on centrifuge à 7500 g pendant 30 minutes à 4°C dans la centrifugeuse Sorvall avec le rotor HB4. On enlève le surnageant.

1.2.6. Dissolution de l'ARN :

On sèche le culot d'ARN sous vide pendant 5 minutes tout en sachant qu'il ne faut pas que le culot soit trop sec, car la dissolution de l'ARN sera alors plus difficile. De suite, le tube Corex est mis sur glace (à 4°C). Le culot est redissout dans de l'H_2O RNase-Free. La quantité d'H_2O ajoutée varie en fonction de la quantité d'ARN présent dans le culot.

1.2.7. Estimation de la quantité d'ARN :

L'estimation de la quantité d'ARN se fait par lecture de l'absorbance des acides nucléiques à 260 nm au spectrophotomètre (Ultraspec II, LKB Biochrom, Suède). La cuvette utilisée pour la mesure (et pouvant contenir 50 µl) est lavée au mélange chromique et rincée plusieurs fois à l'H_2O distillée et à l'H_2O RNase-Free pour éviter toute contamination de RNase.

Un échantillon d'ARN dilué 50 x est préparé (si le matériel est trop concentré, on l'incube pendant 10 minutes à 55°C avant de prélever un aliquot) afin de lire son absorbance. On lit l'absorbance à 260 nm et 280 nm, le blanc est fait avec de l'H_2O. Le rapport de l'absorbance obtenue à 260 nm sur celle obtenue à 280 nm, doit être compris entre 1,6 et 1,9. Des valeurs en dehors de ces limites peuvent refléter une mauvaise préparation ou une trop grande concentration d'ARN. La concentration en ARN est calculée tout en sachant qu'une densité optique égale à 1 à 260 nm correspond à 40 µg d'ARN / ml.

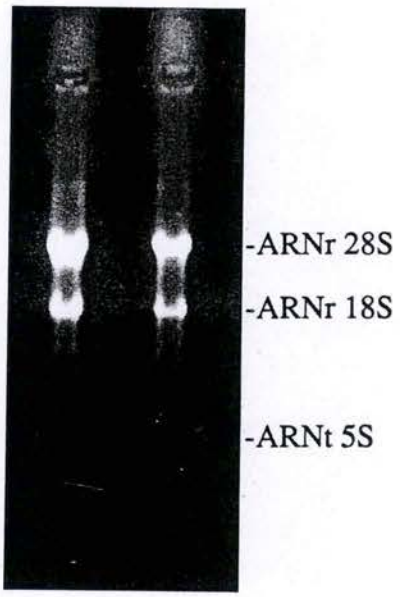


Figure III.2. Electrophorèse d'ARN sur gel d'agarose 1 %. Les échantillons d'ARN colorés au bromure d'éthidium sont déposés sur un gel d'agarose dénaturant afin de vérifier la qualité de l'ARN. Nous observons deux bandes principales d'ARN ribosomal d'environ 5 kilobases (ARNr 28 S) et d'environ 2 kilobases (ARNr 18S), et une bande d'ARN de transfert compris entre 0,1 et 0,3 kilobases (ARNt5S), presque pas visible ici.

1.2.8. Estimation de la qualité de l'ARN sur gel d'agarose :

Un échantillon d'ARN coloré au bromure d'éthidium (et en présence de 5 volumes de ESB) est déposé sur gel d'agarose 1 %, dénaturant pour savoir si l'ARN n'est pas dégradé. S'il n'est pas dégradé, on observe deux bandes principales d'ARN ribosomal d'environ 5 kilobases (kb) (ARN 28 S) et d'environ 2 kb (ARN 18 S), et un bande d'ARN de transfert compris entre 0,1 et 0,3 kb (ARNt 5 S) (figure II.2.). Si l'ARN est dégradé, une traînée est observée sur le gel d'agarose.

Pour la préparation du gel d'agarose, il faut premièrement laver la cuve à électrophorèse avec du SDS 1 %, la rincer et la laisser une nuit dans du SDS 1 à 2 % afin d'éliminer toute contamination de RNase. Le lendemain, la cuve à électrophorèse est rincée abondamment avec de l'H_2O RNase-Free. Un gel d'agarose 1 % est préparé. Pour un gel de 100 ml, dissoudre 1 g d'agarose dans 86 ml d'H_2O RNase-Free et 10 ml de MOPS 10 x concentré, porter à ébullition pour dissoudre le tout. Quand la température est redescendue à 65 °C, on ajoute 4 ml de formaldéhyde 37 %. On coule cette préparation dans la cuve à électrophorèse munie d'un peigne et on la laisse refroidir pendant une heure. On enlève le peigne et on ajoute un tampon MOPS 1 x pour permettre la migration des échantillons réalisée par le champ électrique.

Un échantillon d'ARN (1 à 10 µg d'ARN dilué dans H_2O distillée, estimée par mesure de la densité optique) est préparé en ajoutant 5 volumes de ESB. Cet échantillon est chauffé à 65°C pendant 15 minutes pour dénaturer l'ARN et mis de suite sur glace pour figer l'ARN. 1 µl de bromure d'éthidium à 1 mg / ml est ajouté. L'échantillon est déposé sur le gel. La tension électrique est fixée à 80 Volts pendant 5 minutes puis à 100 Volts pendant plus ou moins une heure. On observe les résultats sous une lampe à U.V.

2. Extraction d'ARNm :

La fraction d'ARNm représente 1 à 5 % de l'ARN cellulaire total. Cette fraction dépend du type cellulaire et de l'état physiologique des cellules. Il y a environ 500 000 ARNm par cellule de mammifère, dont 10 000 à 30 000 comportent une séquence différente.

La majorité des ARN messagers eucaryotiques possèdent une séquence polyadénilique du côté 3'. Cette caractéristique est mise à profit pour les purifier par affinité avec un oligonucléotide polydT.

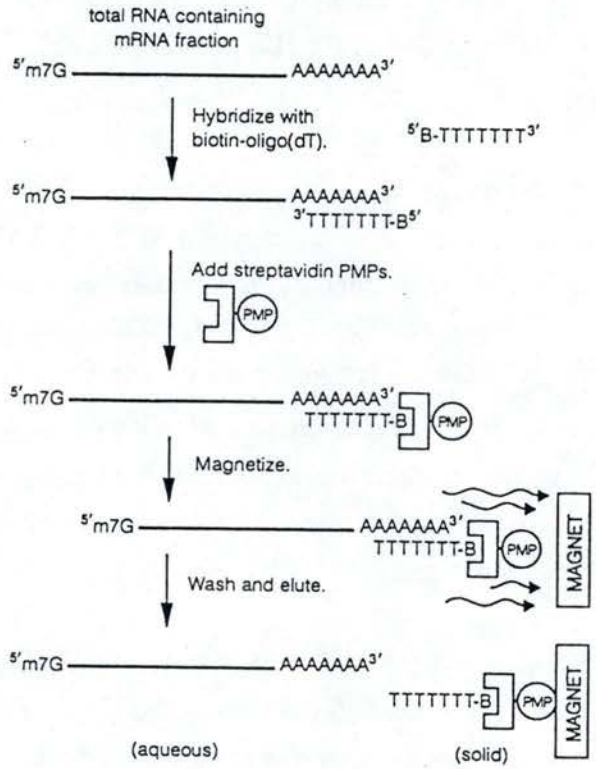


Figure III.3. Schéma représentatif de l'extraction d'ARNm employant le kit PolyAtract mRNA Isolation Systems. Pour de plus amples explications, voir le texte.

On emploie le kit PolyAtract mRNA Isolation Systems (PolyA Tract Systems III, Promega, Etats-Unis), servant à l'isolation de petites quantités d'ARNm à partir de 1 mg ou moins d'ARN total. Ce système utilise un primer oligo(dT) biotinylé qui s'hybride en solution à la région polyA situé en 3' de la plupart des ARNm eucaryotiques matures. Cette région polyA est un homopolymère de 20 à 250 adénosines. Les hybrides ARNm-oligod(T) biotinylés sont fixés par de la streptavidine couplée à des particules paramagnétiques, le tout attiré par un statif de séparation magnétique. L'ARNm est lavé puis élué de la phase solide par simple addition d'eau déionisée RNase-free, donc par abaissement de la force ionique (figure III.3.).

2.1. Réactifs utilisés :

- Kit PolyAtract mRNA Isolation Systems (PolyA Tract Systems III, Promega, Etats-Unis).

- SSC 20 x, composition de la solution 20X SSC (pour 500 ml) :

  87,7 g NaCl 3 M et 44,1 g citrate de sodium 0,3 M.
  Pour préparer cette solution, dissoudre ces sels dans 400 ml d'eau distillée, ajuster à pH 7,2 avec du NaOH, porter au volume de 500 ml et stériliser par autoclavage (20 minutes à 120°C).

- OligodT biotinylés. Ils se trouvent à une concentration de 50 pmoles/µl dans de l'eau.

- Streptavidine couplée aux particules paramagnétiques. Ces particules se trouvent dans du PBS contenant 1 mg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA) et 0,02 % d'azide de sodium.
  N.B. Tout le matériel utilisé est stérilisé et doit être RNase-Free.

2.2. Mode opératoire :

2.2.1. Hybridation de l'oligonucléotide polyT biotinylé :

Dans un tube Eppendorf stérile, on porte de 0,1 à 1,0 mg d'ARN total à un volume de 500 µl avec de l'H_2O RNase-Free. On place ce tube à 65°C pendant 10 minutes afin de dénaturer l'ARN. On ajoute de suite 3 µl de l'oligo(dT) biotinylée et 13 µl de 20 x SSC. On mélange doucement et on laisse à température ambiante jusqu'à ce que cette solution soit complètement refroidie. L'hybridation se fait pendant le refroidissement, ce qui demande

environ 10 minutes. On prépare 1,2 ml de 0,5 x SSC stérile et 1,4 ml de 0,1 xSSC dans des tubes RNase-Free.

2.2.2. Lavage des particules paramagnétiques fixées à la streptavidine (SA-PMPs) :

On resuspend les SA-PMPs en donnant des petits coups sur le fond du tube jusqu'à ce quelles soient complètement dispersées. On les capture en plaçant le tube les contenant pendant environ 30 secondes dans un statif paramagnétique. On enlève alors le surnageant prudemment et on lave trois fois ces SA-PMPs avec une solution de 0,5 x SSC (300 µl par lavage). Entre chaque rinçage, on recapture les SA-PMPs avec le statif paramagnétique et on enlève le surnageant. On resuspend ensuite les SA-PMPs lavées dans 0,1 ml de la solution 0,5 x SSC.

2.2.3. Capture et lavage des hybrides oligodT -ARNm :

Le contenu entier des ARNm hybridés est ajouté aux polyT biotinylés dans le tube contenant les SA-PMPs lavés, ce tube est mélangé. On laisse à température ambiante pendant 15 minutes. Le statif paramagnétique est utilisé pour capturer les SA-PMPs auxquelles sont fixés les hybrides ARNm-oligodT. Ces particules sont lavées 4 fois avec la solution de 0,1 x SSC (300 µl par lavage), ceci sans perturber les particules SA-PMPs. Au dernier lavage, le surnageant (solution de lavage) doit-être tout enlevé pour éliminer toute trace de la solution saline.

2.2.4. Elution de l'ARNm :

Pour éluer l'ARNm se trouvant sur les SA-PMPs, on resuspend en mélangeant ces particules dans 100 µl d'H_2O RNase-Free, et on laisse incuber pendant 5 minutes. On capture de nouveau les SA-PMPs et on transfère le surnageant, contenant les ARNm, dans un nouveau tube Eppendorf. On répète cette élution avec 150 µl de H_2O RNase-Free. L'ARNm se trouve dans un volume final de 250 µl.

2.2.5. Analyse de l'échantillon par spectrophotométrie :

La détermination de la concentration et de la pureté de l'ARNm peut être réalisée par spectrophotométrie (Voir le point 4.2.7). L'ARNm pur peut avoir un rapport A_{260}/A_{280} compris entre 1,8 et 2. Quand l'ARNm est isolé à partir de moins de 1 mg d'ARN total, la quantité attendue est telle que la lecture de l'absorbance est lue directement sans dilution préalable de l'échantillon. A ce moment, il faut être certain que la cuvette est RNase-Free. Après la lecture, l'échantillon est placé dans un nouveau tube RNase-Free pour plus de précautions.

3. Analyse d'amorces (primers) :

Nous avons utilisé le logiciel Oligo 4, afin d'obtenir des primers ayant des paramètres optimaux comme la température d'hybridation (température à laquelle 50 % des acides nucléiques sont hybridés en duplexe avec leur brin complémentaire), l'énergie libre de liaison (un duplexe d'ADN est stable quand cette énergie libre ΔG est négative), l'empêchement de formation de duplexes entre primers et de structures en épingle à cheveux (hairpin) à l'intérieur d'un même primer,...

4. Réactions de restriction :

Les enzymes de restriction sont des endonucléases coupant l'ADN double brin à un site défini en reconnaissant une courte séquence de nucléotides spécifique à chaque enzyme de restriction. La plupart des enzymes de restriction reconnaissent une séquence palindromique de 4 à 6 paires de bases. Il y a deux types d'enzymes, celles qui coupent chaque brin au centre de cette séquence générant des bouts francs ou celles qui coupent chaque brin à quelques nucléotides de distance générant des bouts protrudants. Nous avons utilisé ce dernier type d'enzyme pour identifier les gènes à analyser.

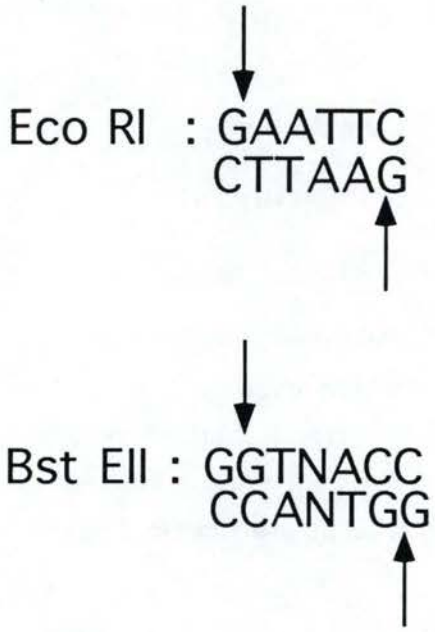


Figure III.4. Sites de restriction des enzymes Eco RI et Bst EII.

4.1. Réactifs utilisés :

- Enzyme de restriction Bst EII et Eco RI (Boerhinger, Allemagne). Les enzymes travaillent à une température optimale de 60 °C et de 37°C, respectivement. Les sites de restriction spécifiques des enzymes de restriction BstE II et EcoR I sont indiqués à la figure III.4.

- Tampon de restriction, spécifique de l'enzyme utilisée, afin qu'elle ait une activité optimale. Ici, les tampons requis sont le tampon B pour l'enzyme de restriction Bst EII et H pour l'enzyme de restriction Eco RI (Boerhinger, Allemagne).

4.2.Mode opératoire :

La recherche des sites uniques dans un fragment d'ADN dont la séquence est connue et des enzymes à utiliser est réalisée à partir de la carte de restriction de ce fragment analysée par le logiciel DNA Strider.

La restriction de l'ADN est faite dans un volume final de 25 µl et est composé de :

-ADN à restreindre :	x µl
-Tampon de restriction (10 x) :	2,5 µl
-Enzyme de restriction :	1-2 unités
-H2O :	quantité pour atteindre 25 µl final

La restriction dure de 1 à 2 heures à la température optimale pour la réaction enzymatique.

Les échantillons restreints sont alors analysés sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium ou peuvent être stockés à -20°C en attendant.

5. Purification d'un fragment d'ADN à partir d'un gel d'agarose:

Pour purifier de l'ADN à partir d'un gel d'agarose préparatif, nous avons utilisé le kit GeneClean II^{TM} (BIO 101, USA). Ce kit utilise la propriété d'une résine de silice (Glass milk^{TM}) de s'absorber aux acides nucléiques dans certaines conditions de salinité. Ce kit va nous permettre d'enlever et de purifier de l'ADN d'un gel d'agarose.

5.1. Réactifs utilisés :

- Solution NaI saturée (6 M).

- Solution de modification du tampon TBE (utilisé seulement si le gel d'agarose a été préparé avec du TBE, composition à la page 55).
  Résine Glass-milk : solution composée d'une matrice de silice dans de l'H_2O.

- Solution de lavage "NEW" :

  - Solution Kit 7 ml (solution de NaCl, Tris et EDTA);
  - Ethanol absolu 165 ml;
  - Eau distillée 140 ml.

5.2. Mode opératoire :

On excise la partie du gel d'agarose préparatif contenant la bande d'ADN intéressante visualisée sous U.V. Il faut déterminer approximativement le volume de gel récupéré. En fonction de celui-ci, on ajoute 4,5 volumes d'une solution de NaI saturée et un demi volume de TBE modifié. On incube à 45-55°C jusqu'au moment où tout l'agarose est fondu (environ 5 à 10 minutes plus tard). Ensuite, on ajoute 20 µl ou 10 µl de la solution de glass-milk^{TM} selon que l'on a plus ou moins de 5 µg d'ADN.

On incube pendant 5 minutes sur glace. On centrifuge pendant 15 secondes et on élimine le surnageant.

Le culot est lavé trois fois avec la solution de lavage "NEW". On resuspend le culot dans 200 à 700 µl (10-35 volumes) de solution de lavage. On centrifuge pendant 15 secondes et on élimine le surnageant.

Pour éluer l'ADN du glass-milk^{TM}, on resuspend le culot dans 20 µl d'H_2O. Cette solution est incubée pendant 2 à 3 minutes à 45-55°C. On centrifuge pendant 30 secondes et on récupère le surnageant.

On élue une seconde fois pour récupérer l'ADN qui resterait dans le culot de glass-milk. Les deux fractions éluées sont rassemblées et conservées à -20°C.

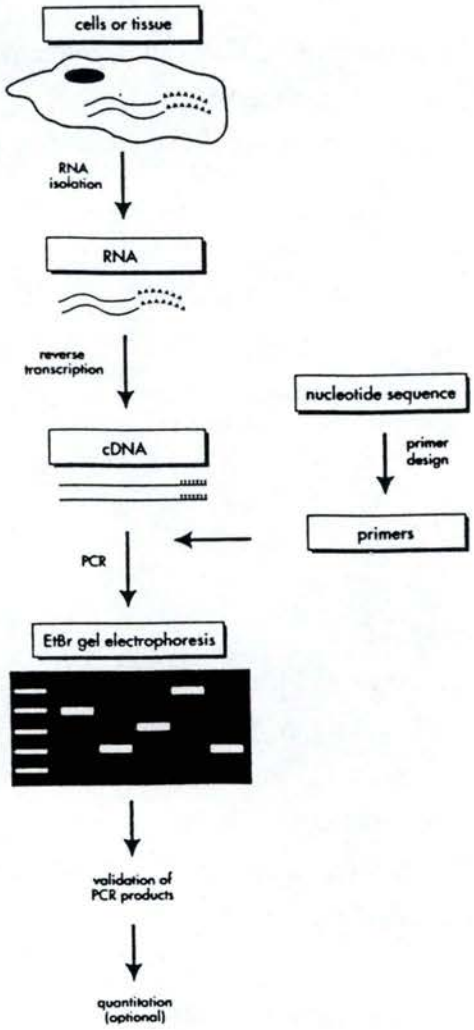


Figure III.5. RT-PCR : transcription inverse suivie d'une amplification par PCR. Pour de plus amples explications, voir le texte.

6. Transcription inverse suivie d'une amplification par PCR (RT-PCR):

Cette technique permet de mettre en évidence de très petites quantités d'un ARNm particulier. Elle consiste en la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) du brin d'ARNm à détecter. Ensuite ce brin d'ADNc servira de matrice pour la synthèse du deuxième brin et ces deux brins seront amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR) (figure III.5.).

6.1. Transcription inverse :

La transcription inverse se fait à l'aide d'une enzyme, la transcriptase inverse. La transcriptase inverse catalyse la réaction de polymérisation de l'ARN ou de l'ADN en son brin d'ADN complémentaires, à condition de fournir au système un primer de quelques dizaines de bases complémentaire à la région 3' terminale de l'ARNm. La transcriptase inverse possède aussi une activité RNase H qui consiste en la destruction des séquences d'ARN dans les hybrides ARN-ADN.

6.1.1. Réactifs utilisés :

- Tampon TMK d'hybridation selon Kuribayashi-Ohta, K. *et al.*, 1993 :
  - 5 mM Tris HCl (pH = 8,3);
  - 10 mM KCl;
  - 1 mM $MgCl_2$.
- Transcriptase inverse du virus de myéloblaste aviaire (Avian Myeloblastosis Virus (AMV-RT)) (Stratagene, USA; Promega, USA; Boerhinger, Allemagne).
- Tampon AMV-RT .
- Mélange de nucléotides (dNTP) 10 mM (Boerhinger, Allemagne; Promega, USA).
- dATP marqué au ^{32}P (3000 Ci / mmole) (Dupont, USA).
- Inhibiteur de RNases (Amersham, UK; Boerhinger, Allemagne).
- BSA 20 mg / ml (Boehringer, Allemagne).

- H_2O traitée au DEPC.

- Oligo(dT)30-latex (Qiagen, Allemagne). Ce sont des particules sphériques de latex de diamètre uniforme de 1,1 µm. Des oligonucléotides poly(dC)$_{10}$(dT)$_{30}$ sont liés à ces particules de façon covalente par les groupes carboxyles à la surface des particules grâce à une réaction de condensation entre le premier résidu aminé des particules polymères et le résidu aminé de la première cytosine du poly(dC)$_{10}$(dT)$_{30}$.

Composition de la suspension oligotex-dT (10 %) (fournie dans le kit) :

-Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM;
-NaCl 500 mM;
-EDTA 1 mM;
-SDS 0,1 %;
-NaN_3 0,1 %.

- Tampon TE (pH 7,5) composé de :

10 mM Tris-HCl pH 7,5;
1 mM EDTA pH 7,5.

6.1.2. Mode opératoire :

A. Transcripton inverse en solution :

L'échantillon d'ARNm à utiliser est mis dans un tube RNase-Free. Cet échantillon est mis à bouillir pendant 4 minutes pour le dénaturer, et ensuite il est directement mis sur glace.

Les composants suivants sont ajoutés dans ce tube :

- Tampon AMV-RT en concentration finale, composé de :

- 10 mM de Tris-HCl, pH 8,3 à 42°C;
- 50 mM de KCl;
- 25 mM de $MgCl_2$.

- Mélange de dNTP (10 mM de chaque).

- Oligo 3' 100 pmoles.

- Inhibiteurs de RNase : 40 unités.

- AMV-RT : 40 unités.

- H_2O RNase-Free pour mettre à volume final de 20 µl.

Le tube est mélangé légèrement et placé dans un thermo cycleur. La transcription inverse se fait à :

23°C pendant 10 minutes;
42°C pendant 60 minutes;
95°C pendant 5 minutes.

Dès que la dernière étape est finie, le tube est directement déposé sur glace.

B. Transcription inverse sur billes :

B.1. Selon Kuribayashi-Ohta, K., *et al.*, 1993, pour l'étude de la transcription inverse sur billes :

1 µg d'ARNm à utiliser est mis dans un tube RNase-Free. L'ARNm est dénaturé à 100°C pendant 4 minutes et il est ensuite directement mis sur glace.

L'hybridation du polyA des ARNm au polyT des billes oligotex se fait en ajoutant dans un seul tube les composants suivants :

- 1 µg d'ARNm dénaturé;
- 5 µl de la solution de billes oligotex 5 % (préparée à partir du stock à 10 %);
- Tampon d'hybridation TMK;
- H2O RNase-Free pour mettre à volume final de 100 µl.

Cette solution est incubée à 37°C pendant 20 minutes, tout en mélangeant toutes les 5 minutes. Le surnageant est alors éliminé par centrifugation à 13.000 rpm pendant 10 minutes.

Les billes oligotex sur lesquelles se trouvent les ARNm sont resuspendues dans 50 µl de solution de transcription inverse :

- Tampon de réaction de AMV-RT en concentration finale, composé de :
  - 100 mM de Tris-HCl, pH 8,3 à 42°C;
  - 100 mM de KCl;
  - 10 mM de $MgCl_2$.

- Mélange de dNTP (10 mM de chaque);

- 10 µCi de dATP marqués au ^{32}P;

- Inhibiteurs de RNase : 25 unités;

- H_2O RNase-Free pour obtenir un volume final de 50 µl.

1) RT avec BSA :

- BSA : 500 µg/ml;

- AMV-RT : 50 unités;

2) RT sans BSA :

-AMV-RT : 500 unités;

On mélange légèrement le tube et on incube à 42°C pendant 1 heure 30 minutes. Le tube est alors mis à 100°C pendant 4 minutes afin de séparer l'ARNm de l'ADNc et directement mis sur glace. Le tube est ensuite centrifugé pour enlever l'ARNm de l'ADNc se trouvant sur les billes oligotex. Ces billes sont alors lavées 2 fois avec 200 µl de tampon TE.

B.2. Selon Hara (Hara, E. *et al.*, 1991) pour l'étude de l'hybridation soustractive :

10 µg ARNm (dissous dans 50 µl d'H_2O) sont mis dans un tube RNase-Free. Cet ARNm est mélangé avec 50 µl de solution de billes oligotex 5 %. Le tube est placé à 100°C pendant 5 minutes, pour dénaturer l'ARNm, et ensuite il est directement mis sur glace pour figer l'ARNm.

L'hybridation du polyA des ARNm au polyT des billes oligotex se fait en ajoutant dans le tube, comprenant l'ARNm et les billes, les composants suivants :

- Tampon d'hybridation TMK 2x en concentration finale, composé de :

  - 100 mM Tris-HCl (pH 8,3);
  - 200 mM KCl;
  - 20 mM $MgCl_2$.

- H_2O RNase-Free pour mettre à volume final de 100 µl.

Cette solution est incubée à 37°C pendant 20 minutes, tout en mélangeant toutes les 5 minutes. Le surnageant est alors éliminé par centrifugation à 13.000 rpm pendant 10 minutes.

Les billes oligotex sur lesquelles se trouvent les ARNm sont resuspendues dans 300 µl de solution de transcription inverse :

- Tampon de réaction de AMV-RT en concentration finale, composé de :

  -50 mM de Tris-HCl, pH 8,3 à 42°C;
  -30 mM de KCl;
  -8 mM de $MgCl_2$.

- Mélange de dNTP (10 mM de chaque).

- Inhibiteurs de RNase : 300 unités.

- AMV-RT : 500 unités.

- H_2O RNase-Free pour mettre à volume final de 300 µl.

On mélange légèrement le tube et on incube à 42°C pendant 1 heure 30 minutes. Le tube est alors mis à 100°C pendant 4 minutes afin de séparer l'ARNm de l'ADNc et est directement mis sur glace. Le tube est ensuite centrifugé pour enlever l'ARNm qui se trouve dans le surnageant. Ces billes oligotex-ADNc sont alors lavées 2 fois avec 200 µl de tampon TE.

6.2. Amplification des fragments d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) :

La PCR permet d'amplifier jusqu'à un million de fois un fragment d'ADN double brin. Cette technique utilise la capacité d'une polymérase thermostable de synthétiser, moyennant une amorce, un brin d'ADN complémentaire d'un autre brin servant de matrice pendant un nombre élevé de cycles de dénaturation-hybridation-polymérisation (synthèse, extension).

Réactifs utilisés et mode opératoire :

Dans le tube Eppendorf où s'est fait la transcription inverse (20 µl), la PCR se fait à un volume final de 100 µl avec les différents réactifs suivants :

- Tampon 10 x concentré PCR/Dynazyme^{TM} (Finnzymes OY, Finlande) : 10 µl.

- dNTP 10 mM : 1 µl.

- Primer 3' : 100 pmole.
- Primer 5' : 100 pmole.

- 2 unités de polymérase Dynazyme (Cette polymérase est purifiée à partir d'une lignée de E.Coli qui porte un plasmide dans lequel est cloné le gène de la polymérase à ADN de *Thermus Brockianus* (Finnzymes OY, Finlande).

- Porter à 100 µl avec H_2O stérile.

On peut aussi ajouter des dATP marqués au ^{32}P (Dupont, Belgique) pour marquer l'ADN synthétisé.

On dépose délicatement 100 µl d'huile de paraffine ultra pure au dessus du mélange de réaction afin d'éviter toute évaporation.

La PCR se déroule sur un thermo cycleur qui réalise des cycles de température comme suit :

- 95°C pendant 10 minutes.

- 36 fois le cycle suivant :

    - 1 minute à 95°C (température de dénaturation des doubles brins);
    - 1 minute à une température d'hybridation (définie en fonction de la séquence des primers).
    - 1 minute à 72°C
      (température d'extension d'amorce donc de polymérisation).

La dernière incubation dure 10 minutes à 72°C pour achever la polymérisation.

Pour éliminer l'huile se trouvant au dessus de la solution de PCR, l'échantillon est mis à -20°C pendant 30 minutes. L'échantillon est congelé alors que l'huile reste liquide. Il est dès lors plus facile de la retirer. Par la suite, on rince avec 20 µl d'eau stérile pour éliminer l'huile restante.

1 / 4 des produits de la PCR sera analysé sur gel d'agarose.

6.3. Electrophorèse sur gel d'agarose :

L'électrophorèse d'ADN se pratique sur gel d'agarose. Cette méthode de séparation des fragments d'ADN se base sur une migration différentielle des fragments de tailles différentes au sein du gel. Le pourcentage en agarose peut être modifié en fonction des tailles respectives des fragments à séparer, un plus faible pourcentage permettant la migration de plus longs fragments d'ADN. Ce pourcentage varie le plus souvent entre 0,8 % et 2,0 %.

6.3.1. Réactifs utilisés :

- Agarose (Bio Rad, USA).

- Composition du tampon d'électrophorèse TBE 10 x :

  - Tris-borate 0,89 M;
  - EDTA 0,025M;
  - Porter à 1 litre avec de l'eau distillée.

- Bromure d'éthidium 500 µg/ml (Sigma, USA).

6.3.2. Mode opératoire :

L'agarose est chauffé dans un volume approprié de tampon TBE 1 x, jusqu'à ébullition. Lorsque la solution est refroidie aux environ de 50°C, elle est coulée sur le support de gel muni d'un peigne.

Le bromure d'éthidium, nécessaire pour la visualisation des bandes d'ADN par illumination sous U.V., est ajouté juste avant de couler le gel à une concentration finale de 0,5 µg/ ml. L'ADN, de charge négative, migrera vers le pôle positif tandis que le bromure d'éthidium, positif, migrera vers le pôle négatif.

Le gel durci est placé dans une cuve d'électrophorèse. Il est ensuite immergé dans le tampon. On peut ensuite déposer les échantillons dans les puits du gel et porter le voltage à 80 à 100 Volts pour permettre la migration.

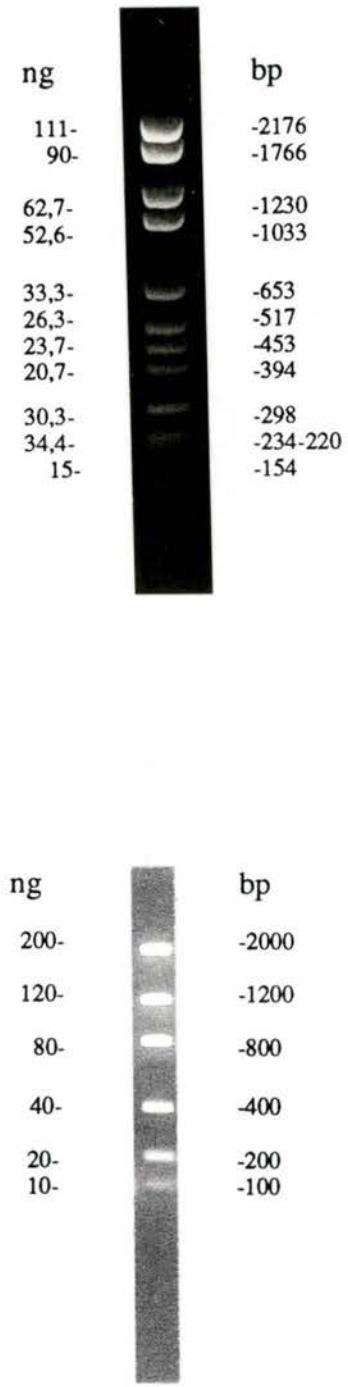


Figure III.6. Marqueurs de poids moléculaire VI (2 µl) (en haut) et Mass Ladder (4 µl) (en bas) après migration sur gel d'agarose.

En fin d'électrophorèse, les fragments d'ADN sont visualisés dans le gel au moyen d'une illumination sous U.V.et photographiés (appareil Polaroîd MP4 Land Camera, film Polaroîd 667 Prof Iso 3000 / 36°C).

La taille des différents fragments est estimée par rapport à des marqueurs de poids moléculaires. Il s'agit d'ADN restreint par une enzyme de restriction générant des fragments de taille connue. Nous avons utilisé deux marqueurs de taille (FigureIII6.), il s'agit des marqueurs VI (Boehringer, Allemagne) et DNA Mass Ladder (Gibco, Grande-Bretagne). Le marqueur VI est obtenu à partir d'ADN de plasmide pBR 328 digéré par Bgl I et Hinf I. Le marqueur Mass ladder est composé d'un mélange de fragments de taille définie. Ces marqueurs permettent d'estimer la taille de fragments de DNA de 100 à 2000 paires de bases.

7. Précipitation de faibles quantités d'ARNm à l'éthanol :

Le but est de précipiter de l'ARNm qui se trouve dans un tampon riche en sels. Comme il y a très peu d'ARNm dans le tampon, on ajoute des ARNt de levure qui facilitent la précitation de l'ARNm.

7.1. Réactifs utilisés :

- ARNt de levure (Boerhinger, Allemagne).
- NaCl 0,35 M.
- Ethanol.

7.2. Mode opératoire :

A la solution comprenant l'ARNm, on ajoute 1 µl d'une solution de 10 mg /ml d'ARNt RNases-free. Après mélange, on ajoute du NaCl à 0,35 M de concentration finale et on mélange. On ajoute 2 fois le volume en éthanol froid et on laisse précipiter à - 20°C pendant une nuit.

Le lendemain on laisse pendant 10 minutes à température ambiante et on centrifuge à 13.500 rpm à 4°C pendant 15 minutes. Le surnageant est enlevé et le culot est lavé avec de l'éthanol 70 %. On centrifuge pendant 5 minutes à 13.500 rpm et le surnageant est enlevé. Le culot est lyophilisé pendant plus ou moins 3 minutes au Speedvac (HETO, Danemark). Le culot est alors resuspendu dans 20 µl d'eau RNase-free.

8. Hybridation soustractive :

8.1. Réactifs utilisés :

- Oligo(dT)30, ce sont des particules de latex de 1,1 µm de diamètre (Qiagen, Allemagne) auxquelles sont liés de façon covalente des oligonucléotides poly(dC)$_{10}$(dT)$_{30}$.

Composition de la suspension oligotex-dT (10 %) (fournie dans le kit) :

- Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM;
- NaCl 500 mM;
- EDTA 1 mM;
- SDS 0,1 %;
- NaN_3 0,1 %;

- Tampon TMK :

-50 mM tris-HCL (pH 8,3);
-100 mM KCl;
-10 mM $MgCl_2$.

- Tampon RT. :

-50 mM tris-HCl (pH 8,3 à 42°C);
-30 mM KCl;
-8 mM $MgCl_2$, 2 mM de chaque nucléotide (dNTP).

- NaCl 5 M.

- Inhibiteurs de RNase (Amersham, UK, 110 U/µl; Boerhinger, Allemagne, 50 U/µl).

- Transcriptase inverse AMV (Boerhinger, Allemagne; Promega, USA; Stratagène, USA)
- BSA 20 mg/ml (Boehringer, Allemagne).

(1) ***Hybridation des ARNm "driver" sur billes oligotex***

- Chauffer à 100°C pendant 5 minutes
- Ajouter le tampon TMK 2 x
- Hybrider à 37°C pendant 20 minutes
- Centrifuger à 13.500 rpm pendant 10 minutes

(2) ***Synthèse d'ADNc sur billes***

- Ajouter le tampon RT
- Transcription inverse à 42°C pendant 1 heure 40 minutes
- Chauffer à 90°C pendant 3 minutes
- Centrifuger à 13.500 rpm pendant 10 minutes
- Laver 2 fois avec du tampon TE

(3) ***Saturation par des oligo(dA)30(dG)10***

- Ajouter des oligo (dA)30(dG)10
- Chauffer à 100°C pendant 3 minutes
- Ajouter du NaCl 5M
- Hybrider à 37°C pendant 20 minutes
- Centrifuger à 13.500 rpm pendant 10 minutes

(4) ***Ajouter tampon TMKN***

(5) ***Saturation par des oligo(dT)15***

- Chauffer à 100°C pendant 3 minutes
- Ajouter du NaCl 5M
- Ajouter les oligo (dT)15
- Hybrider à 37°C pendant 20 minutes

(6) ***Centrifugation 13.500 rpm 10 minutes***

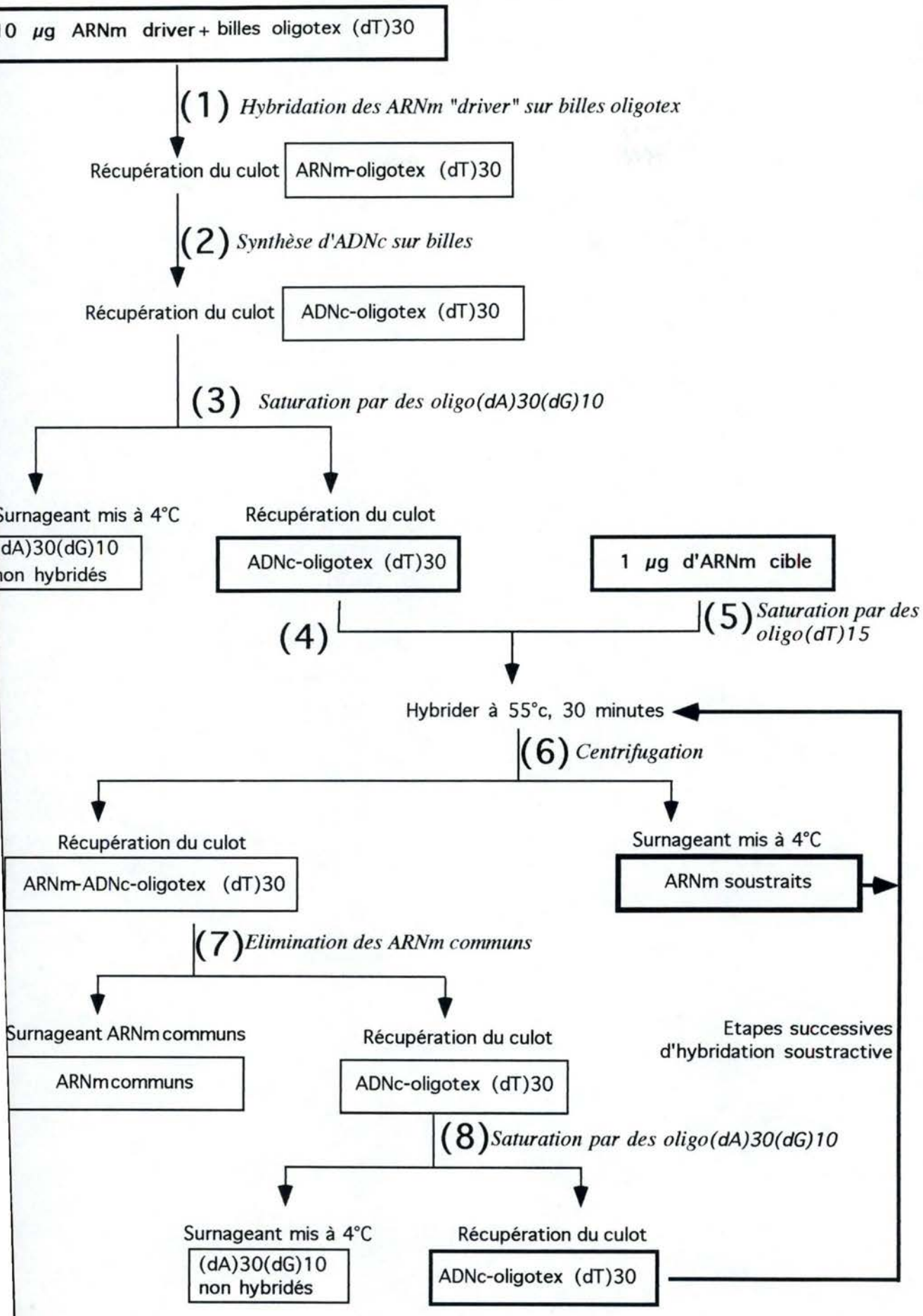
(7) ***Elimination des ARNm communs***

- Ajouter du tampon TE
- Chauffer à 100°C pendant 5 minutes
- Centrifuger à 13.500 rpm pendant 10 minutes

(8) ***Saturation par des oligo(dA)30(dG)10***

- 2 lavages avec du tampon TE
- Centrifuger à 13.500 rpm pendant 10 minutes
- Ajouter les oligo (dA)30(dG)10 mis à 4°C
- Hybrider à 37°C pendant 20 minutes
- Centrifuger à 13.500 rpm pendant 10 minutes

Figure III.7. Etapes (1) à (8) du mode opératoire de l'hybridation soustractive schématisé sur la page opposée. Pour de plus amples explications, voir le texte.



igure III.7. Schéma représentatif du mode opératoire de la technique d'hybridation soustractive tilisant des billes de latex (Hara, E., *et al.*, 1991, Satoh, Y., *et al.*, 1994). Les étapes **(1)** à **(8)** sont prises en détail sur la page opposée. Pour de plus amples explications, voir le texte.

- Tampon TE : 10 mM tris-HCl (pH 7,5 et pH 8,3), 1 mM EDTA.

- Oligonucléotides $d(G)_{10}d(A)_{30}$ (Eurogentec, Belgique).

- Oligonucléotides $(dT)_{15}$ (Boerhinger, Allemagne).

8.2. Mode opératoire (Hara, E., *et al.*, 1991; Satoh, Y. *et al.*, 1994) (figureIII.7.):

8.2.1. Synthèse de l'ADNc sur les oligo$(dT)_{30}$:

1) *Hybridation du polyA de l'ARNm driver sur le polyT des billes oligotex :*

Dix µg d'ARNm driver dissouts dans 50 µl d'H_2O sont mélangés dans un tube Eppendorf à 50 µl d'une suspension de billes d'oligo$(dT)_{30}$ 5 % et sont chauffés à 100°C pendant 5 minutes puis refroidis rapidement sur glace. Un volume égal de tampon 2 x TMK est ajouté et le mélange est incubé à 37°C pendant 20 minutes. Il est ensuite centrifugé à 13.500 rpm pendant 10 minutes à température ambiante.

2) *Synthèse de l'ADNc dirver sur billes oligotex :*

Le culot, correspondant à l'ARNm hybridé sur les billes oligotex-$(dT)_{30}$, est dissout dans 300 µl de tampon RT contenant 500 µg / ml de BSA, 300 unités d'inhibiteurs de RNase et 1000 unités de transcriptase inverse AMV. La réaction se fait à 42°C pendant 1 heure 40 minutes.

3) *Elimination de l'ARNm driver ayant servi de matrice (template) pour la synthèse d'ADNc :*

Le produit de réaction est chauffé à 90°C pendant 3 minutes et rapidement mis sur glace. L'ARNm dissocié du complexe ADNc-oligotex-$(dT)_{30}$ est enlevé par centrifugation. Le culot ADNc-oligotex-$(dT)_{30}$ est lavé deux fois avec du tampon TE (pH 7,5), qui est ensuite éliminé par centrifugation.

8.2.2. Hybridation soustractive:

1) *Saturation des polyT des billes oligotex par des polyA :*

Le complexe ADNc-oligotex-dT_{30} est dissout dans 100 µl de tampon TE (pH 7,5) contenant 100 µg d'oligodéoxynucléotides $(dA)_{30}(dG)_{10}$ pour saturer les sites polyT libres se trouvant sur les billes oligotex. La suspension est chauffée à 100°C pendant 3 minutes, puis 11 µl de NaCl 5 M sont ajoutés et l'incubation est continuée à 37°C pendant 20 minutes. Les $(dA)_{30}(dG)_{10}$ non hybridés aux oligo(dT) sont collectés par centrifugation et mis à 4°C en attendant leur réutilisation. Le précipité ADNc-oligotex-dT est dissout dans 65,5 µl de tampon TMK contenant 3 µl de NaCl 5 M.

2) *Préparation de l'ARNm cible à soustraire et saturation des polyA des ARNm par un polyT :*

Pendant le temps d'incubation précédent, 1 µg d'ARNm préparé à partir des cellules d'intérêt est dissout dans 10 µl de tampon TE (pH 7,5) et dénaturé à 100°C pendant 3 minutes pour faciliter l'hybridation. La solution est rapidement mise sur glace. Ensuite 1 µl de NaCl 5 M et 2 µg de oligo$(dT)_{15}$ sont ajoutés à cette solution pour saturer les sites polyA des ARNm. La mixture est incubée à 37°C pendant 20 minutes.

3) *Hybridation soustractive proprement dite :*

La solution contenant les ARNm cibles, avec leur queue polyA masquée, contenant 100 unités d'inhibiteurs de RNases est mélangée avec le complexe ADNc-oligotex-$(dT)_{30}$ qui ont leur polyT masqué. L'hybridation se fait à 55 °C pendant 30 minutes.

4) *Elimination des ARNm soustraits et communs :*

La mixture de réaction est alors centrifugée à 13.500 rpm pendant 10 minutes à température ambiante. Le surnageant contenant des ARNm soustraits est récolté et stocké à 4°C. Le culot ARNm communs-ADNc-oligotexdT est redissout dans 200 µl de tampon TE (pH 8,3), chauffé à 100°C pendant 5 minutes et rapidement mis sur glace. La suspension est centrifugée et le surnageant, contenant les ARNm communs, est enlevé. Le culot ADNc-oligotexdT est lavé avec 200 µl de tampon TE (pH 8,3) et récupéré par centrifugation.

5) *Resaturation des polyT des billes par des polyA et des polyA des ARNm par des polyT :*

Le précipité ADNc-oligotex-dT est resuspendu dans le surnageant contenant les $(dA)_{30}(dG)_{10}$ stocké à 4°C . On y rajoute 20 µg de $(dA)_{30}(dG)_{10}$ de la solution stock, cette mixture est incubée à 37°C pendant 20 minutes.

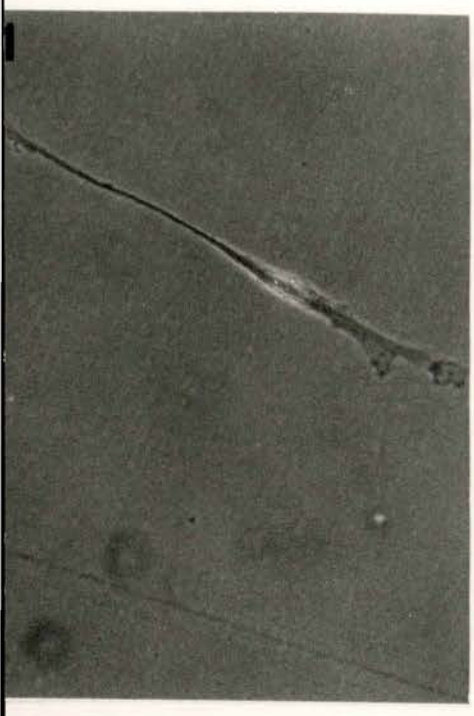
Pendant ce temps, on sature à nouveau l'ARNm soustrait en les hybridant avec les polyT à 37°C pendant 20 minutes. Les $(dA)_{30}(dG)_{10}$ sont récoltés à nouveau par centrifugation et stockés à 4°C.

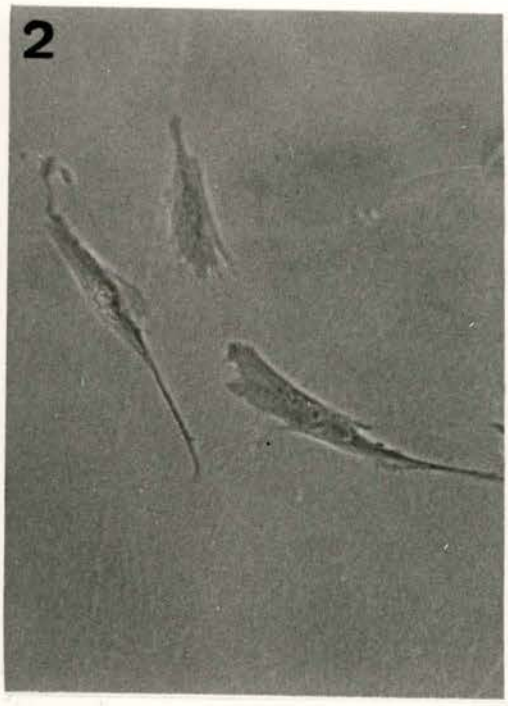
6) *Deuxième hybridation soustractive proprement dite :*

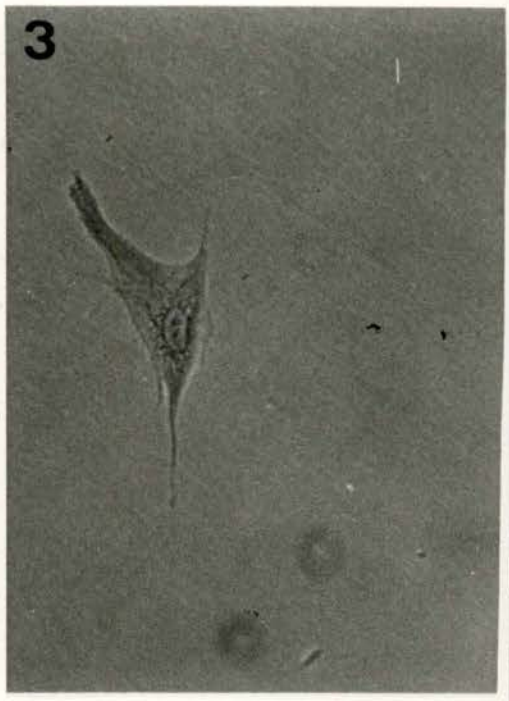
Le précipité cDNA-oligotex-dT est resuspendu dans la première fraction d'ARNm soustractif et la seconde procédure d'hybridation se fait à 55°C pendant 30 minutes.

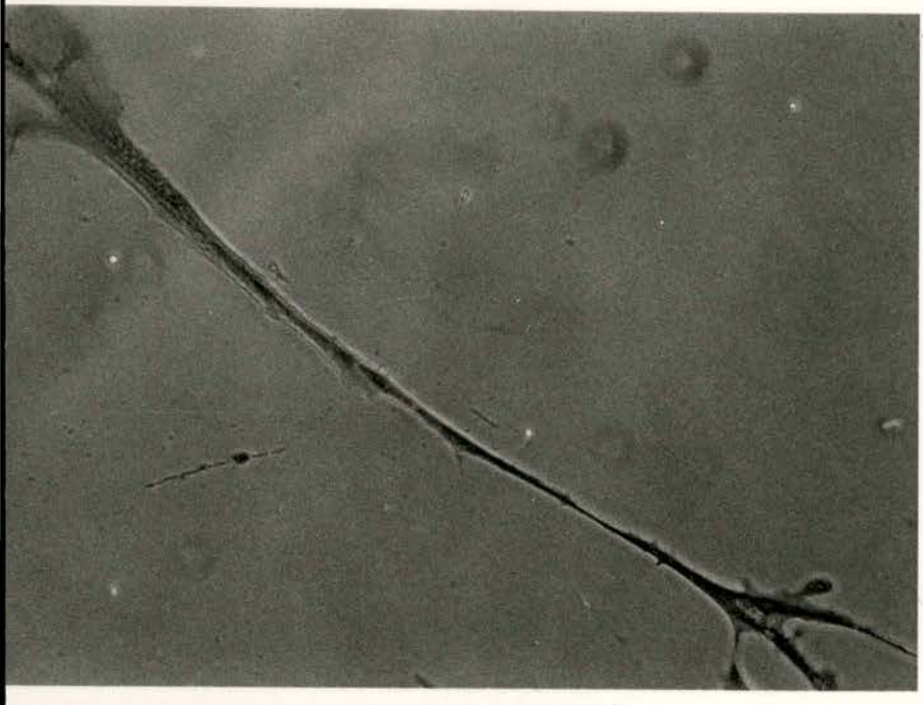
La procédure d'hybridation est répétée le nombre de fois désiré.

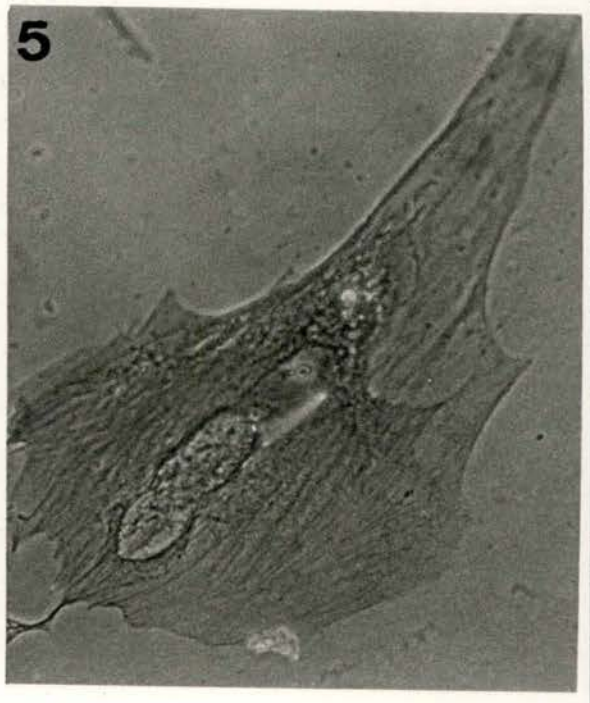
Les ARNm soustraits et communs seront analysés sur gel après la réaction de RT-PCR.











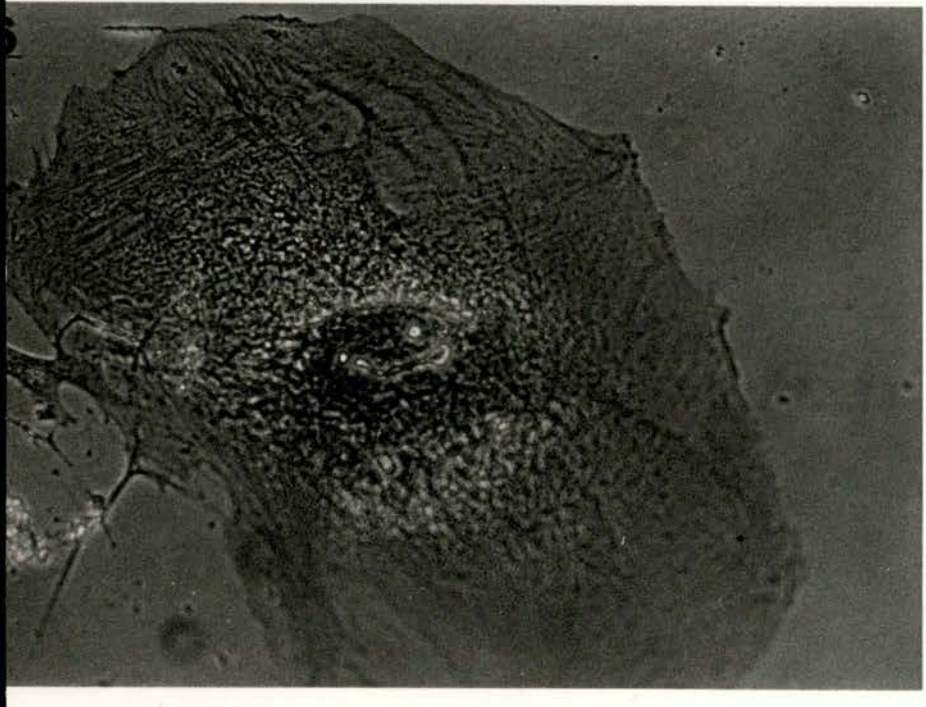


Figure IV.1. Morphotypes mitotiques et post-mitotiques des fibroblastes AG04432.

(1) fibroblaste mitotique MF I,

(2) fibroblastes mitotiques MF II,

(3) fibroblaste mitotique MF III,

(4) fibroblaste post-mitotique PMF IV,

(5) fibroblaste post-mitotique PMF V,

(6) fibroblaste post-mitotique PMF VI,

(grossissement 250 x).

IV. Résultats et discussions

I. Sélection des populations fibroblastiques, plus ou moins âgées, en vue d'une hybridation soustractive de leur ARNm :

1. Choix du type cellulaire :

Il fallait tout d'abord déterminer le type cellulaire sur lequel nous allions travailler. Différentes possibilités s'offraient à nous en fonction des souches de fibroblastes disponibles, soit les fibroblastes de poumons WI-38 ou les fibroblastes de poumon AG04432.

A première vue, il était intéressant de travailler sur les fibroblastes WI-38 puisque les conditions d'obtention de certaines populations des différents morphotypes composant une culture de ces cellules étaient bien connues. Toutefois, il est actuellement impossible de se procurer des fibroblastes WI-38 suffisamment jeunes pour permettre d'obtenir des proportions importantes de cellules très jeunes. La vente à travers le monde de ces cellules depuis plus de 30 ans est en partie responsable de cet état de fait. Nous devrions donc nous tourner vers une autre souche

Les fibroblastes de poumon AG04432 dont nous disposons aussi au laboratoire ont l'avantage de posséder un nombre maximum de passages en culture plus élevé par rapport aux fibroblastes de poumon WI-38. Ceci est théoriquement intéressant afin d'obtenir des populations de cellules jeunes (vieilles) contenant une faible proportion de morphotypes jeunes (vieux), cela étant dû à un plus grand étalement de la culture dans le temps.

Nous avons appliqué les critères morphologiques connus pour les fibroblastes de peau HH-8 et les fibroblastes WI-38 aux fibroblastes AG04432. Nous avons bien retrouvé les 6 morphotypes viables pour ces derniers. Les 6 morphotypes viables de ces fibroblastes sont représentés à la figure IV.1.. Le septième, très éphémère, correspondant au PMF VI en dégénérescence, n'a été observé que très rarement. Nous avons donc réalisé toutes les expériences qui suivent sur les fibroblastes AG04432.

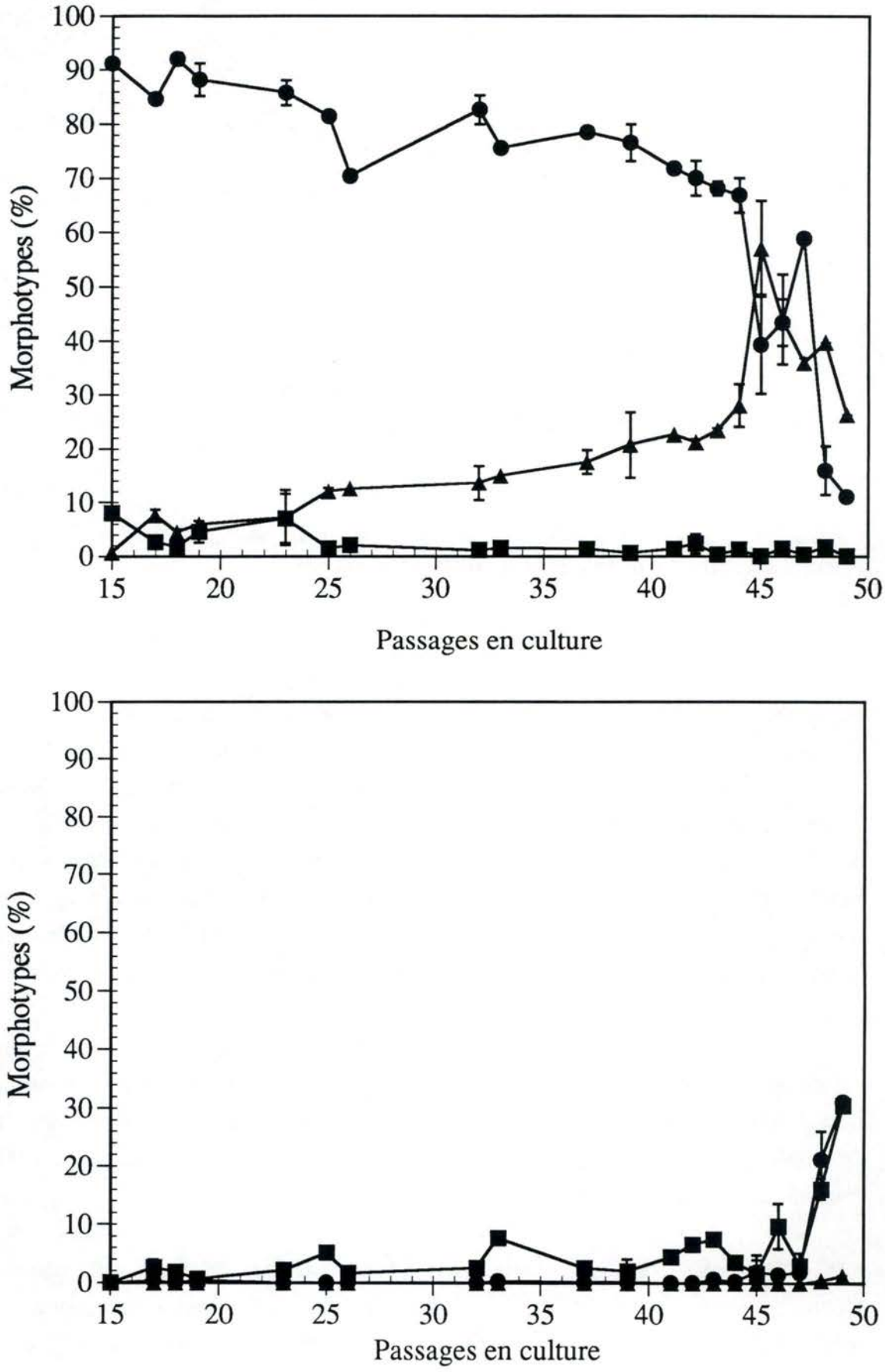


Figure IV.2. Proportion des morphotypes des fibroblastes AG04432 en fonction des passages en culture.

A : morphotypes mitotiques I (■), II (●) et III (▲).

B : morphotypes post-mitotiques IV (■), V (●) et IV (▲).

2. Détermination des proportions des divers types morphologiques en fonction des passages en culture :

2.1. Fibroblastes AG04432 :

Un graphique reprenant l'évolution des fibroblastes AG04432 par les différents morphotypes en fonction des passages en culture a été réalisé afin de comparer cette évolution à celle des fibroblastes WI-38 (figure IV.2.). Nous observons que le comportement général des fibroblastes AG04432 est semblable à celui des fibroblastes WI-38 : les fibroblastes passent progressivement d'un morphotype à un autre, et ce passage se fait toujours suivant un ordre bien précis : MF I, II, III puis PMF IV, V, VI et VII. Nous observons que la proportion de morphotypes I au 15ème passage en culture est très faible (environ 9 %), alors que la proportion des morphotypes II est déjà aux alentours des 90 %. Notons qu'il n'est pas possible d'obtenir des cellules de souche fibroblastique commercialisée d'un passage inférieur à 13 contenant plus de morphotypesI. Une manière intéressante d'en obtenir serait de cultiver nous même des fibroblastes provenant d'un tissu obtenu après un avortement thérapeutique, mais ceci est bien au-delà du cadre de ce travail. Quant aux morphotypes III, l'augmentation de leur proportion est tout d'abord assez lente. Il faut en effet attendre le passage 44 pour en obtenir environ 25 %. A partir de ce passage en culture, l'augmentation de la proportion de MF III est très rapide puisque le pourcentage des MF II passe de 60 % à environ 25 % et que le pourcentage des MF III connait une évolution inverse en trois passages en culture. Ceci confirme bien notre hypothèse de l'effet d'un étalement plus important de la culture dans le temps sur l'obtention de populations plus homogènes en cellules jeunes (MF I et II) ou vieilles (MF III et les PMF).

Quant aux cellules post-mitotiques, elles apparaissent lors des derniers passages en culture. Au dernier passage en culture, nous observons 30 % de PMF IV, 30 % de PMF V et 2 % de PMF VI alors qu'il reste encore 10 % de MF II et 26 % de MF III.

Nous avons pu conserver des cultures stationnaires de fibroblastes post-mitotiques pendant 8 semaines. L'évolution suivante des proprotions des morphotypes successifs a été obtenue (figure IV.3.). En 54 jours, la proportion de MF I est restée nulle alors que celle des MF II est passée de 5,9 % à 1,4 %. La proportion des MF III chute à 25 %. Les PMF IV montent à 25 % . Les PMF V passent à 32 % avec un pic à 56 % et celle des PMF VI reste très faible.

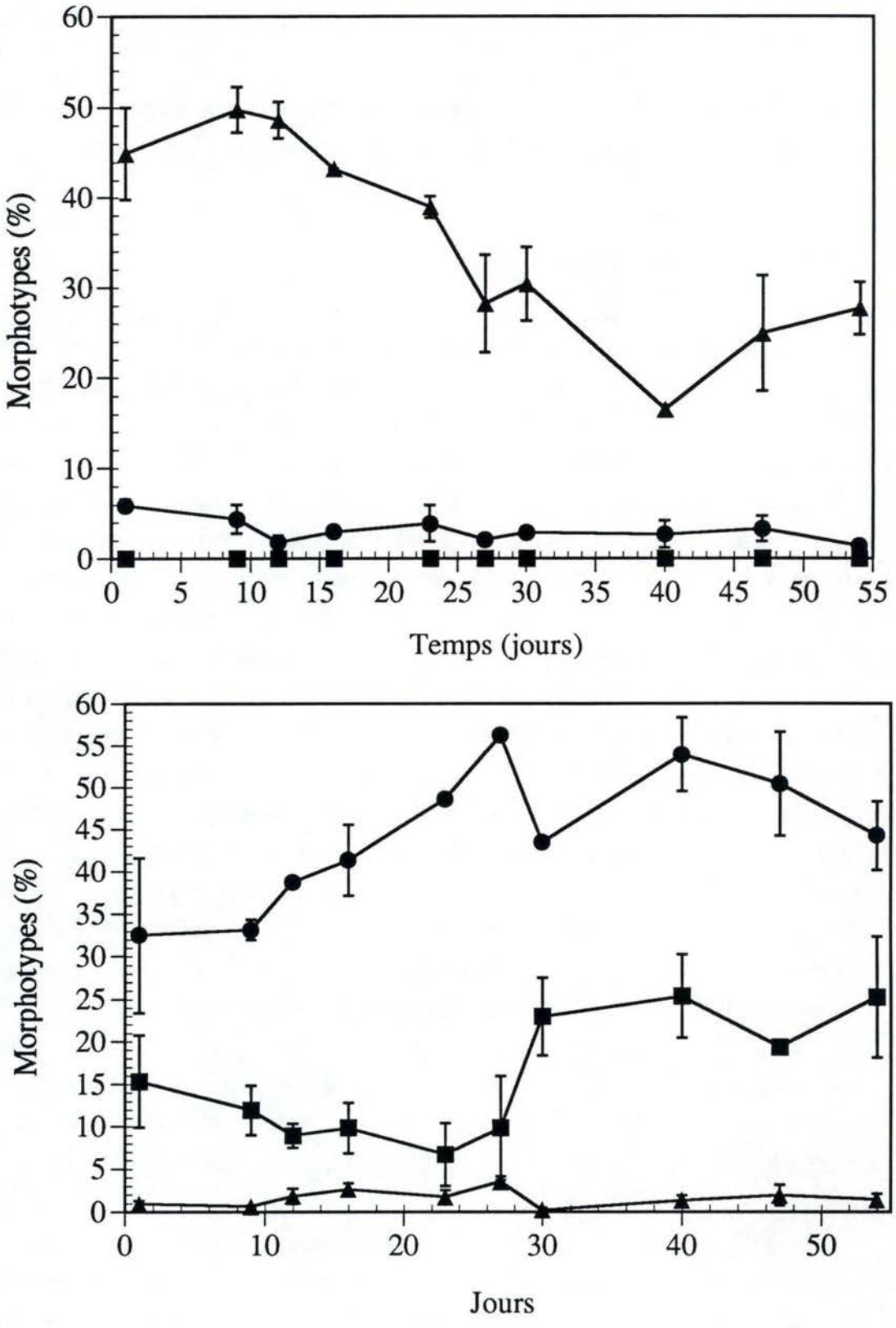


Figure IV.3. Proportion des morphotypes des fibroblastes AG04432 pour des cultures stationnaire post-mitotiques.

A : morphotypes I (-■-), I (-●-)I et III (-▲-).

B : morphotypes IV (-■-), V (-●-) et VI (-▲-).

2.2. Comparaison avec les fibroblastes HH-8 et WI-38 (figure IV.4.a,b) :

Concernant l'évolution de la proportion des cellules mitotiques et post-mitotiques au cours des différents passages en culture, le profil général des courbes est similaire aux courbes obtenues pour les fibroblastes HH-8 et WI-38. Toutefois, des différences sont observées en comparant les valeurs obtenues (figure IV.4.c.) comme le nombre maximum de passage en culture effectués varie très peu pour les trois souches, on peut comparer les pourcentages de morphotypes obtenus aux différents passages.

L'évolution de la proportion de MF I pour les fibroblastes AG04432 est très faible dès le début de la culture comme celle des fibroblastes HH-8, au contraire des fibroblastes WI-38.
La proportion des MF II connaît respectivement un pic de 81,0 %, 79,5 % et 92 % aux passages 33, 39 et 18 pour les fibroblastes HH-8, WI-38 et AG04432. La proportion des MF III connaît respectivement un pic de 81,0 %, 61,4 % et 52,0 % aux passages 52 (le dernier), 53 (le dernier) et 45 pour les fibroblastes HH-8, WI-38 et AG04432.

L'évolution des proportions des morphotypes PMF IV, V et VI dans les trois souches est de profil assez semblable, avec des différences peu importantes, sauf lors des tous derniers passages en culture.

Concernant l'évolution de la proportion des différents PMF pour les cellules AG04432 lors de cultures stationnaires réalisées après le dernier passage en culture, celle-ci est plus proche de l'évolution observée pour les fibroblastes WI-38 (Bayrauther, K. et Gogol, J., 1993), avec une population assez stable pour les morphotypes III, IV, V et VI, alors que les fibroblastes HH-8 (Bayreuther, K. *et al.*, 1988), connaissent des augmentations successives dans la proportion de morphotypes de plus en plus âgés (IV, V et VI). Deux explications sont possibles : soit une mortalité d'autant plus importante que les morphotypes des cellules AG04432 sont âgés, soit le passage des cellules vers les morphotypes âgés est très lent. Nous obtenons une proportion de PMF V supérieure à la proportion de PMF IV pour les fibroblastes AG04432, ce qui s'observe aussi pour les fibroblastes WI-38 et HH-8.

Notons enfin que l'obtention de proportions très élevées en PMF peut aussi dépendre du lot de sérum utilisé (Bayreuther, K., *et al.*, 1988). Nous n'avons pas testé plusieurs sérums dans le cadre de ce travail.

Un graphique reprenant le nombre de cellules par cm^2 en fonction des passages en culture a été réalisé (figure IV.5.). Une diminution importante de la densité cellulaire est observée au cours des passages en culture, comme c'est le cas pour les fibroblastes WI-38 (Hayflick, L. et Moorehead, P.S., 1961).

(A) Cell type frequencies in mitotic and postmitotic WI-38 populations as a function of the CPD level of the mitotic populations and the period of time of the postmitotic populations in stationary culture

		Fibroblast cell types (%)						
		MFI	MFII	MFIII	PMFIV	PMFV	PMFVI	PMFVIIa
(1) MF populations at CPD	Days							
22	0	45.6	47.0	7.2	–	–	–	–
32	15	31.0	63.9	5.1	–	–	–	–
39	43	12.0	79.5	8.5	–	–	–	–
44	48	7.2	76.5	15.7	–	0.6	–	–
46	64	8.1	73.6	17.6	0.7	–	–	–
48	68	0.5	43.8	46.7	1.6	7.5	–	–
50	77	0.4	38.8	53.9	2.4	4.1	–	–
53	112	–	20.5	61.4	1.9	13.4	2.6	–
(2) PMF populations at Week	Days							
4	28	–	–	1.2	6.1	24.7	68.0	0.5
6	42	–	–	0.5	6.5	16.9	66.3	10.2
8	56	–	–	0.3	11.1	13.7	48.2	26.8
10	70	–	–	–	11.0	15.0	46.9	26.8

(B) Changes in the frequencies of mitotic and postmitotic fibroblasts as a function of CPD and duration of stationary culture

	CPD (days)	Fibroblast cell type, %						
		F I	F II	F III	F IV	F V	F VI	F VII
(1)		MF populations						
	11.6 (35)	18	70	10	1	0.5	0.5	—
	22.0 (70)	8	78	12	1	0.5	0.5	—
	31.1 (105)	3	78	16	2	0.5	0.5	—
	40.3 (147)	1	38	49	10	1	1	—
	50.1 (231)	—	1	79	14	3	3	—
(2)		PMF populations						
	(7)	—	—	30	18	40	12	—
	(21)	—	—	3	31	43	23	—
	(42)	—	—	—	16	32	51	1
	(84)	—	—	—	4	5	87	4
	(140)	—	—	—	—	2	89	9
	(280)	—	—	—	—	—	88	12

(C)

(1)

Passages en culture	Pourcentages des différents morphotypes des fibroblastes AG04432						
	MF I	MF II	MF III	PMF IV	PMF V	PMF VI	PMF VII
15	8	91,2	0,7	-	-	-	-
17	2,6	84,6	7,6	2,6	0,4	-	-
18	1,7	92	4,4	1,8	-	-	-
19	4,5	88,2	5,9	0,6	0,5	-	-
23	7	85,8	7,2	2,1	-	-	-
25	1,4	81,4	12	5,1	-	-	-
26	2	70,4	12,5	1,6	-	-	-
32	1,1	82,6	13,6	2,5	-	-	-
33	1,5	75,5	14,9	7,7	0,3	-	-
37	1,3	78,45	17,5	2,5	0,1	-	-
39	0,6	76,5	20,65	2	0,15	-	-
41	1,3	71,8	22,5	4,4	-	-	-
42	2,3	70	21,1	6,6	-	-	-
43	0,3	68,1	23,3	7,5	0,6	-	-
44	1,2	66,8	28	3,5	0,3	-	-
45	-	39,4	57	1,6	1,9	-	-
46	1,4	43,5	44	9,7	1,4	-	-
47	0,3	58,8	36	2,9	1,8	-	-
48	1,7	15,9	39,8	16,1	21,2	0,4	-
49	-	10,98	26,2	30,5	31,1	1,2	-

(2)

Temps (jours)	Pourcentages des différents morphotypes des fibroblastes AG04432						
	MF I	MF II	MF III	PMF IV	PMF V	PMF VI	PMF VII
1	-	5,9	44,9	15,3	32,5	0,9	-
9	-	4,4	49,7	11,9	33,1	0,6	-
12	-	1,8	48,6	8,9	38,7	1,8	-
16	-	3	43,2	9,8	41,3	2,6	-
23	-	3,9	38,9	6,7	48,6	1,7	-
27	-	2,1	28,2	9,8	56,2	3,5	-
30	-	2,9	30,4	22,9	43,4	0,2	-
40	-	2,7	16,5	25,3	53,9	1,3	-
47	-	3,3	24,9	19,3	50,4	1,9	-
54	-	1,4	27,7	25,2	44,2	1,4	-

Figure IV.4. (A) Fréquences des morphotypes des fibroblastes WI-38
(1) En fonction des passages en culture
(2) En fonction du temps (jours) après le dernier passage en culture
(B) Fréquences des morphotypes des fibroblastes HH-8
(1) En fonction des passages en culture
(2) En fonction du temps (jours) après le dernier passage en culture
(C) Fréquences des morphotypes des fibroblastes AG04432
(1) En fonction des passages en culture
(2) En fonction du temps (jours) après le dernier passage en culture

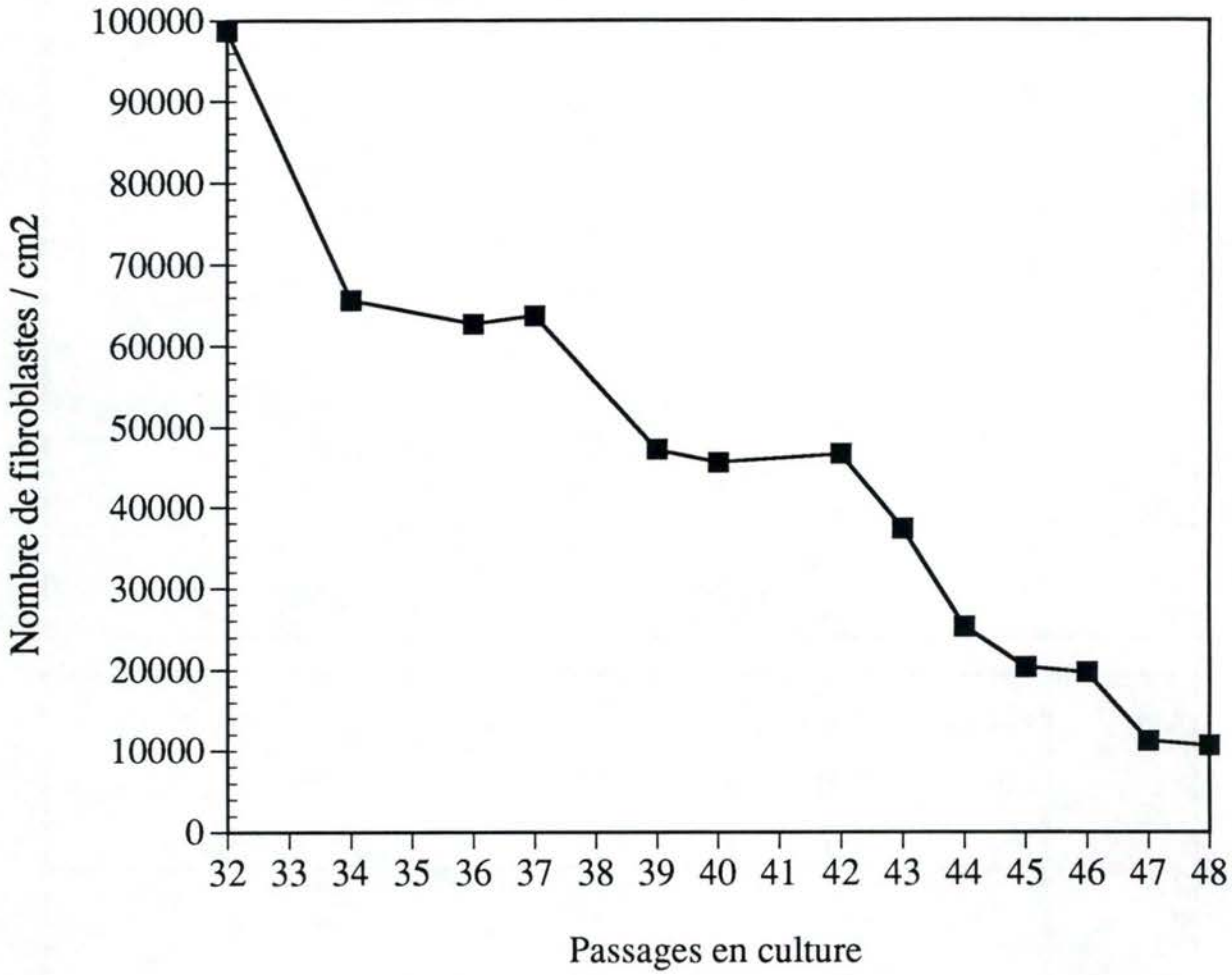


Figure IV.5. Graphique représentant le nombre de cellules par cm^2 en fonction des passages en culture pour les fibroblastes AGO4432.

3. Sélection des passages en culture en vue d'obtenir des proportions de morphotypes permettant de réaliser la soustraction d'ARNm :

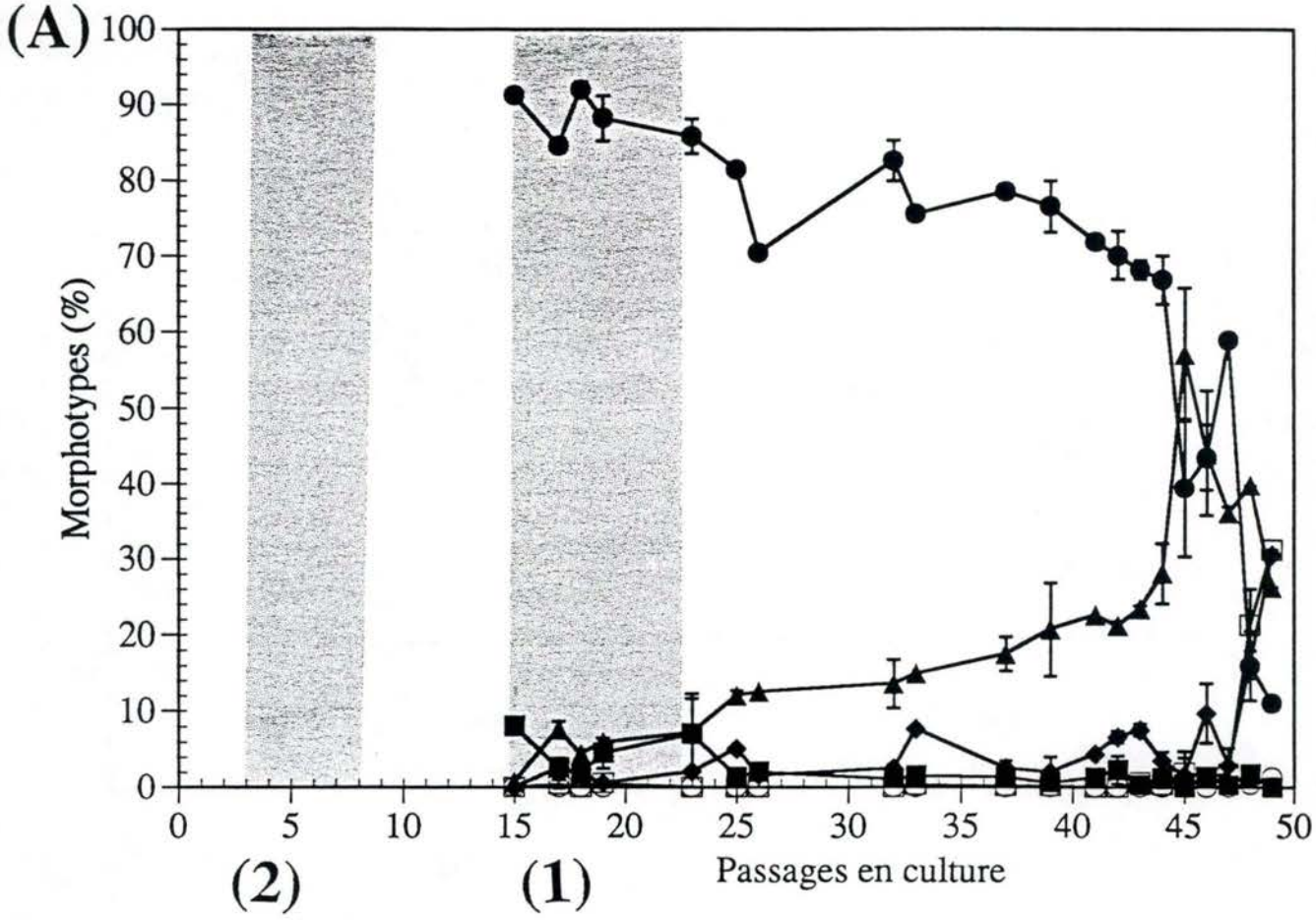
Le but de ce travail est de réaliser différentes hybridations soustractives, soustrayant à chaque fois les ARNm spécifiques d'un morphotype particulier. Vu les courbes reprenant l'évolution des proportions des différents morphotypes, il est clair qu'il n'est pas possible d'obtenir des populations fibroblastiques contenant uniquement un morphotype donné. Cependant, il est possible de trouver des compromis permettant théoriquement de mettre en évidence les ARNm spécifiques de tel ou tel morphotype après hybridation soustractive, tout en éliminant les ARNm spécifiques d'autres morphotypes. Trois types d'expériences nous semblent possibles en fonction de l'évolution des proportions des morphotypes avec le vieillissement de la culture (figure IV.6.). Concernant la première expérience, en utilisant comme cibles les ARNm d'une population fibroblastique dans les tout premiers passages où la proportion des MF I serait la plus importante (voir figure IV.7.a.) et comme driver les ARNm d'une population fibroblastique entre les passages 15 et 23, on espère mettre en évidence les ARNm spécifiques des MF I. Concernant la deuxième expérience, en utilisant comme cibles les ARNm d'une population fibroblastique entre les passages 45 et 47 (voir figure IV.7.b.) et comme driver les ARNm d'une population fibroblastique entre les passage 15 et 23, on espère mettre en évidence les ARNm spécifiques des MF III. Concernant la troisième expérience, en utilisant comme cibles les ARNm d'une population fibroblastique de PMF IV, PMF V et PMF VI prise entre 35 et 43 jours de culture stationnaire après le dernier passage en culture (voir figure IV.7.c.), et comme driver les ARNm d'une population fibroblastique entre les passages 45 et 47 , on espère mettre en évidence les ARNm spécifiques des PMF IV, V et VI. Une quatrième expérience est théoriquement envisageable et permettrait de séparer les ARNm spécifiques des MF II. Cette expérience serait possible en réalisant une hybridation soustractive en utilisant les ARNm de populations riches en MF III, PMF IV, PMF V et PMF VI (prise entre 35 et 43 jours de culture stationnaire après le dernier passage en culture) comme driver et les ARNm de populations riches en MF II comme cible entre les passages 15 et 23. Cependant, cette expérience est difficilement réalisable car elle nécessiterait approximativement 400 boîtes de culture de 75 cm^2.

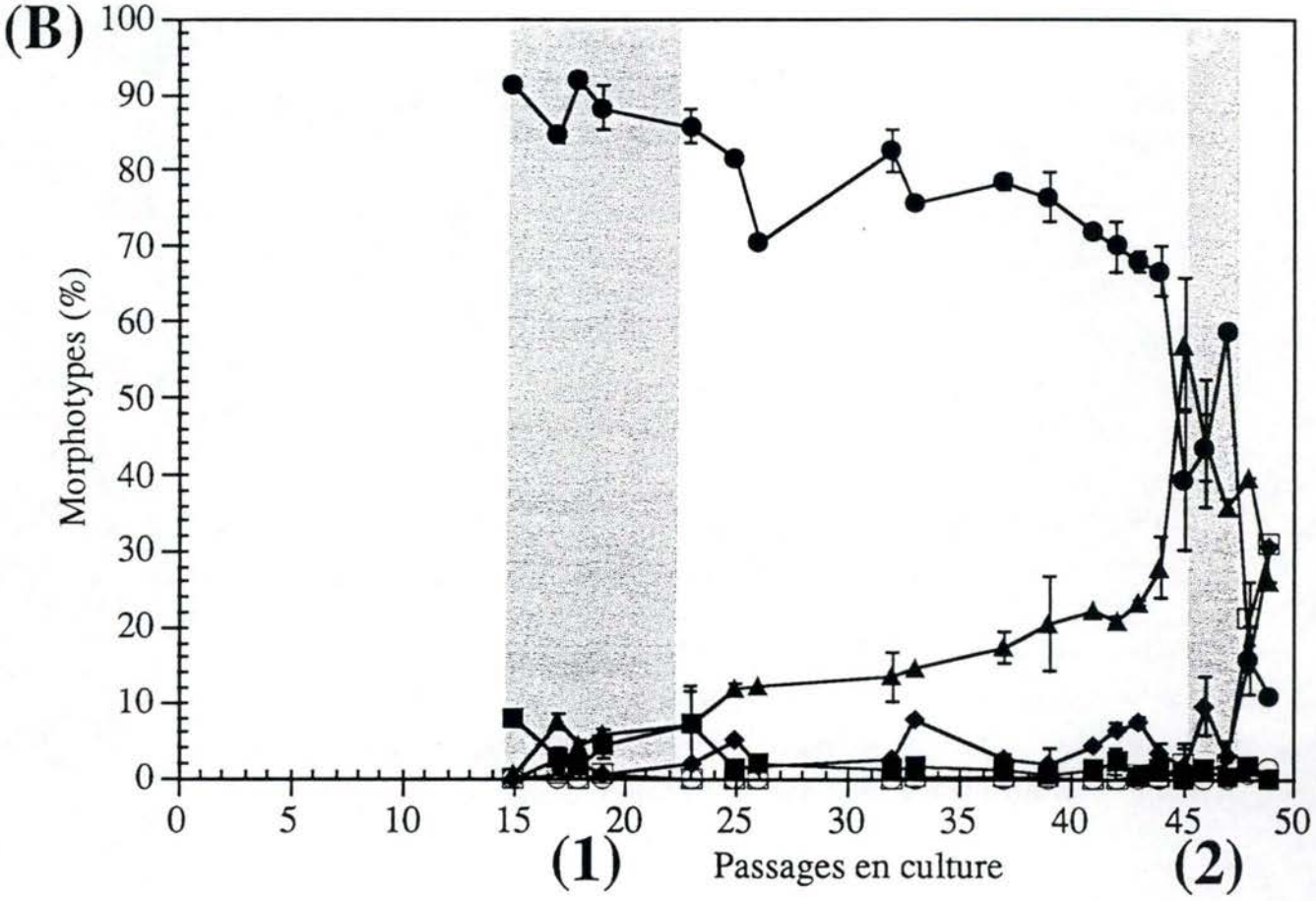
Nous avons réalisé un graphique similaire reprenant l'évolution des pourcentages de différents morphotypes à partir d'une autre culture de fibroblastes AG04432, afin de voir si cette évolution est reproductible surtout pour les passages où les pourcentages des MF II diminuent rapidement de manière concomittante à l'augmentation des MF III (figure IV.8.). Des résultats très semblables sont obtenus, à savoir une diminution brutale du pourcentage de MF II et,

Proportion en morphotypes pour les cellules contenant l'ARNm **cible** (1 μg d'ARNm) :	Proportion en morphotypes pour les cellules contenant l'ARNm **driver** (10 μg d'ARNm) :
1) MF I élevée et MF II faible.	1) MF II élevée et MF III faible.
2) MF II élevée et MF III faible.	2) MF II élevée et MF I faible.
3) PMF IV, V et VI élevée.	3) MF II et III élevée et PMF IV, V et VI faible.
4) MF II élevée et MF III, PMF IV, V et VI faible.	4) MF III,PMF IV, V et VI élevée

FIgure IV.6. Trois types d'hybridation soustractive semblent réalisables en fonction de l'évolution des proportions des morphotypes avec le vieillissement de la culture.

1) La première permet de soustraire les ARNm spécifiques des **MF I**.
2) La seconde permet de soustraire les ARNm spécifiques des **MF III**.
3) La troisième permet de soustraire les ARNm spécifiques des **PMF IV, V et VI**.
4) La quatrième permet de soustraire les ARNm spécifiques des **MF II**.


(A)
Morphotypes (%)
Passages en culture
(2)
(1)


(B)
Morphotypes (%)
Passages en culture
(1)
(2)

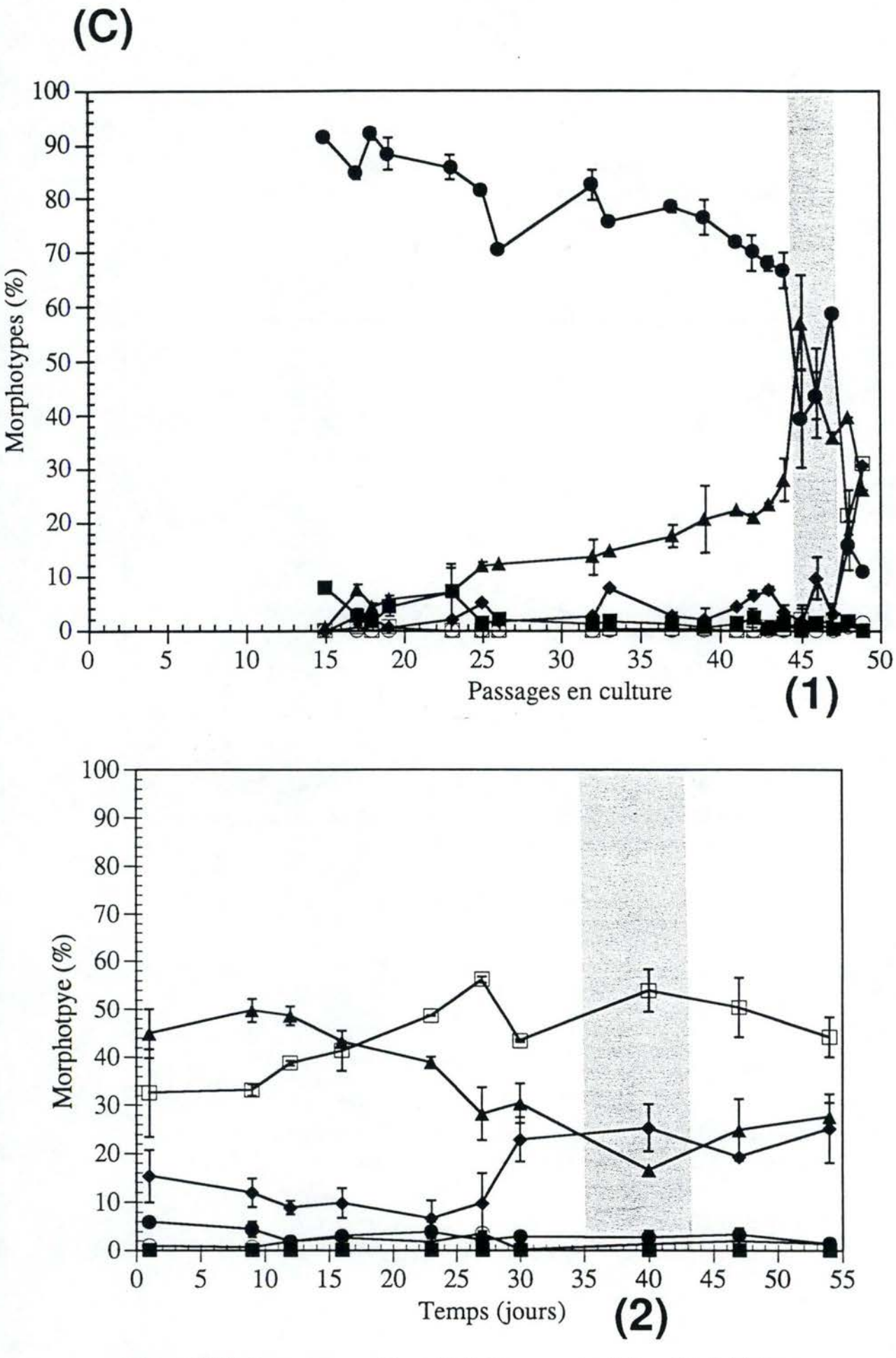


Figure IV.7. Passages en culture d'intérêt en vue de réaliser 3 hybridations soustractives (A,B et C), en utilisant les cellules de passages en culture (1) comme dirver et (2) comme cible. Morphotypes I (-■-), II (-●-), III (-▲-), IV (-◆-), V (-⊟-) et VI (-⊖-).

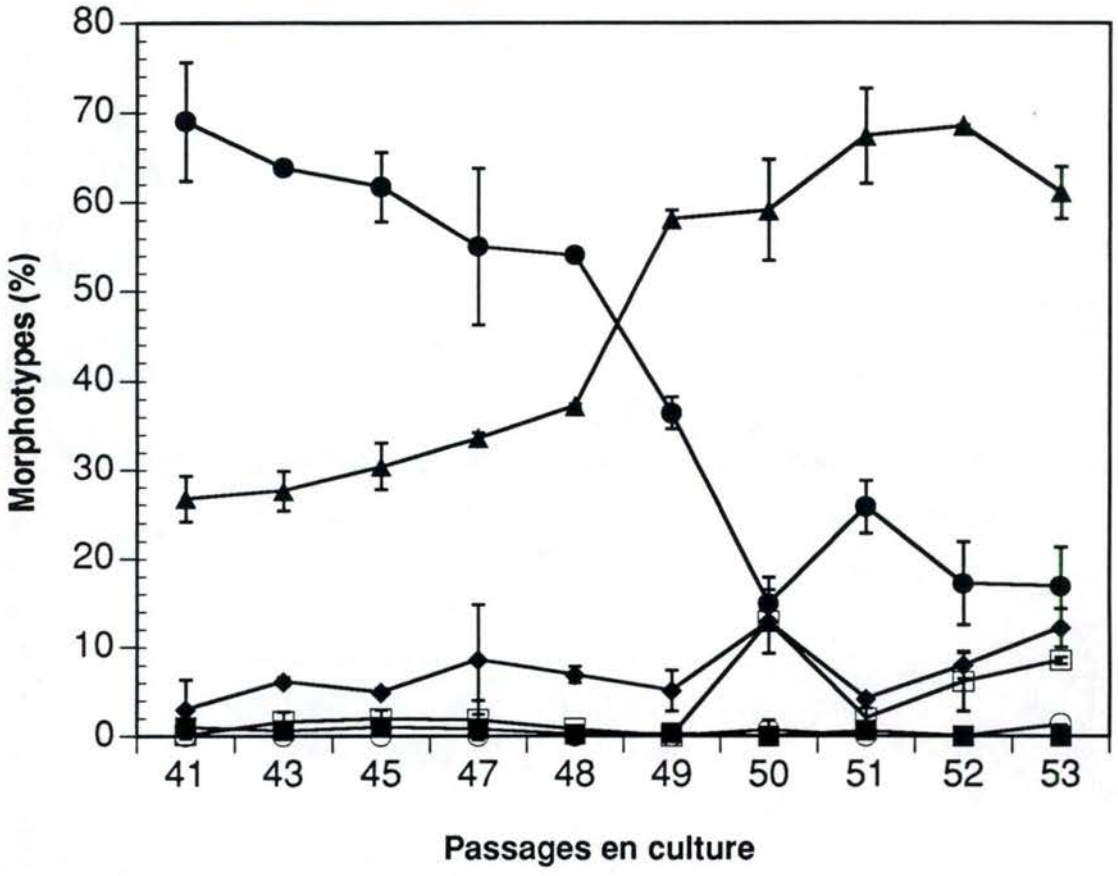


Figure IV.8. Proportion des morphotypes AG04432 en fonction des passages en culture à partir d'une autre culture (comparer avec la figure IV.2.). Morphotypes I (-■-), II (-●-), III (-▲-), IV (-◆-), V (-⊟-) et VI (-⊖-).

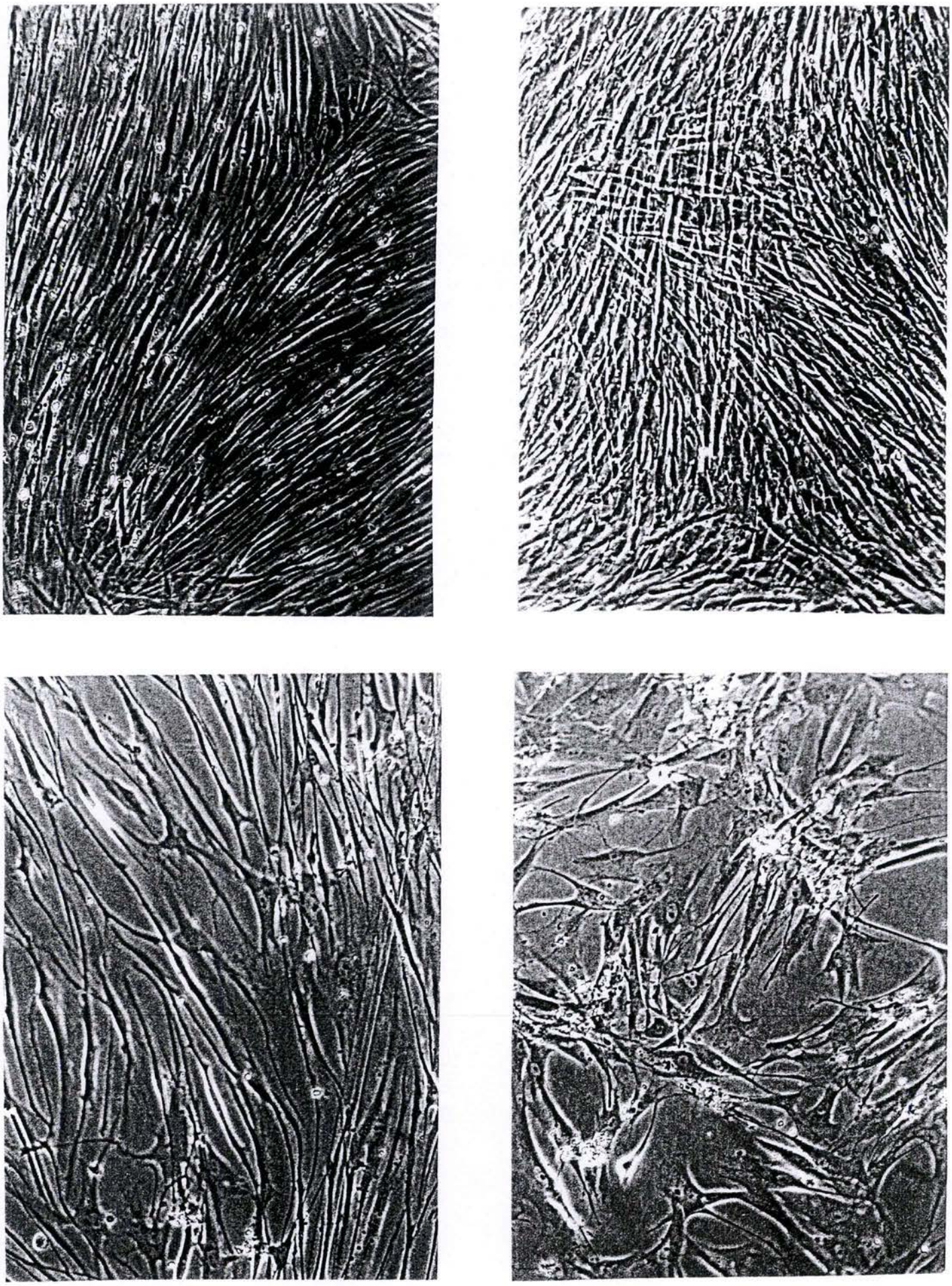


Figure IV.9. Fibroblastes de poumon AG04432 aux passages 42 ou 48 (respectivement ligne supérieure ou inférieure), après 5 jours dans de l'OPT + sérum 0,1 % ou 10 % (respectivement colonne de gauche ou de droite).

simultanément, une forte augmentation du pourcentage de MF III. Toutefois, un décallage de 3 passages en culture est observé dans cette inversion des proportions des MF II et III, ceci étant probablement dû à l'utilisation d'un nouveau lot de sérum. D'autres facteurs peuvent aussi expliquer ce phénomène comme une exposition plus longue des cellules à la trypsine lors de certains repiquages pour détacher les cellules de la boîte. On peut aussi envisager une décongélation des cellules plus ou moins meurtrière, par exemple en fonction des paramètres physiologique du sérum utilisé. Ces phénomènes peuvent modifier le nombre de cellules survivantes et donc, à long terme, le nombre maximum de passages en culture. Ce décallage des courbes nécessite donc de suivre constamment l'évolution des pourcentages des différents morphotypes en vue d'extraire l'ARNm.

De manière à purifier seulement les ARNm spécifiques d'un morphotype par hybridation de son ARNm avec celui d'un autre morphotype mitotique, et non par exemple les ARNm spécifiques d'une étape du cycle cellulaire, nous devions soit synchroniser le cycle cellulaire, soit rendre ces cellules quiescentes. De manière à purifier seulement les ARNm spécifiques d'un morphotype mitotique par hybridation de son ARNm avec celui d'un autre morphotype post-mitotique ou inversément, nous devions rendre quiescentes les cellules mitotiques. Pour travailler dans des conditions identiques dans tous les cas possibles, nous avons choisi de rendre les cellules mitotiques quiescentes en diminuant la concentration en sérum avant l'extraction de leur ARN et de traiter les cellules post-mitotiques de la même façon, ce qui correspond aux travaux cités dans la littérature (Brenneisen, P. *et al.*, 1994; Wistrom, C. et Villeponteau, B., 1992).

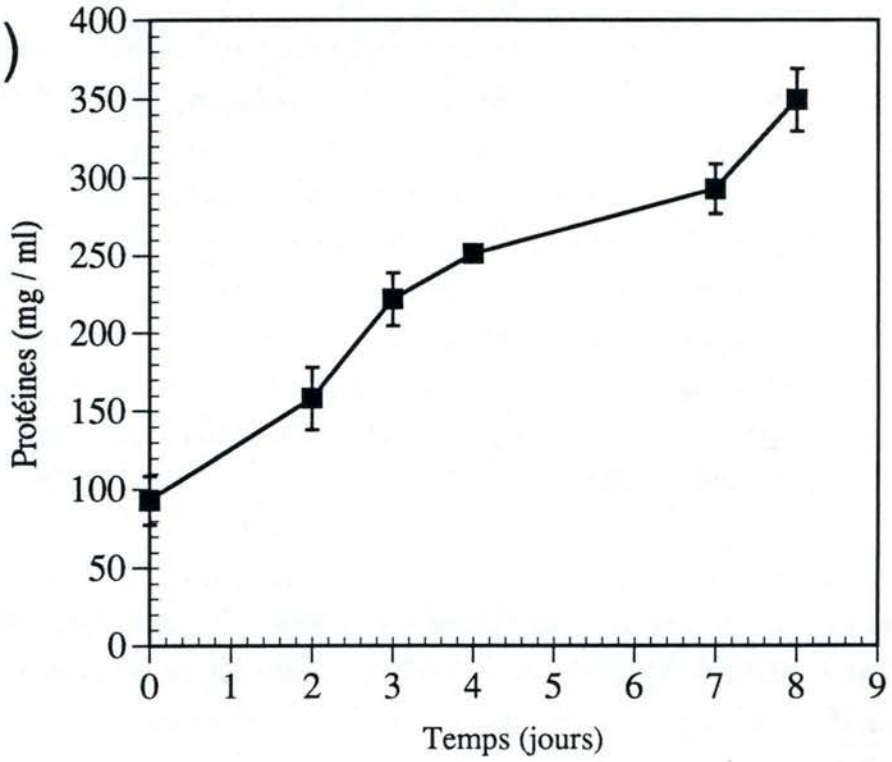
4. Détermination du milieu de culture pour rendre les cellules quiescentes :

S'il est intéressant d'éliminer totalement le sérum du milieu de culture pour les raisons invoquées ci-dessus, les cellules doivent toutefois être en présence d'une concentration de sérum minimale pour survivre.

De manière à estimer le taux de mitose des cellules, nous avons réalisé un test d'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN. Un dosage de la quantité de protéines a été effectué en parallèle pour estimer une éventuelle mortalité cellulaire. Ces mesures ont été effectuées sur des cellules incubées dans des milieux de culture comprenant différentes concentrations en sérum (10 %, 0,2 %, 0,1 % et 0,05 %) ou comprenant 0,2 % en HLA. L'observation de ces cellules est montrée à la figure IV.9.. La thymidine tritiée a été fournie aux cellules pendant 24 heures, le début de l'incubation avec cette tymidine coïncidant avec des temps variables (en jours) après le repiquage des cellules à tester dans les boîtes multi-compartimentées.

(A)

(1)



(2)

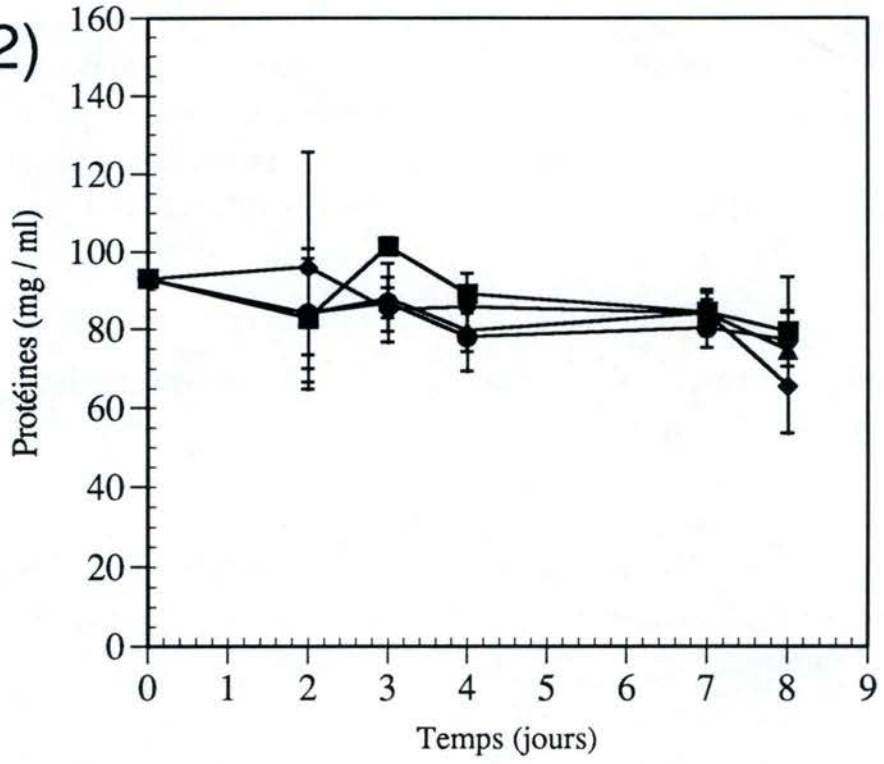


Figure IV.10. Dosage de la quantité de protéines au cours du temps (jours) après un repiquage en boîtes multi-compartimentées.

(A). Pour des cellules à passage en culture 42.

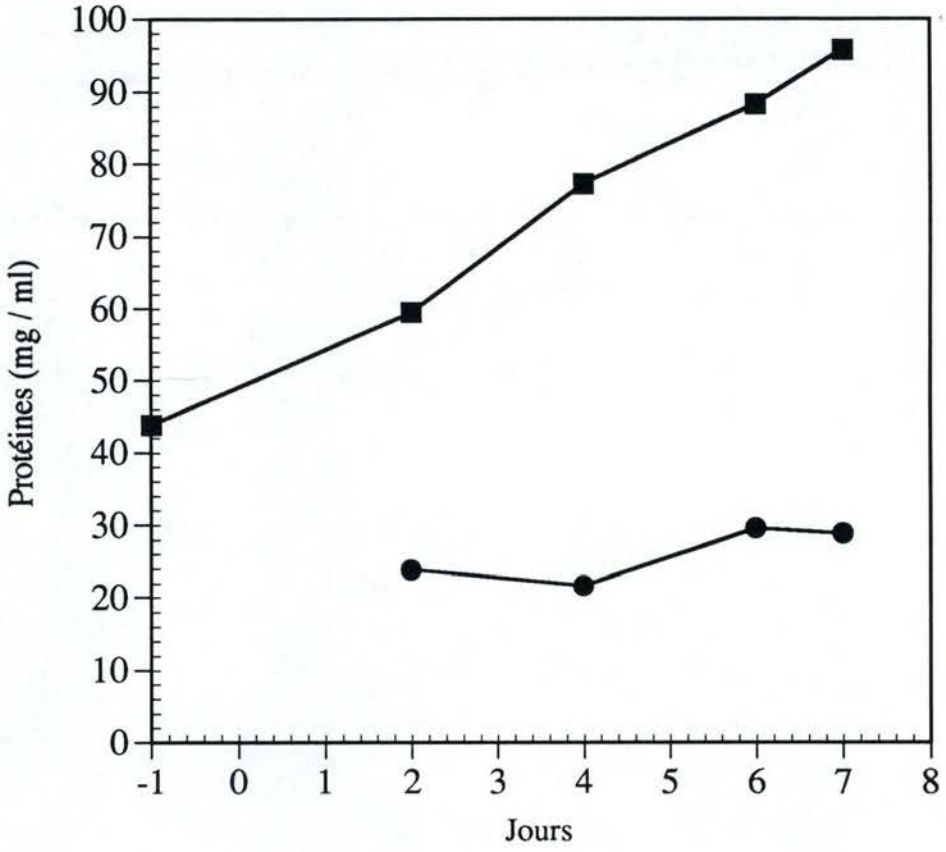
(1). Pour une concentration en sérum égale à 10 % (■).

(2). Pour une concentration en sérum égale à 0,2 % (■), 0,1 % (●) et 0,05 % (▲) et en HLA égale à 0,2 % (◆).

(B). Pour des cellules à passage en culture 48.

Pour une concentration en sérum 10 % (■) et 0,1 % (●).

(B)


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Protéines (mg / ml)
-1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Jours

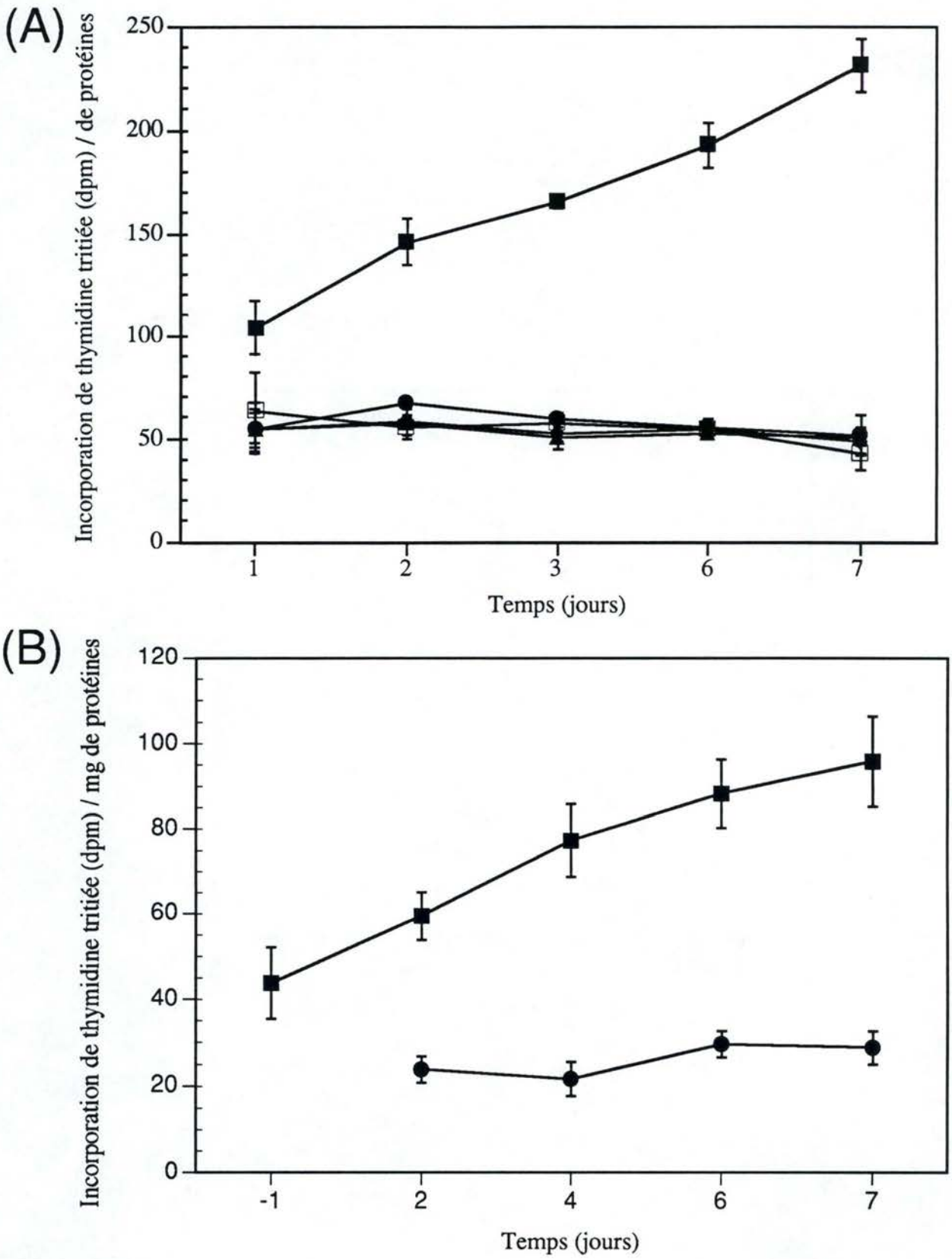


Figure IV. 11. Mesure de l'incorporation de la thymidine tritiée par mg de protéines pour des fibroblastes AG04432.

(A) Fibroblastes au passage en culture 42 pour différentes concentrations en sérum, S 10 % (■), S 0,2 % (●), S 0,1 % (▲) et S 0,05 % (◆), ou en HLA 0,2 % (⊟).

(B) Fibroblastes au passage en culture 48 pour deux concentrations en sérum, S 10 % (■) et S 0,1 % (●).

Sur la figure IV.10.A.1. et la figure IV.10.B., nous observons une forte augmentation de la quantité de protéines au cours du temps en culture pour une concentration en sérum égale à 10 % pour les cellules jeunes à passage en culture 32, ce qui va de pair avec une augmentation importante du nombre de cellules. Sur la figure IV.11.A. et B., montrant l'incorporation de thymidine tritiée par mg de protéines, on observe une forte incorporation de thymidine tritiée pour les cellules en présence de sérum 10 %. Pour de plus faibles concentrations en sérum, une quantité stable de protéines est observée au cours du temps (figure IV.10.A.2. et figure IV.10.B.). Une tendance à la baisse de cette quantité est observée après 7 jours en présence de 0,05 % en sérum. L'incorporation de thymidine tritiée est beaucoup plus faible à ces concentrations en sérum par rapport aux résultats obtenus à 10 % en sérum. L'incorporation de thymidine tritiée à ces faibles concentrations en sérum est très proche de celle observées en l'absence de sérum lorsque les celules sont incubées en présence de HLA 0,2 % sans sérum où une faible mortalité est cependant observée. De manière à optimaliser les conditions d'extraction de l'ARN, nous avons choisi d'incuber les cellules pendant 5 jours en présence de 0,1 % en sérum avant l'extraction de l'ARN. Nous avons choisi cette durée d'incubation et cette concentration en sérum pour diminuer au maximum d'une part la quantité d'ARNm spécifique du cycle cellulaire et d'autre part les risques de mortalité cellulaire. Il nous restait donc à cultiver les cellules pour obtenir des quantités suffisantes d'ARNm pour chacun des passages en culture que nous avons déterminés plus haut en fonction de leurs proportions relatives des différents morphotypes.

5. Critères d'obtention des quantités suffisantes d'ARNm en fonction des proportions des morphotypes :

Dans l'introduction, nous avons décrit plusieurs techniques permettant de purifier les ARNm spécifiques d'une population cellulaire. En suivant des critères raisonnables tels que la probabilité d'obtenir de faibles quantités d'ARNm à partir de cellules prélevées à des passages en culture précis, et la limitation de temps imparti pour un mémoire, nous avons choisi la technique d'hybridation soustractive utilisant des billes de latex, technique décrite par Hara et al. (1991) et Satoh et al. (1994). Pour utiliser cette technique, il faut une quantité minimale en ARNm cible de 1 µg et en ARNm "driver" de 10 µg. Pour nous rendre compte de l'étendue de ce travail, calculons tout d'abord le nombre de boîtes de culture de 75 cm^2 nécessaires à l'obtention de ces quantités d'ARNm (figure IV.12.).

D'après la figure IV.12., on peut retirer des informations intéressantes quant à la faisabilité de ces expériences en fonction de la quantité suffisante d'ARNm à obtenir.

	Passage en culture 19	Passage en culture 24	Passage en culture 52	Culture stationnaire de PMF
µg ARN / cm^2	0,99	0,73	0,19	0,14
µg ARNm / cm^2	-	0,0053	0,0027	0,0013
µg ARN / cellule	$9,9 \times 10^{-6}$	$7,3 \times 10^{-6}$	$1,8 \times 10^{-5}$	$2,2 \times 10^{-3}$
µg ARNm / cellule	-	$5,3 \times 10^{-8}$	$2,56 \times 10^{-7}$	$3,4 \times 10^{-6}$

Figure IV.12. Quantité d'ARN et ARNm pour différents passages en culture et pour des cultures stationnaires de PMF pour les fibroblastes AG04432.

1. Obtention d'ARNm de morphotype I :

Etant donné que nous ne recevons les cellules que lors du passage 13 et qu'il faut au moins 24 boîtes de culture pour obtenir suffisamment d'ARNm, nous ne pouvons extraire l'ARN de ces cellules avant d'atteindre le passage 18. Ceci entraîne donc une diminution trop importante de la proportion de morphotypes I si on veut obtenir une quantité suffisante d'ARNm pour l'hybridation.

2. Obtention d'ARNm de cellules permettant d'obtenir des proportions importantes en morphotypes III. (hybridation numéro 2 figure IV.6.). Les passages où l'on obtient des proportions élevées en morphotype III, varient quelque peu d'une culture à l'autre de fibroblastes de même souche (figure IV.2. et figure IV.8.). Donc, on ne peut calculer à l'avance le passage en culture précis auquel il faudra un nombre de boîtes en culture suffisant pour extraire l'ARN. Il est de ce fait nécessaire de multiplier et de maintenir en culture ce nombre élevé de boîtes lorsque l'on approche de passages en culture intéressants, pour avoir suffisamment de cellules au bon moment.

Nous venons d'expliquer comment nous avons choisi les passages en culture auxquels l'ARNm a été extrait. Le lecteur aura sans doute perçu l'étendue de ce travail de fourmi et donc la valeur précieuse de cet ARNm.

C'est pourquoi nous avons décidé de mettre au point la technique d'hybridation soustractive utilisant des billes de latex à partir d'un modèle. Expérimentalement, en fonction du matériel disponible, nous avons choisi de différencier l'ARNm de cellules Véro infectées par le BRSV à celui des cellules Véro non infectées. Dans ce cas, les cellules étant transformées, nous n'avons pas le problème lié au nombre de passages en culture.

	Fibroblastes AG04432 au passage en culture 24	Cellules Véro	Cellules Véro infectées par le BRSV
µg ARN / cm^2	0,73	0,85	0,97
µg ARNm / cm^2	$5,3 \times 10^{-3}$	0,018	0,0074
µg ARN / cellule	$7,3 \times 10^{-6}$	$5,4 \times 10^{-6}$	$8,4 \times 10^{-6}$
µg ARNm / cellule	5,3 x 10-8	$6,4 \times 10^{-7}$	$6,4 \times 10^{-8}$

Figure IV.13. Comparaison des quantités moyennes d'ARN et ARNm obtenues pour les cellules Véro, Véro infectées par le virus BRSV et les fibroblastes AG04432 au passage en culture 24.

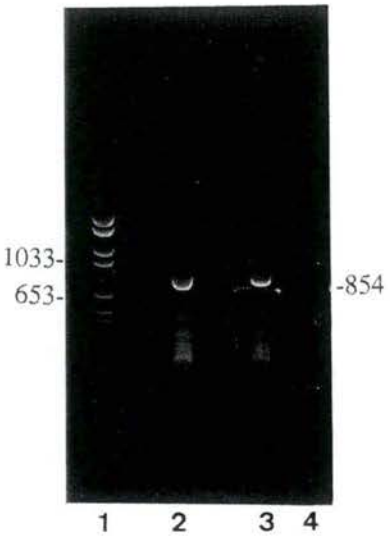


Figure IV.14. Amplification du fragment du gène d'actine réalisée par RT-PCR en utilisant les primers du gène d'actine à partir de 0,1 µg d'ARNm de cellules Véro ou de 0,1 µg d'ARNm de cellules Véro infectées par le virus BRSV. 20µl de la solution de RT-PCR sont déposés sur gel d'agarose.

Puits 1: 2 µl du marqueur de poids moléculaire VI.

Puits 2 : RT-PCR à partir d'ARNm de cellules **Véro.**

Puits 3 : RT-PCR à partir d'ARNm de cellules **Véro infectées par le BRSV.**

Puits 4 : Contrôle RT-PCR à partir d'H_2O.

II. Mise au point de la technique d'hybridation soustractive sur support solide sur des cellules en culture :

1. Extraction d'ARN total et d'ARNm des cellules Véro infectées ou non par le virus BRSV :

La première étape de ce travail consistait en la purification d'ARNm provenant de ces deux populations de cellules infectées et non infectées. En utilisant le Trizol pour l'extraction d'ARN total et le PolyAtract mRNA isolation system pour la purification des ARNm polyA, nous avons obtenu des quantités d'ARNm à partir de culture des cellules Véro assez semblables à celles obtenues à partir des fibroblastes AG04432 du passage en culture 24 (figure IV.13.).

La purification des ARNm étant terminée, nous pouvions passer à la RT-PCR.

2. Caractérisation des primers utilisés :

Nous avons fait tous nos essais de RT-PCR et d'hybridation soustractive en utilisant comme marqueurs les gènes exprimant l'actine des cellules Véro et le gène F du virus BRSV. Nous avons choisi de prendre le gène d'actine comme marqueur, car ce gène est exprimé continuellement en grande quantité dans tout type cellulaire animal (et n'est pas présent dans le génome du virus BRSV).

2.1. Amplification du fragment du gène d'actine :

Nous possédons des primers spécifiques servant à amplifier le fragment du gène d'actine bovine, appelé fragment Actine 7-856 (Degen, J.L. et al., e., 1983), la séquence de ces primers a été déterminée à partir de la séquence du gène d'actine bovine (Long Le, Lab. Immunologie-FUNDP, 1993). Comme l'actine est assez bien conservée chez les mammifères, ces primers devraient permettre d'amplifier ce gène par RT-PCR à partir de l'ARNm d'autres types cellulaires de mammifères comme les cellules simiennes Véro que nous avons employées.

A. 1. 5'-TGGGACGACATGGAGAAGATC-3'

2. 5'-GGATCAGCAAGCAGGAGTATG-3'

B. 1. 5'-CTGGAGGGAGAGGTGAATAAA-3'

2. 5'-TTCCACGATTTTTATTAGAGG-3'

Figure IV.15. A. Séquence des primers du gène de la protéine F :

1. primer s'hybridant en 5'.
2. primer s'hybridant en 3'.

B. Séquence des primers du gène d'actine :

1. primer s'hybridant en 5'.
2. primer s'hybridant en 3'.

Nous avons réalisé une RT-PCR à partir de 0,1 µg d'ARNm de cellules Véro infectées et non infectées par le BRSV à une température d'hybridation de 58°C. Sur gel d'agarose , nous avons obtenu une bande correspondant à la taille du fragment du gène d'actine (854 bp) (figure IV.14,2). Cette bande est aussi visible chez les cellules Véro infectées (figure IV.14,3). Ce qui veut dire que l'expression de l'actine cellulaire ne serait pas interférée par l'infection virale. Ces résultats permettent en outre de dire que les séquences correspondant aux primers sont conservées chez le bovin et le singe.

2.2. Amplification du fragment du gène F :

Nous avons utilisé le logiciel Oligo 4 pour déterminer les séquences de primers à partir de la séquence du gène F du virus BRSV déterminée par Walravens et al. (Walravens, K. *et al.*, 1990).

Afin de retrouver plus ou moins les mêmes conditions d'hybridation que les primers de 21-mer utilisés pour amplifier le gène d'actine de 21-mer (température d'hybridation de 58°C) permettant la réalisation simultanée des PCR, nous avons cherché des primers de même longueur (21-mer) pour le gène F, avec une énergie libre de liaison la plus élevée possible, une formation minimale de duplex ainsi que de "hairpin" tout en tenant compte de la température d'hybridation des primers de l'actine. Parmi ces primers de 21-mer, nous avons déterminé les séquences de 2 primers possédant des caractéristiques optimales en vue d'une PCR : le primer 5', de la 478 ème base à la 498ème base (avec une température d'hybridation de 62°C), et le primer 3', de la 1271 ème base à la 1291ème base, du fragment du gène F du virus BRSV (température d'hybridation de 56°C) (figure IV.15.).

Ces primers ont été testés par RT-PCR avec 0,05 µg d'ARNm de cellules Véro infectées par le virus BRSV ou non à une température d'hybridation fixée à 55°C. Sur le gel d'électrophorèse réalisé à partir du matériel obtenu par cette RT-PCR, nous observons bien une seule bande d'ADN de longueur correspondante au fragment du gène F (814 bp) chez les cellules infectées (figure IV.16,5). Aucune bande n'a été détectée chez les cellules non infectées (figure IV;16,4).

Il n'existe pas une grande différence de taille (40 bp) entre les fragments d'ADN obtenus après RT-PCR à partir des fragments des gènes d'actine et F, ce qui pourrait être gênant pour les différencier à partir d'un gel d'agarose.

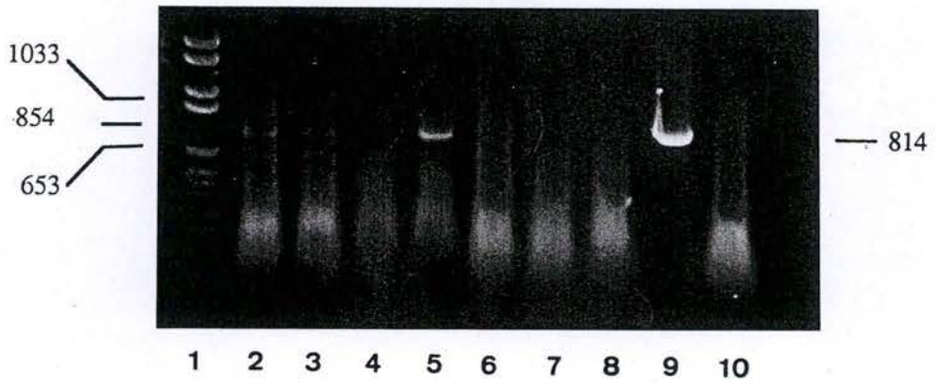


Figure IV.16. Amplification du fragment du gène de la protéine F et de l'actine par RT-PCR. Ces RT-PCR ont été effectuées en utilisant les primers du gène d'actine et / ou du gène de la protéine F à partir de 0,05 µg d'ARNm de cellules Véro et / ou de 0,05 µg d'ARNm de cellules Véro infectées par le virus BRSV. 20 µl de la solution de chaque RT-PCR sont déposés sur gel d'agarose.

1 : Marqueurs de poids moléculaire VI

2 : Cellules **Véro**, primers du gène d'**actine**.
3 : Cellules **Véro infectées**, primers du gène d'**actine**.
4 : Cellules **Véro**, primers du gène de la **protéine F**.
5 : Cellules **Véro infectées**, primers du gène de la **protéine F**.

6 : Cellules **Véro**, combinaison des primers du gène d'**actine** et du gène de la **protéine F**.
7: Cellules **Véro infectées**, combinaison des primers du gène d'**actine** et du gène de la **protéine F**.
8 : Cellules **Véro** et cellules **Véro infectées**, combinaison des primers du gène d'**actine** et du gène de la **protéine F**.

9 : RT-PCR en solution faite à partir d'un plasmide pBR94 contenant le gène de la protéine F en utilisant les primers du gène F.

10 : H_2O (Contrôle négatif)

Parmi les primers de 21-mer, nous avons recherché d'autres primers pour réaliser des RT-PCR permettant d'obtenir des fragments d'ADN des gènes d'actine et F présentant une différence de taille plus importante, mais les conditions obtenues étaient de loin beaucoup moins optimales car la température d'hybridation des primers du fragment du gène F était fort éloignée de celle des primers d'actine.

2.3. Amplification simultanée des fragments des gènes F et d'actine :

Nous avons ensuite tenter de réaliser une RT-PCR en combinant les deux paires de primers (Actine et F) qui permettrait d'obtenir simultanément et séparément les fragments du gène F et d'actine. Nous n'observons aucune bande sur gel, ce qui nous empêche de combiner ces deux paires de primers dans une même RT-PCR (figure IV.16,8). Une mise au point serait donc nécessaire si l'on veut réaliser l'amplification simultanée de ces deux séquences.

3. Identification des fragments des gènes d'actine et F amplifiés:

Afin de vérifier si les bandes d'ADN obtenues sur gel correspondent bien à l'amplification des fragments d'ADN des gènes d'actine et du gène F, nous avons étudié les sites de restriction possibles en utilisant le logiciel DNA Strider, en vue d'une restriction d'identification.

3.1. Restriction du fragment du gène d'actine :

Nous avons tout d'abord recherché un site de restriction pour le fragment du gène d'actine. Comme la séquence du gène de l'actine du singe n'a pas encore été séquencée ou pas encore enregistrée dans les banques de données Genbank et de l'EMBL, nous avons alors comparé les sites de restriction uniques obtenus pour les fragments des gènes de l'actine humaine, murine et bovine. Nous avons choisi le site de restriction qui était conservé dans deux de ces espèces (humaine et bovine) et dont la fréquence de coupure était la plus faible possible. Aucun site de restriction unique commun aux trois espèces n'a été trouvé. Le site de restriction commun à l'actine humaine et bovine est celui de l'enzyme Bst EII qui, après restriction, nous donnerait deux petits fragments de 245 bp et 609 bp.

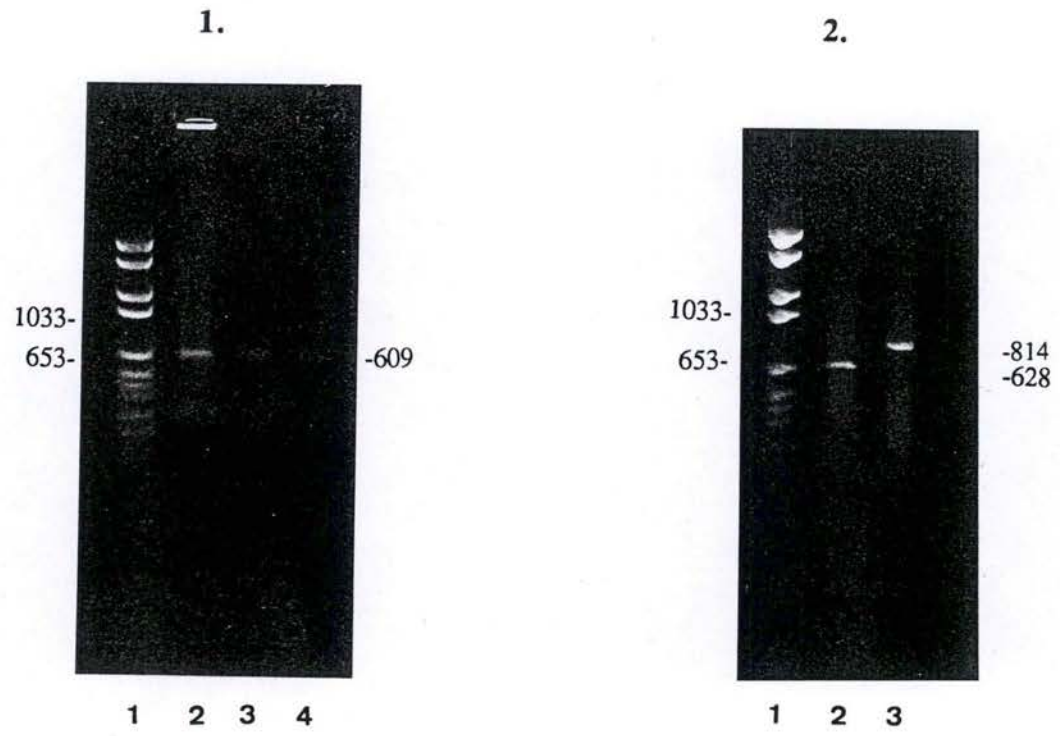


Figure IV.17.

1. Restriction du fragment du gène d'actine par Bst EII. Une RT-PCR est réalisée en solution ou sur billes oligotex avec respectivement 0,1 µg ou 1 µg d'ARNm de cellules Véro avec les primers du gène d'actine. Les RT-PCR sur billes sont réalisées soit avec 50 unités de transcriptase inverse et 500 mg / ml de BSA, soit 500 unités de transcriptase inverse sans BSA. Après purification et restriction par Bst EII des produits de RT-PCR, 20 µl de la solution de restriction sont déposés sur gel d'agarose.

1 : Marqueurs de poids moléculaire VI.
2 : RT-PCR en solution. En haut de la piste, on observe la présence d'ADN qui n'a pas migré.
3 : RT-PCR sur billes avec 50 unités de transcriptase inverse et en présence de BSA.
4 : RT-PCR sur billes avec 500 unités de transcriptase inverse sans BSA.

2. Restriction du fragment du gène de la protéine F par Eco RI. Une RT-PCR est réalisée en solution avec 0,1 µg d'ARNm de cellules Véro infectées par le BRSV avec les primers du gène de la protéine F. 20 µl de la solution de RT-PCR sont déposés sur gel d'agarose juste après PCR ou après restriction par Eco RI du produit de RT-PCR.

1 : Marqueurs de poids moléculaire VI.
2 : Restriction par Eco RI.
3 : **Sans** restriction par Eco RI.

L'expérience de restriction du fragment du gène d'actine a été faite sur les fragments d'ADN obtenus de deux RT-PCR différentes utilisant les primers spécifiques de l'actine, élué du gel d'agarose. Premièrement, nous avons réalisé une RT-PCR en solution et deuxièmement une RT-PCR sur des billes de latex (cette dernière, avec 50 et 500 unités de transcriptase inverse). Nous avons fait migré sur gel les fragments du gène d'actine obtenus de ces réactions de transcription inverse. Pour extraire l'ADN après excision de la bande d'ADN présente dans le gel réalisé après la transcription inverse, nous avons employé le Kit Geneclean (voir les matériels et méthodes).

Après restriction par l'enzyme Bst EII de l'ADN élué, nous avons fait migré les solutions issues de la réaction de restriction sur gel. Nous observons une bande correspondant au fragment restreint de plus grande taille (609 bp) (figure IV.17.1.) dans le cas des deux transcriptions inverses réalisées. Le fragment de 245 bp n'est pas visible, dû probablement à la faible quantité engagée sur gel. La bande est plus intense dans la RT-PCR en solution que sur billes. Elle est très faiblement visible sur gel pour la RT-PCR sur billes avec 500 U de RT. L'obtention du fragment de 609 bp dans cette expérience indique que le fragment 854 bp, synthétisé avec des primers d'actine et possédant le site Bst EII est bien le fragment 7-856 de l'actine. En conclusion, on peut dire que nous avons bien amplifié un fragment du gène d'actine.

3.2. Restriction du fragment du gène F :

Le fragment du gène F possède un site de restriction ECoR I qui donnerait aussi deux fragments de taille respective de 186 bp et de 628 bp.

Après restriction, nous avons fait migrer les solutions issues de la réaction de restriction sur gel. Nous observons bien une bande correspondant au fragment restreint de plus grande taille (628 bp). Nous n'observons pas la bande correspondant au fragment de petite taille. On peut dire que nous avons donc bien amplifié un fragment du gène F (figure IV.17.,2.).

A ce stade, nous avons montré que nous pouvions donc amplifier les marqueurs que nous comptions utiliser, à savoir les fragments des gènes d'actine et de F, pour vérifier l'efficacité de l'hybridation soustractive par RT-PCR. Nous pouvions à présent étudier le comportement des billes oligotex utilisées dans la méthode d'hybridation soustractive que nous avons choisie.

4. Etude du comportement des billes oligotex-dT :

4.1. Synthèse d'ADNc sur billes :

Nous avons d'abord testé si la transcriptase inverse peut utiliser comme matrice un ARNm retenu sur un support solide tel que les billes oligotex. Pour ce faire, nous avons réalisé une transcription inverse à partir de 1 µg d'ARNm de cellules Véro. L'emploi de dATP-^{32}P radioactif nous permet de quantifier la synthèse de l'ADN sur les billes oligotex par mesure de la radioactivité.

Nous avons utilisé la transcriptase inverse de l'AMV (voir Matériels et méthodes) qui donnait un meilleur rendement, en nous basant sur l'article de Kuribayashi-Ohta et al. (1993) où 5 transcriptases inverses provenant d'espèces différentes ont été testées et comparées dans la synthétise de l'ADNc sur billes.

Après synthèse, nous avons pris 1 µl de la suspension de billes afin de mesurer la radioactivité totale associée aux nucléotides marqués. Après centrifugation et obtention du culot composé du complexe ADNc-ARNm-billes oligotex, 1 µl de surnageant est prélevé pour effectuer une mesure de la radioactivité associée aux nucléotides marqués non incorporés. Ensuite 5 lavages des billes par 500 µl de TE (pH 8,3) sont effectués. Après chaque lavage, suivi d'une centrifugation, 1 µl de surnageant est prélevé et la radioactivité est mesurée. Enfin, les complexes ADNc-ARNm-billes oligotex sont resuspendus dans 50 µl de TE dont 1 µl est prélevé pour mesurer la radioactivité des nucléotides marqués incorporés dans l'ADNc, se trouvant sur les billes oligotex. La radioactivité associée aux nucléotides marqués mesurée au niveau des complexes ADNc-ARNm-billes oligotex est faible, ce qui indique qu'il y a bien eu synthèse d'ADNc sur les billes. Nous avons calculée le rendement de la synthèse d'ADN simple brin sur billes, ce rendement s'élève à 9,8 % de la quantité d'ARNm engagée.

N.B. Notons que les billes oligotex se remettent facilement et rapidement en suspension après la centrifugation. Par contre, si elles sont centrifugées trop longtemps, le culot est plus résistant.

4.2. Saturation des billes :

Afin d'éviter les fixations non spécifiques de la transcriptase inverse sur les billes lors de la synthèse d'ADNc, les billes devraient être saturées. Certains auteurs emploient de l'albumine de sérum bovin pour saturer la surface des billes (Kuribayashi-Ohta et al., 1993). D'autres auteurs utilisent l'enzyme transcriptase inverse en excès très important, ce qui s'avère très onéreux (Hara et al., 1991).

Pour déterminer une fois pour toutes laquelle de ces deux méthodes est la plus efficace, dans nos conditions expérimentales, nous les avons comparées en effectuant deux transcriptions inverses à partir de 1 µg d'ARNm de cellules Véro. Pour la première, de l'albumine est ajoutée à une concentration de 500 mg / ml en présence de 40 unités de transcriptase inverse dans un volume de réaction final de 50 µl. Dans la seconde, 500 unités de transcriptase inverse sont présentes sans albumine dans un volume de réaction final de 50 µl. Ces transcriptions inverses sont faites avec du dATP marqué au ^{32}P.

La radioactivité a été mesurée à partir du surnageant obtenu lors de 5 lavages successifs et après resuspension des billes comme au point 4.1. des résultats. On peut observer que la synthèse d'ADNc est plus importante en présence d'albumine, la radioactivité associée aux nucléotides marqués mesurée étant plus importante dans la solution où les billes sont resuspendues. Nous avons calculée le rendement de la synthèse d'ADN simple brin sur billes avec BSA, ce rendement s'élève à 12,3 % de la quantité d'ARNm engagée. Le rendement de la synthèse d'ADN simple brin sur billes sans BSA s'élève à 4,7 % de la quantité d'ARNm engagée.

Il était possible à ce moment que les billes puissent interférer sur la mesure de la radioactivité associée aux nucléotides marquées. Pour tester cette hypothèse, 1 µl de dATP marqués au ^{32}P ajouté à l'Aqua luma seul est comparée à la mesure obtenue lorsque 1 µl de dATP ^{32}P plus 5 µl de billes oligotex 5 % sont ajoutés à l'Aqua luma. Les résultats obtenus ne montrent qu'une très faible différence de 0,05 % entre ces mesures, ceci rejetant l'hypothèse d'une interférence des billes dans la mesure de la radioactivité associée aux nucléotides marqués.

Notons de plus que les billes précipitent beaucoup plus difficilement lors des centrifugations dans le cas où 500 unités de transcriptase inverse étaient présentes dans le tube. Cela est probablement dû à la quantité importante de glycérol se trouvant dans le tampon de stockage de l'enzyme. Ce problème a été résolu en diluant cette solution avec 70 µl de TE, ce qui a facilité la précipitation des billes.

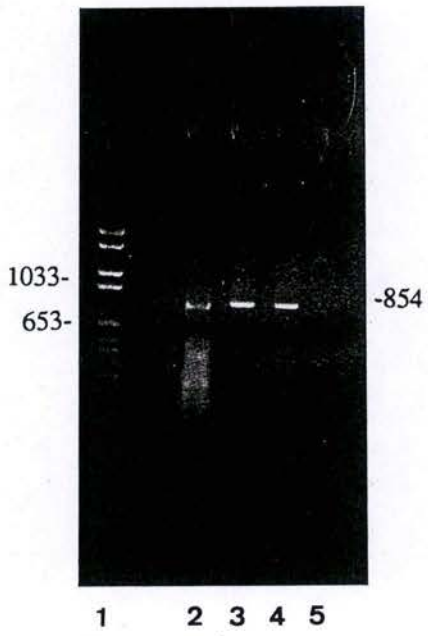


Figure IV.18. Comparaison des résultats de RT-PCR utilisant les primers du gène d'actine, soit en solution, soit sur billes oligotex respectivement à partir de 0,1 µg ou 1 de µg d'ARNm de cellules Véro. Ces RT-PCR ont été réalisées soit en présence de 500 unités de transcriptase inverse sans BSA ou de 50 unités de transcriptase inverse et 500 mg / ml de BSA. 20 µl de la solution de chaque RT-PCR sont déposés sur gel d'agarose.

1 : Marqueurs de poids moléculaire VI.

2 : RT-PCR en solution .
3 : RT-PCR sur billes avec **50** unités de transcriptase inverse et BSA.
4 : RT-PCR sur billes avec **500** unités de transcriptase inverse sans BSA.

5 : H_20 (Contrôle négatif)

4.3. PCR à partir de l'ADNc synthétisé sur billes oligotex :

4.3.1. Comparaison des résultats obtenus en RT en présence d'un excès de transcriptase inverse et en présence de BSA :

Une autre façon de vérifier la synthèse d'ADNc sur billes est de réaliser une PCR sur des ADNc-oligotex utilisant les primers d'actine à partir des réactions de transcription inverse sur billes avec 500 unités de transcriptase inverse sans BSA (expérience A) ou avec 50 unités de transcriptase inverse avec BSA (expérience B).

Auparavant, il faut bien entendu chauffer ces solutions jusqu'à ébullition et les laver deux fois avec du TE pour éliminer l'ARNm resté hybridé à l'ADNc lors de la transcription inverse.

Après PCR utilisant les primers du fragments du gène d'actine, nous avons fait migré l'ADN amplifié sur gel d'agarose 1,5 %. Nous avons obtenu une bande de taille correcte correspondant au fragment 7-856 de l'actine, que ce soit à partir du matériel obtenu dans l'expérience A ou B (figure IV.18,3-4). L'intensité de cette bande est similaire dans les deux cas. En conclusion, l'ADNc est synthétisé sur les billes dans les deux cas et le rendement de la transcription inverse avec 500 unités d'enzyme sans BSA n'est pas plus favorable que celui obtenu avec 50 unités d'enzymes en présence de BSA servant à saturer les billes. Il semble préférable d'opter pour la réaction en présence de BSA qui est beaucoup moins onéreuse.

4.3.2. Comparaison de la transcription inverse sur billes ou en solution :

Afin de comparer le rendement de la transcription inverse en solution et sur billes, nous avons réalisé deux RT-PCR, l'une en solution, et l'autre sur billes oligotex, à partir de 0,4 µg d'ARNm. Nous avons fait migré les produits de cette RT-PCR sur gel. On y observe que l'efficacité de la RT-PCR en solution est plus faible que celle de la RT-PCR sur billes (figure IV.18.).

L'efficacité de la transcription inverse serait donc meilleure sur un support solide qu'en solution. Ceci a déjà été observé par Frech B. (Frech, B. et Peterhans, E., 1994).



Figure IV.19. Etude de la résistance des complexes ADNc-billes oligotex au cours du temps. Une RT a été réalisée sur billes oligotex à partir de 1 µg d'ARNm de cellules Véro en utilisant 50 unités de transcriptase inverse, 500 mg / ml de BSA et les primers du gène d'actine. Ensuite, une PCR a été réalisée sur ces billes à différents temps (jours). 25 µl de la solution de chaque PCR sont déposés sur gel d'agarose.

1 : Marqueurs de poids moléculaire VI.

2 : **jour 0.**
3 : H_2O (Contrôle négatif) au jour 0.
4 : **jour 3**
5 : H_2O (Contrôle négatif) au jour 3.
6 : **jour 6**
7 : H_2O (Contrôle négatif) au jour 6.
8 : **jour 10**
9 : H_2O (Contrôle négatif) au jour 10.

10 : Marqueurs de poids moléculaire Mass Ladder.

4.4. Etude de la résistance des complexes ADNc-billes oligotex :

Afin d'estimer le temps pendant lequel l'ADNc synthétisé sur des billes peut être conservé à 4°C sans être dégradé, nous avons étudié l'évolution des complexes ADNc ^{32}P synthétisé sur billes au cours du temps. Pour ce faire, nous avons fait des PCR tous les 3 ou 4 jours sur les mêmes complexes ADNc-billes (jours 0, 3, 6, 10) tout en lavant les billes avec du TE après trois ébulitions successives, entre chaque PCR.

Les résultats obtenus sur gel (figure IV.19.) montrent que l'ADNc n'est pas dégradé puisque une bande correspondant au fragment du gène d'actine est toujours visible sur le gel après le dixième jour. Certes, la bande du jour 10 est de plus faible intensité que celle observée au jour 0. Cela peut se comprendre puisque cet ADNc est marqué au phosphore 32, ce qui peut accélérer sa dégradation. De plus, au cours des manipulations, il peut y avoir des pertes de matériel. L'ADNc sur les billes de latex pourrait se conservé à 4°C pendant un temps assez long.

5. Hybridation soustractive :

5.1. Premier essai d'hybridation soustractive :

Après avoir extrait les ARNm et mis au point la RT-PCR et la manipulation des billes oligotex, nous avons tenté de réaliser une première hybridation soustractive des cellules Véro infectées ou non par le virus BRSV. Dans cette expérience, nous avons utilisé 10 µg d'ARNm de cellules Véro driver servant à entraîner tout ce qui est commun aux deux populations d'ARNm et 1 µg d'un mélange d'ARNm de cellules Véro et d'ARNm de cellules Véro infectées par le virus BRSV (cible). Ce mélange est composé de 0,8 µg d'ARNm de cellules Véro et de 0,2 µg d'ARNm de cellules Véro infectées. Pourquoi avoir utilisé ce mélange? Nous savons par expérience que, dans des conditions expérimentales d'infection virale, il reste encore une proportion importante d'ARNm cellulaire. Supposons qu'il reste encore 50 % d'ARNm cellulaire, à partir de 10 µg d'ARNm driver de cellules Véro et de 1 µg d'ARNm cible de cellules Véro infectées, nous trouvons un rapport de 20 contre 1 entre l'ARNm de cellules Véro et l'ARNm viral. Pour augmenter ce rapport, et donc nous situer plus près d'un modèle de purification d'ARNm spécifiques en faibles quantités, nous avons dilué 0,2 µg d'ARNm de cellules infectées dans 0,8 µg d'ARNm de cellules non infectées. Ceci nous amène finalement à un rapport de 109 contre 1 (10,9 µg / 0,1µg) entre l'ARNm des cellules Véro et l'ARNm viral

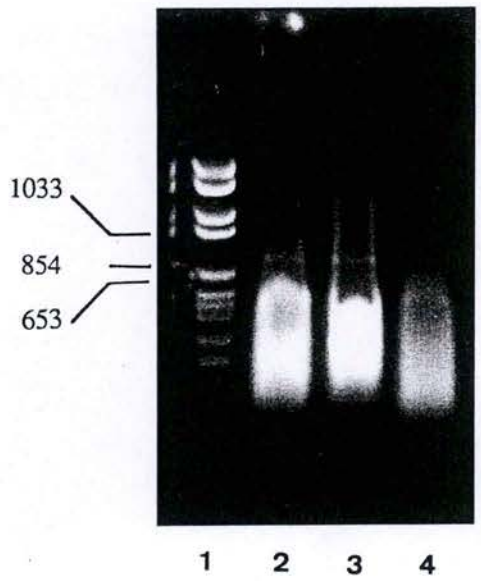


Figure IV.20. RT-PCR dans le tampon TMKN. 25 µl de la solution de RT-PCR réalisée à partir de 0,05 µg d'ARNm de cellules Véro et en utilisant les primers du gène d'actine sont déposés sur gel d'agarose.

1 : Marqueurs de poids moléculaire VI.

2 : RT-PCR dans le tampon TMKN.
3 : RT-PCR en conditions normales.

4 : H_2O (Contrôle négatif).

lors d'un mélange de l'ARNm driver (10 µg), 0,8 µg d'ARNm de cellules Véro non infectées et 0,1 µg d'ARNm viral contenu dans 0,2 µg d'ARNm de cellules Véro infectées.

Nous avons répété 5 fois l'étape de soustraction en reprenant l'ARNm soustrait de l'étape précédente et en le mettant à nouveau en contact des billes ADNc-oligotex. A la fin de la 2ème, 4ème et 5ème étape, nous avons prélevé un aliquot de la solution d'ARNm soustrait afin de l'analyser. Sur chacun de ces échantillons, nous avons fait une RT-PCR, avec les primers du fragment d'actine et du gène F, permettant ainsi de vérifier le contenu des échantillons soustraits. Le volume de l'aliquot prélevé après la deuxième soustraction correspondait théoriquement à 20 ng d'ARNm de cellules Véro infectées sur 200 ng au départ. Après la cinquième soustraction, le volume soustrait contenant théoriquement 10 ng d'ARNm des cellules Véro infectées pour ne pas épuiser tout le matériel obtenu après ces soustractions. Nous avons aussi pris un aliquot du mélange de départ comme contrôle (10 ng) avant toute étape de soustraction.

Après la première étape de soustraction réalisée, il devait rester des ARNm d'actine, la soustraction ne se faisant pas en une seule étape. Au cours des étapes de soustraction suivantes, nous devions voir diminuer la quantité d'ARNm d'actine cellulaire. En ce qui concerne l'ARNm du virus, sa quantité devait rester constante au cours des différentes étapes exceptées les pertes de matériel au cours des manipulations. Après la dernière étape de soustraction, seul l'ARNm de la protéine F virale devait être présent.

Les aliquots d'ARNm soustraits sur lesquels nous voulons réaliser une RT-PCR se trouvent dans le tampon TMKN de l'hybridation. La transcriptase inverse est-elle toujours active dans ce tampon? Pour vérifier, nous avons alors effectué une transcription inverse en solution à partir de 0,05 µg d'ARNm de cellules Véro mis dans le même tampon salin TMKN. Après avoir fait migrer sur gel l'échantillon issu de cette RT-PCR, nous observons une bande correspondant au fragment 7-856 du gène de l'actine sur le gel (figure IV.20.). Ce qui nous a autorisé à faire directement la RT-PCR sur nos échantillons en tampon TMKN sans devoir les purifier, ce qui éviterait des pertes supplémentaires de matériel.

Après avoir fait la RT-PCR sur les échantillons issus des différentes étapes de soustraction et la migration des produits de réaction sur gel, nous n'observons aucune bande correspondant aux fragments des gènes d'actine ou de F après soustraction (figure IV.21.).

Nous avons testé expérimentalement différentes hypothèses explicatives :

- Nous avons testé si la quantité d'ADN amplifié, se trouvant dans le quart de la solution de réaction de RT-PCR prélevée, était suffisante pour être visualisée sur le gel. Nous avons alors purifié et concentré les 3/4 restants des produits de

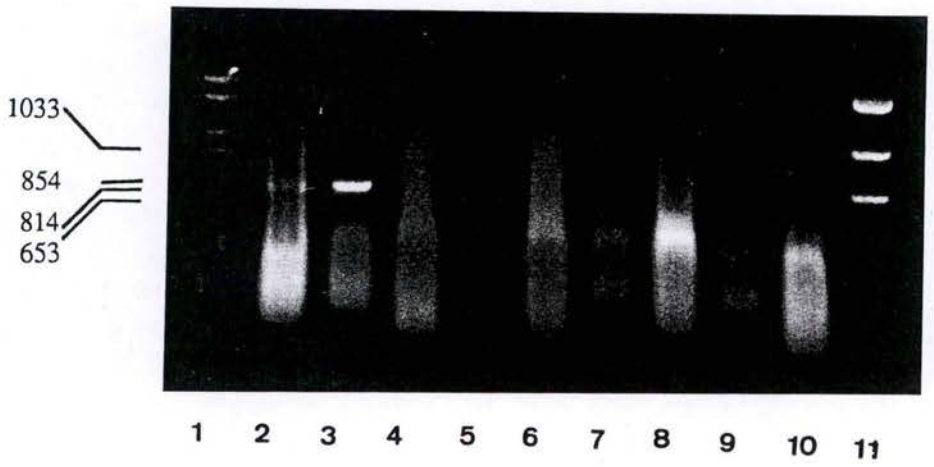


Figure IV.21. Analyse de l'ARNm soustrait après le premier essai d'hybridation soustractive. Une RT-PCR a été réalisée en utilisant les primers du gène d'actine ou du gène de la protéine F, soit à partir de l'ARNm de départ (avant toute soustraction), soit à partir de l'ARNm soustrait après la 2ème, 4ème ou 5ème étape de soustraction. 25 µl de la solution de chaque RT-PCR sont déposés sur gel d'agarose.

1 : Marqueurs de poids moléculaire VI.

2 : ARNm **de départ** +.primers du gène d'**actine**
3 : ARNm **de départ** + primers du gène de la **protéine F**.

4 : ARNm soustrait de la **2ème étape** + primers du gène d'**actine**.
5 : ARNm soustrait de la **2ème étape** + primers du gène de la **protéine F**.

6 : ARNm soustrait de la **4ème étape** + primers du gène d'**actine**.
7 : ARNm soustrait de la **4ème étape** + primers du gène de la **protéine F**.

8 : ARNm soustrait de la **5ème étape** + primers du gène d'**actine**.
9 : ARNm soustrait de la **5ème étape** + primers du gène de la **protéine F**.

10 : H_20 (Contrôle négatif).

11 : Marqueurs de poids moléculaire Mass Ladder.

la RT-PCR en utilisant un kit de purification d'ADN (Wizard PCR preps DNA purification System, Promega). Nous avons mis la totalité des échantillons purifiés sur gel et nous n'observons toujours aucune bande (figure IV.22.).

- Nous avons vérifié que de l'ADNc avait bien été synthétisé sur les billes à partir de l'ARNm de cellules Véro en utilisant les primers du gène d'actine. Après PCR sur ces billes, nous observons sur gel une bande correspondant à l'actine, ce qui nous permet de confirmer que l'ADNc sur les billes a bien été synthétisé à partir de l'ARNm et qu'il n'est pas dégradé (figure IV.23.).

- Pour essayer de voir si les ARNm sont présents dans la dernière étape de soustraction, nous avons purifié, par une précipitation à l'éthanol, la solution d'ARNm restant de la dernière étape de soustraction contenant normalement entre autres ARNm viraux soustraits, l'ARNm du gène F. Nous avons fait une RT-PCR sur cet échantillon et aucune bande n'est observée (figure IV.24.).

- La présence d'ARNm cellulaire communs doit aussi être vérifiée. Après chaque hybridation soustractive, nous avons fait bouillir les hybrides ADNc-ARNm sur billes, récupéré le surnageant normalement composé des ARN communs aux deux populations d'ARNm c'est-à-dire les ARNm cellulaires, et purifié ces surnageants par une précipitation à l'éthanol. Nous avons fait une RT-PCR à partir du matériel récolté après précipitation. Après migration sur gel, une bande correspondant au fragment d'actine a été observée pour les ARNm communs après la deuxième étape de soustraction (figure IV.25.puits de 1 à 11). Ceci signifie qu'au cours de cette étape de soustraction, il y a bien eu f ixation d'ARNm d'actine sur les billes oligotex sur lesquelles sont synthétisés les ADNc. Cependant les autres résultats sont négatifs.

Plusieurs autres hypothèses peuvent être avancées à ce stade du travail pour expliquer ces résultats négatifs :

1. Une perte importante de matériel au cours des manipulations.

2. Une éventuelle contamination par la RNase lors des différentes étapes de manipulation.

3. Une saturation incomplète des polyA ou polyT est peut-être envisagable, ce qui conduit à une soustraction non spécifique par les polyA et les polyT. Par exemple, à chaque fois que nous centrifugeons et que nous retirons le surnageant, nous entraînons toujours un peu de billes avec le surnageant. En admettant que le surnageant prélevé corresponde à l'ARNm soustrait (cible) et qu'il reste un peu de billes dans ce surnageant dont les oligonucléotides polydT ne sont pas

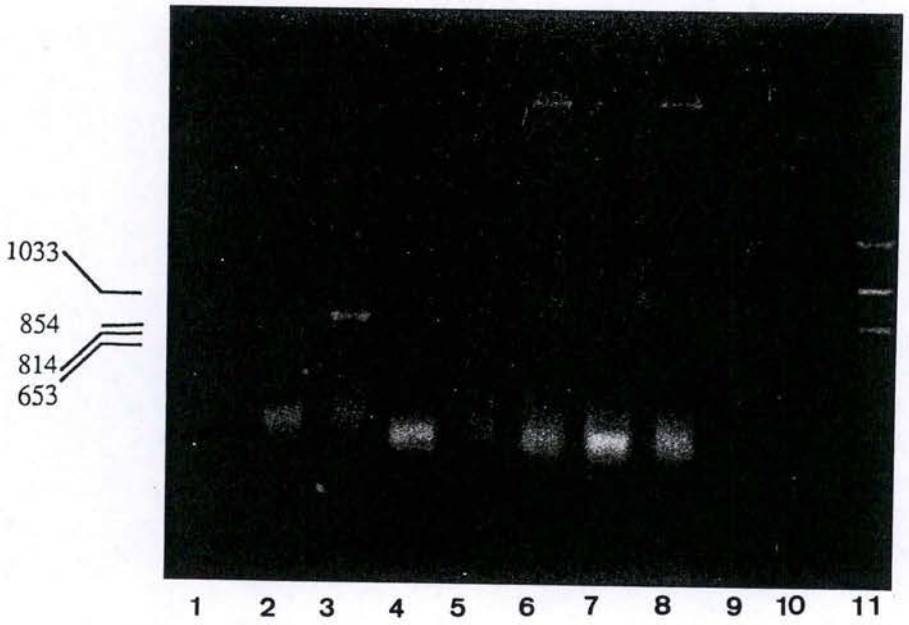


Figure IV.22. Analyse de l'ARNm soustrait après le premier essai d'hybridation soustractive après purification de l'ADN obtenu après RT-PCR. Une RT-PCR a été réalisée en utilisant les primers du gène d'actine ou du gène de la protéine F, soit à partir de l'ARNm de départ (avant toute soustraction), soit à partir de l'ARNm soustrait après la 2ème, 4ème ou 5ème étape de soustraction. 10 µl de la solution de purification des produits de ces RT-PCR sont déposés sur gel d'agarose.

1 : Marqueurs de poids moléculaire VI.

2 : ARNm **de départ** +.primers du gène d'**actine**
3 : ARNm **de départ** + primers du gène de la **protéine F**.

4 : ARNm soustrait de la **2ème étape** + primers du gène d'**actine**.
5 : ARNm soustrait de la **2ème étape** + primers du gène de la **protéine F**.

6 : ARNm soustrait de la **4ème étape** + primers du gène d'**actine**.
7 : ARNm soustrait de la **4ème étape** + primers du gène de la **protéine F**.

8 : ARNm soustrait de la **5ème étape** + primers du gène d'**actine**.
9 : ARNm soustrait de la **5ème étape** + primers du gène de la **protéine F**.

10 : H_2O (Contrôle négatif).

11 : Marqueurs de poids moléculaire Mass Ladder.

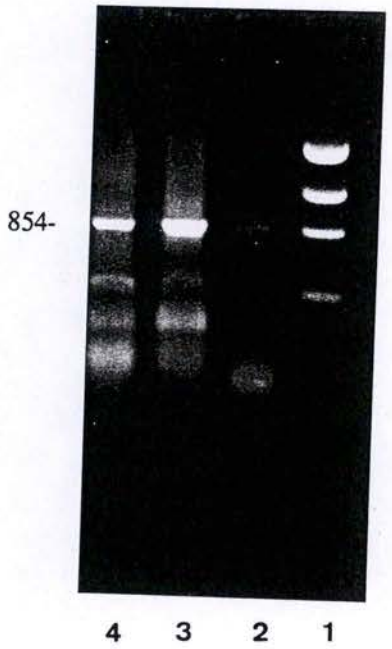


Figure IV.23. PCR sur les complexes ADNc-billes après soustraction. Après 5 étapes de soustraction, une PCR sur 5 ou 10 µl de solution de complexes ADNc-oligotex a été réalisée en utilisant les primers du gène d'actine. 25 µl de la solution de chaque RT-PCR sont déposés sur gel d'agarose.

1 : Marqueurs de poids moléculaire Mass Ladder.

2 : H_20 (Contrôle négatif).

3 : PCR sur 10 µl de solution de complexes ADNc-oligotex.
4 : PCR sur 5 µl de solution de complexes ADNc-oligotex

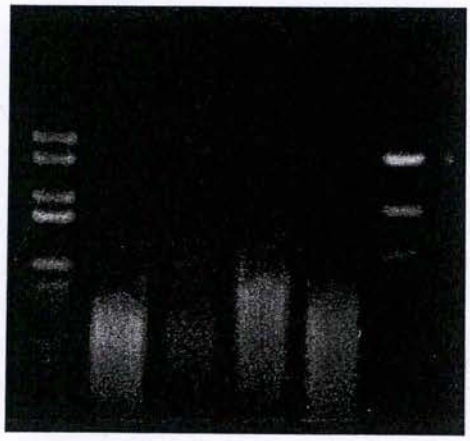


Figure IV.24. Analyse de l'ARNm soustrait restant de la dernière étape du premier essai d'hybridation soustractive après leur purification. Une RT-PCR a été réalisée en utilisant les primers du gène d'actine ou du gène de la protéine F à partir de 10 µl d'ARNm soustrait et purifié après la 5ème étape. 25 µl de la solution de chaque RT-PCR sont déposés sur gel d'agarose.

1 : Marqueurs de poids moléculaire Mass Ladder.

2 : primers du gène d'**actine**.

3 : primers du gène de la **protéine F**.

4 : H_20 (Contrôle négatif).

5 : Marqueurs de poids moléculaire Mass Ladder.

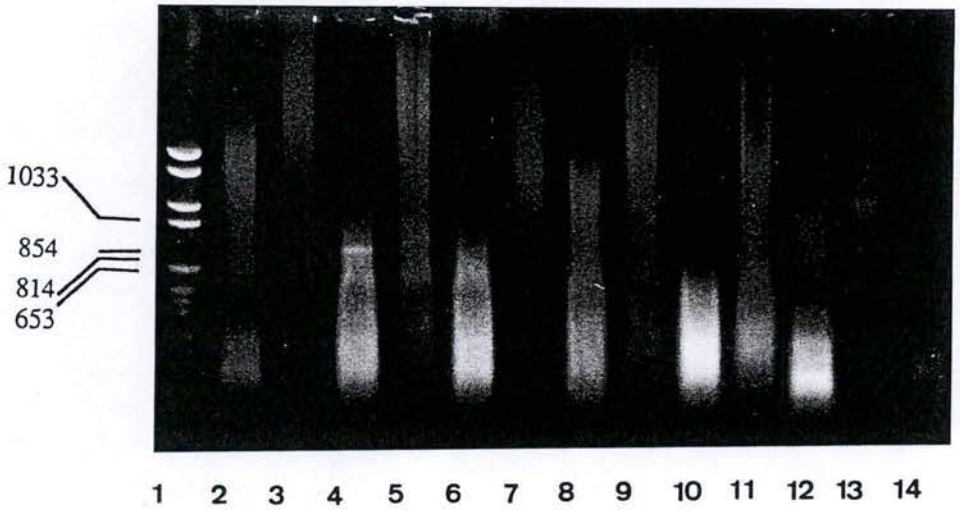

1033
854
814
653
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

Figure IV.25. Analyse de l'ARNm commun après le premier essai d'hybridation soustractive. Une RT-PCR a été réalisée en utilisant les primers du gène d'actine ou du gène de la protéine F, à partir de l'ARNm commun après la 1ère, 2ème, 3ème, 4ème ou 5ème étape de soustraction. 25 µl de la solution de chaque RT-PCR sont déposés sur gel d'agarose.

1 : Marqueurs de poids moléculaire Mass Ladder.

2 : ARNm commun après la **1ère étape** + primers du gène d'**actine**.
3 : ARNm commun après la **1ère étape** + primers du gène de la **protéine F**.

4 : ARNm commun après la **2ème étape** + primers du gène d'**actine**.
5 : ARNm commun après la **2ème étape** + primers du gène de la **protéine F**.

6 : ARNm commun après la **3ème étape** + primers du gène d'**actine**.
7 : ARNm commun après la **3ème étape** + primers du gène de la **protéine F**.

8 : ARNm commun après la **4ème étape** + primers du gène d'**actine**.
9 : ARNm commun après la **4ème étape** + primers du gène de la **protéine F**.

10 : ARNm commun après la **5ème étape** + primers du gène d'**actine**.
11 : ARNm commun après la **5ème étape** + primers du gène de la **protéine F**.

Analyse de l'ARNm restant de la dernière étape du second essai d'hybridation soustractive. Une RT-PCR a été réalisée en utilisant les primers du gène d'actine ou du gène de la protéine F, à partir de l'ARNm restant après la 4ème étape de soustraction. 25 µl de la solution de chaque RT-PCR sont déposés sur gel d'agarose.

12 : ARNm restant après la **4ème étape** + primers du gène d'**actine**.
13 : ARNm restant après la **4ème étape** + primers du gène de la **protéine F**.

14 : H_2O (Contrôle négatif).

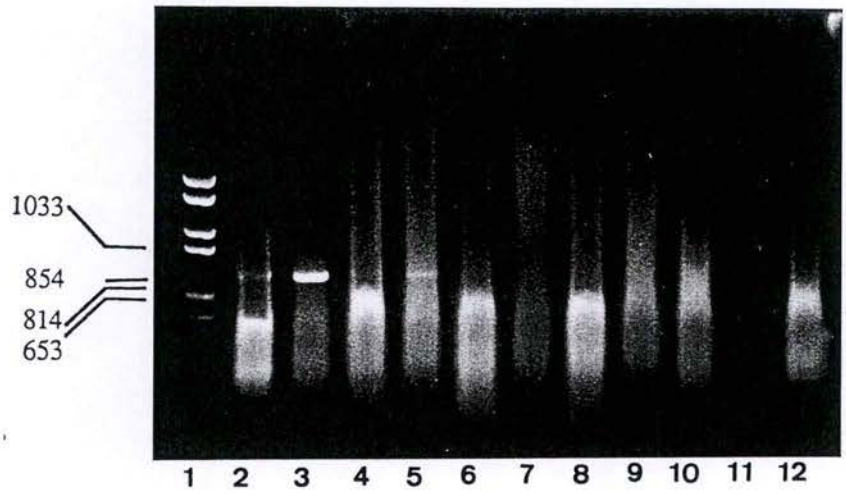


Figure IV.26. Analyse de l'ARNm soustrait après le second essai d'hybridation soustractive. Une RT-PCR a été réalisée en utilisant les primers du gène d'actine ou du gène de la protéine F, soit à partir de l'ARNm de départ (avant toute soustraction), soit à partir de l'ARNm soustrait après la 1ère, 2ème, 3ème ou 4ème étape de soustraction. 25 µl de la solution de chaque RT-PCR sont déposés sur gel d'agarose.

1 : Marqueurs de poids moléculaire VI.

2 : ARNm **de départ** +.primers du gène d'**actine**
3 : ARNm **de départ** + primers du gène de la **protéine F**.

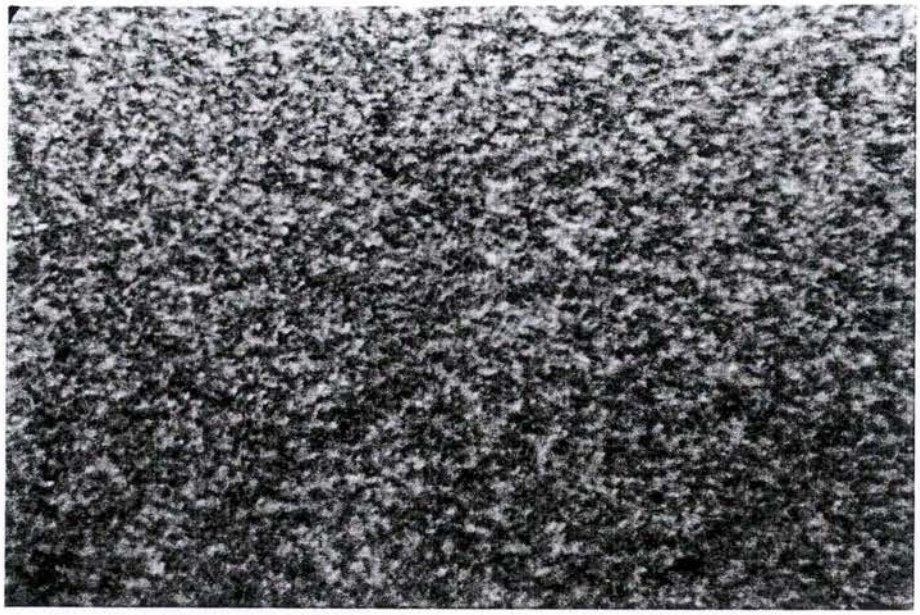
4 : ARNm soustrait de la **1ère étape** + primers du gène d'**actine**.
5 : ARNm soustrait de la **1ère étape** + primers du gène de la **protéine F**.

6 : ARNm soustrait de la **2ème étape** + primers du gène d'**actine**.
7 : ARNm soustrait de la **2ème étape** + primers du gène de la **protéine F**.

8 : ARNm soustrait de la **3ème étape** + primers du gène d'**actine**.
9 : ARNm soustrait de la **3ème étape** + primers du gène de la **protéine F**.

10 : ARNm soustrait de la **4ème étape** + primers du gène d'**actine**.
11 : ARNm soustrait de la **4ème étape** + primers du gène de la **protéine F**.

12 : H_20 (Contrôle négatif).



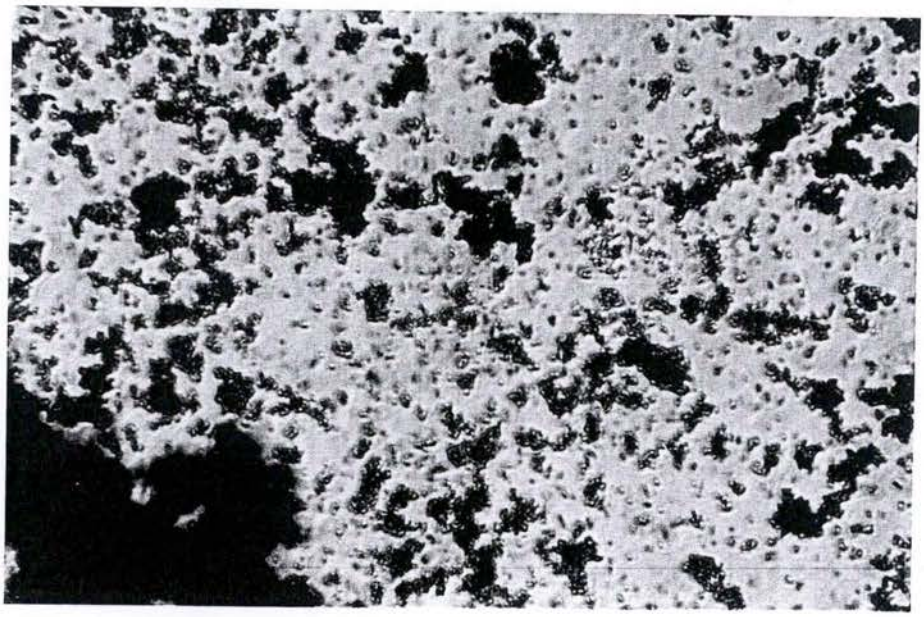


Figure IV.27. En haut, billes Oligo(dT)30 provenant de la solution stock à 10 %. En bas, billes oligotex(dT)30 agglutinées après tentative d'hybridation soustractive (grossissement 400 x).

masqués, on risquerait d'entraîner ce messager soustrait "cible" par une hybridation entre ses polyA, si ceux-ci sont mal saturés, et les polyT des billes.

4. De plus, nous ne pouvons pas dire que la soustraction ne se soit pas faite puisqu'il ne reste plus d'ARNm d'actine dans les ARNm soustraits qui est le marqueur de la population d'ARNm driver, les ARNm communs sont donc accrochés aux billes, ou perdus.

5. Une solution beaucoup moins probable mais cependant envisagable serait qu'il existerait un ARNm de cellules Véro qui aurait des homologies de séquences avec l'ARNm de la protéine F.

Vu le nombre important des différents facteurs pouvant intervenir, nous avons effectué un nouvel essai d'hybridation soustractive.

5.2. Deuxième essai d'hybridation soustractive :

Nous avons recommencé cette soustraction en utilisant les mêmes complexes ADNc-billes oligotex synthétisés lors de la première soustraction, puisque l'ADNc n'était pas dégradé. Cette fois, nous avons réalisé un mélange plus riche en ARNm de virus (0,8 µg d'ARNm de cellules Véro et 0,4 µg d'ARNm de cellules Véro infectées) en espérant pouvoir détecter plus facilement les ARNm de virus cible. Ceci nous conduit finalement à un rapport de 55 contre 1 (11 µg / 0,2 µg) entre l'ARNm des cellules Véro et l'ARNm viral lors d'un mélange de l'ARNm driver (10 µg), 0,8 µg d'ARNm de cellules Véro et 0,2 µg d'ARNm viral contenu dans 0,4 µg d'ARNm de cellules Véro infectées.

Lors de cette hybridation soustractive, nous avons effectué que 4 étapes de soustraction. Nous avons prélevé un aliquot issu de la première, troisième et quatrième étape de soustraction pour réaliser la RT-PCR. Le volume prélevé pour cette RT-PCR contenait à 30 ng d'ARNm de cellules Véro infectées. Nous avons également précipité les ARNm communs après ébulition des hybrides ADNc-ARNm sur billes et autres comme précédemment.

Les résultats obtenus après ces différentes RT-PCR ne sont guère concluants (figure IV.26 et figure IV. 25 puits 12 à 13). En effet, après la première soustraction nous pouvons observer une bande correspondant au gène F mais pas de bande correspondant au gène d'actine, ce qui signifierait que la soustraction aurait été faite en une fois, ce qui est peu probable au vu de la littérature (Hara, E. *et al.*, 1991; Satoh, Y. *et al.*, 1994). Toutefois, on observe que la bande correspondant au fragment du gène de la protéine F est de plus faible intensité par rapport à celle obtenue sur les ARNm de départ avant soustraction, ce qui donne une estimation des pertes au cours des manipulations. Après les étapes de soustraction suivantes, nous n'observons plus de

bande correspondant au gène du virus ce qui pourrait signifier qu'il est soit dégradé ou soustrait de façon "non spécifique" et qu'il y ait des pertes au cours des manipulations.

Malheureusement, lors de cette soustraction, les billes se sont agglutinées dès la première étape (figure IV.27.) ceci compromettant les autres étapes. De plus, elles collaient au tube et aux embouts, avec pour conséquence une perte importante de matériel. Un problème d'hybridation non spécifique est aussi probable : la saturation des polyT des billes pourrait se faire de manière incomplète à cause d'un emprisonement des billes à l'intérieur des aggrégats de billes. Il est possible que cette agglutination soit dû au temps plus long de conservation de celles-ci.

5.3. Troisième essai d'hybridation soustractive :

Pour palier à l'éventuel effet du temps de conservation sur l'aggrégation des billes, nous avons donc synthétisé de l'ADNc sur un nouveau lot de billes à partir de 10 µg d'ARNm de cellules Véro. Un mélange des ARNm des cellules Véro infectées ou non comprenant les mêmes proportions que précédemment est réalisé. Cette fois ci, nous avons réduit à 3 le nombre d'étapes de soustraction. Lors de la première étape de ce troisième essai de soustraction, l'agglutination des billes s'est directement produite. Nous avons prélevé un aliquot issu de la première, deuxième et troisième étape de soustraction pour réaliser la RT-PCR. Nous avons également précipité les ARNm communs restants après ébulition des hybrides ADNc-ARNm. Une RT-PCR a été réalisée sur ces échantillons. Aucune bande ne fut observé sur le gel.

A quoi pourrait être due cette agglutination des billes oligotex, empêchant ainsi un bon déroulement de l'expérience d'hybridation soustractive ?

Il est possible que l'ADN du complexe ADNc-oligotex chargé négativement pourrait interagir avec les ions Mg^{++} se trouvant dans le tampon d'hybridation. Nous avons divisé en deux le lot de billes ADNc-oligotex issues de la troisième étape de cette soustraction. Nous avons essayé de chélater les ions Mg^{++} en ajoutant de l'EDTA aux billes. Dans le premier tube, nous avons ajouté du tampon TE contenant de l'EDTA 5 mM et dans l'autre tube du tampon TE contenant de l'EDTA 10 mM. Après incubation à température ambiante pendant 15 minutes, aucune resuspension des billes n'est observée dans les deux cas. Nous avons alors placé ces tubes à 37°C pendant 15 minutes. Nous observons que les billes collent moins aux parois du tube contenant 10 mM d'EDTA.

Une autre explication possible serait que les chaînes hydrophobes de polystyrène composant les billes pourraient interagir avec le plastique des tubes et des embouts. Nous avons utilisé un détergeant afin de vérifier cette hypothèse. Nous avons ajouté soit du SDS 0,1 % dans un tube et du SDS 0,5 % dans un autre tube au même lot de billes issues de la soustraction précédente. Après les avoir incubés à 37°C pendant 15 minutes, nous observons que la resuspension des billes est plus facile, mais celles-ci collent toujours aux parois du tube.

De ces deux tests, nous observons que les phénomènes d'adhérence aux parois du tube et d'aggrégation des billes entre elles semblent différentes.

Les trois essais d'hybridation soustractive, nous ont fourni des informations précieuses dont nous allons tirer profit dans la conclusion générale pour remédier aux difficultés rencontrées et permettre de continuer le travail de longue haleine commencé dans ce mémoire.

V. Conclusions

Des travaux antérieurs ont montré qu'il existe des différences dans la nature et les quantités relatives des diverses protéines synthétisées par les fibroblastes jeunes ou les fibroblastes âgés. Ces résultats ont d'abord été obtenus par analyse des protéines en gels à deux dimensions. Par la suite, plusieurs équipes ont isolé des ARNm spécifiques de ces cellules jeunes et vieilles. Ces travaux ont conduit à la mise en évidence de facteurs pro-et anti-prolifératifs avec une augmentation des facteurs anti-prolifératifs dans les cellules vieilles.

Cependant, le vieillissement cellulaire ne se résume pas à la diminution et finalement l'arrêt de la prolifération cellulaire rencontrée lors des derniers passages en culture. En effet, si on examine ces articles de plus près, on remarque que ces travaux comparent généralement des fibroblastes issus de cultures ayant atteint environ 60 % de leur nombre maximum de passages à des fibroblastes issus de cultures ayant atteint au moins 95 % de ce nombre maximum.

Si nous replaçons ces données dans le cadre de l'évolution des fibroblastes en fonction de leurs différents morphotypes qui sont présentés au début de ce travail et réalisés aussi par l'équipe de Bayreutler, on constate que ces travaux ont en fait comparé des cellules très prolifératives contenant une majorité de morphotypes mitotiques II à des cellules peu prolifératives contenant une proportion importante de morphotypes III, IV, V et VI. Les études entreprises dans notre travail avaient comme objectif de mieux caractériser le vieillissement *in vitro* des fibroblastes en mettant en évidence les ARNm et donc les protéines exprimées par quelques morphotypes bien précis. Ainsi, on pourrait peut-être trouver des gènes non liés à la population mais liés au passage progressif des cellules d'un morphotype à l'autre.

Il s'agit d'un travail particulièrement difficile du fait d'une part de l'impossibilité d'obtenir une population totalement homogène pour l'un de ces morphotypes et d'autre part de la quantité faible de matériel dont on peut disposer puisque l'on travaille sur culture de cellules dont la proportion des divers morphotypes change continuellement au cours des sous-cultures. De plus, la technique d'hybridation soustractive n'est pas non plus une manipulation très aisée et plusieurs problèmes se posent lors de son utilisation.

Ce travail de mémoire et les résultats obtenus constituent une bonne introduction à ce projet. Ils ont permis de défricher le terrain au niveau des deux problèmes posés par le projet à

savoir connaître ce qui est possible d'obtenir comme populations des divers morphotypes qui seraient utiles pour réaliser des banques soustractives et deuxièment quels sont les problèmes posés par cette technique dans le cadre de ce projet, principalement si on utilise une méthode basée sur l'utilisation de billes de latex polyT.

Examinons à la lumière de nos résultats ces deux aspects du problème.

Pour obtenir des morphotypes I en quantité suffisante pour pouvoir comparer leurs ARNm à ceux des morphotypes III et aux IV, V, VI, il nous parait nécessaire de recourir à la mise en culture de nouveaux explants issus de tissus foetaux. Il est en effet impossible de se procurer des cellules issues de tissus foetaux et suffisament jeunes, à cause de leur utilisation extensive depuis une trentaine d'années.

L'obtention de morphotype II en quantité suffisante est encore possible à partir de la plupart des souches foetales de fibroblastes commercialisées. Nous avons montré qu'il est plus facile d'obtenir une proportion élevée de morphotypes II à partir de la souche AG04432. Cette forte population en morphotypes II est due à une diminution probablement brutale de la proportion de MF I au cours des tout premiers passages en culture, après mise en culture de l'explant foetal, et une augmentation très lente de la proportion de MF III lors des 40 premiers passages. Cette évolution est différente de celle des souches WI-38 et HH-8 où la proportion de types II diminue de manière plus régulatrice au cours des sous-cultures. Il serait donc possible d'utiliser les ARNm d'une population de cellules homogènes en morphotypes II à plus de 90 % pour effectuer diverses hybridations soustractives.

Nous avons aussi pu obtenir suffisament d'ARNm de morphotypes III, et aussi de population en cellules contenant une forte proportion en cellules post-mitotiques en vue d'autres hybridations soustractives. A ce niveau, les perspectives de travail sont positives.

La deuxième partie de ce mémoire était consacrée à la mise au point de la technique d'hybridation soustractive utilisant des billes Oligotex sur lesquelles est synthétisé de l'ADNc à partir des ARNm de la population qui sert de "driver". Ces ADNc sont ensuite hybridés aux ARNm qui leur sont communs, dans la population "cible" dont on veut découvrir les ARNm différents.

De manière à économiser l'ARNm purifié à partir des fibroblastes AG04432 au prix d'un très long labeur, nous avons utilisé le modèle des cellules Véro infectées par le virus respiratoire syncytial bovin (BRSV). Par l'utilisation de marqueurs spécifiques soit aux cellules Véro, le gène d'actine, soit au virus, le gène de la protéine F, nous avons appliqué la RT-PCR sur billes à nos conditions expérimentales. De plus, nous avons montré que l'ADNc synthétisé sur billes dans ces conditions était stable pendant au moins dix jours à 4°C.

Vinrent ensuite trois essais successifs d'hybridation soustractive. Si ces essais n'ont pas donné des résultats attendus dûs entre-autre au problème d'agglutination des billes, nous pouvons cependant en retirer des informations fort utiles à la continuation de ce travail.

Lors du premier essai, nous avons utilisé des tubes silanés par nos soins, ce qui a l'avantage d'être peu onéreux mais le désavantage d'empêcher une fermeture totale du tube Eppendorf, ceci pouvant être la cause d'une contamination par des RNases. Ceci peut expliquer que l'ADNc sur billes n'est pas dégradé mais que l'ARNm du gène de la protéine F a disparu dès la seconde étape du travail. Notons que les tubes Eppendorf utilisés possèdent un fond en arc de cercle régulier.

Lors du second et du troisième essai, nous avons observé une agglutination des billes après centrifugation qui, de plus, collaient aux parois des tubes. En utilisant de l'EDTA en plus grande concentration, nous parvenons à diminuer l'effet "collant au tube" mais pas à remédier à l'effet "aggrégeant" des billes. L'EDTA pourrait peut-être aider à diminuer l'attachement d'aggrégats de billes aux parois du tube, attachement dû notamment à des phénomènes électrostatiques entre charges opposées (Mg^{++}, ADN^{-}). D'autre part, ces billes semblent aggrégées par des phénomènes liés à l'hydrophobicité du polystyrène qui les compose. Un argument en faveur de cette hypothèse semble être que du SDS parvient à faciliter la resuspension des billes après centrifugation, sans toutefois atténuer suffisamment l'effet "collant" des aggrégats non dissociés.

A quoi pourrait être dû cet effet aggrégeant, observé lors du deuxième et troisième essai de soustraction par hybridation, et non observé lors du premier essai? Une différence importante pourrait être l'utilisation de tubes Eppendorf différents dans ces expériences. Pour le premier essai, les tubes possédaient un fond en arc de cercle et, pour les autres essais, les fonds des tubes étaient biseautés formant ainsi un cône pointu. On a constaté par expérience qu'il faut trouver un compromis dans les temps de centrifugation des billes pour obtenir un culot de billes ferme mais qui ne s'agglutinent pas. Par exemple, à 13.500 rpm, si on passe de 10 à 15 minutes de centrifugation, on obtient un culot de billes totalement agglutinées. Cela suggère qu'une faible différence des conditions de centrifugation peut avoir une grande importance sur la formation du culot dans ces conditions. De plus, on a observé que, si la centrifugation est réalisée en tube biseauté, on n'obtient pas un culot mais plutôt un halot plus étalé. Ceci n'est pas le cas des tubes à fond rond où les billes ont tout le loisir de former un culot plus bombé et moins étalé. Il est possible que des modifications des effets des forces de centrifugation sur les billes, dues à la forme des tubes, déforme les billes, ceci favorisant les forces hydrophobes existant entre les chaînes de polystyrène qui composent ces billes et donc leur agglutination. La déformation de ces billes est aussi favorisée par le chauffage à 95°c des billes lors de leurs utilisation en PCR.

En conclusion de ces observations, il faut utiliser des tubes à fond en arc de cercle qui puissent se fermer totalement après avoir été silanés, ceux-ci doivent bien entendu être RNase-Free. Ces tubes sont maintenant disponibles dans le commerce.

Les résultats des RT-PCR des expériences d'hybridation soustractive montrent qu'il est possible d'utiliser des billes Oligotex pour fixer l'ARNm et réaliser la synthèse de l'ADNc correspondant. De plus, ces billes ADNc peuvent être utilisées pour faire des PCR et amplifier ainsi l'ADNc. Cependant, on constate de très grosses pertes au cours des manipulations et sans doute des fixations non spécifiques sur les billes. Il faudra absolument résoudre ce problème car il diminue fortement l'intérêt de la méthode. De plus, l'analyse des amplicons devra être revue. Nous avons utilisé un gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium. Il faudra faire appel à des méthodes d'analyse plus sensibles comme le southern blot.

Ces problèmes résolus, il sera possible de reprendre les hybridations soustractives employant des billes de latex en vue de purifier les ARNm différents entre divers morphotypes se succédant lors du vieillissement *in vitro* des fibroblastes. Cette technique vient d'être appliquée fructueusement dans l'identification des trois gènes associés au vieillissement des cellules humaines (Satoh et al., 1994).

Nous espérons que ce mémoire servira de point de départ à un travail permettant l'identification de gènes associés à des morphotypes différents. Il sera aussi possible de comparer les cellules ayant subi un vieillissement naturel aux cellules ayant subi un vieillissement accéléré sous l'effet de stress de diverses natures, ainsi que nous l'avons expliqué dans l'introduction de ce travail.

VI. Bibliographie

Alam, T., An, M. R. et Papaconstantinou, J. Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase reponse *J. Biol. Chem.* **267**, 5021-5024, 1992.

Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, A. B., Greider, C. W. et Harley, C. B. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* ***89***, 10114-10118, 1992.

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

Bayreuther, K., Rodeman, H. P., Hommel, R., Dittman, K., Albiez, M. et Francz, P. Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5112-5116, 1988

Bayreuther, K. et Gogol, J. Terminal differenciation, aging, apoptosis, or transformation of the WI-38 fibroblasts in the fibroblast stem cell system in vitro *Cell and Tissue Culture Models in Dermatological Research.* 263-271, 1993

Benjamin, I. J., Hories, S., Greenberg, M. L., Alpern, R. J. et Williams, R. S. Induction of stress proteins in cultured myogenic cells. Molecular signals for the activation of heat shock transcription factor during ischemia *J. Clin. Invest.* **89**, 1685-1689, 1992

Brenneisen, P., Gogol, J. et Bayreuther, K. DNA synthesis and Fos and Jun protein expression in mitotic and post-mitotic WI-38 fibroblasts in vitro *Exp. Cell Res.* **211**, 219-230, 1994

Chomczynski, P. et Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate -phenol-chloroform extraction *Analytical Biochem.* **162**, 156-159, 1987.

Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B. et Bacchetti, S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity *Embo J .11*, 1921-1929, 1992

Cutler, R. G. Longevity is determined by specific genes: testing the hypothesis *In "Testing the theories of ageing*. R. Adelman et G. Roth, Eds. Boca Raton, FL, CRC Press. 25-114, 1982

Cutler, R. G. Dysdifferentiation and aging. In : *Dysdifferentiation and aging*. Sohal, R. S., Birnbaum, L., et Cutler, R. G. 307 - 340, New York, 1985

Cutler, R. G. Antioxidant and aging *Am. J. Nutr.* **53**, 373-379S, 1991a

Cutler, R. G. Recent progres in testing the longevity determinant and dysdifferentiation hypothesis of ageing *Arch. Gerontol. Geriatr.* **12**, 75-98, 1991b

Degen, J. L., Neubauer, M.G., Friezner-Degen, S.J., Seyfried, C.E. et Morris, D.R. Regulation of protein synthesis in mitogen-activated bovine lymphocytes *J. Biol. Chem.* **258**, 12153-12162, 1983

Doggett, D. L., Rotenberg, M. O., Pignolo, R. J., Phillips, P. D. et Cristofalo, V. J. Differential gene expression between young and senescent, quiescent WI-38 cells *Mech Ageing Dev* **65**, 239-55, 1992

Dulic, V., Drullinger, L. F., Lees, E., Reed, S. I. et Stein, G. H. Altered regulation of G1 cyclins in senescent human diploid fibroblasts : accumulation of inactive cyclin E-Cdk2 and cyclin D1-Cdk2 complexes *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11034-11038, 1993

Fabris, N. Neuroendocrine-immune interactions : a theoretical approach to aging *Arch. Gerontol. Geriatr* **12**, 219-230, 1991

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

Frech, B. et Peterhans, E. RT-PCR : 'Background printing' during reverse transcription *Nucl. Acid. Res.* **22**, 4342-4343, 1994

Fritz, G. et Kaina, B. Stress factors affecting expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase mRNA in rat hepatoma cells *Biochim Biophys Acta* **1171**, 35-40, 1992

Fujita, T., Shirasawa, T., Uchida, K. et Maruyama, N. Isolation of cDNA clone encoding rat senescence marker protein-30 (SMP30) and its tissue distribution *Biochim Biophys Acta* **1132**, 297-305, 1992a

Fujita, T., Uchida, K. et Maruyama, N. Purification of senescence marker protein-30 (SMP30) and its androgen-independent decrease with age in the rat liver *Biochim Biophys Acta* **1116**, 122-8, 1992b

Goya, R. G. The immune-neuroendocrine homeostatic network and aging *Gerontology* **37**, 208-213, 1991

Gruber, C. E., Li, W. B., Lin, J.-J. et D'Alessio, J. M. Subtractive cDNA hybridization using the multifunctionnal plasmid vector pSPORT 2 *Focus* **15**, 59-65, 1994

Hampson, I. N., Pope, L., Crowling, G. J. et Dexter, T. M. Chemical Cross-Linking Subtraction (CCLS) : A one-tube protocol for producing substractive hybridization probes *Focus* **15**, 50-51, 1994

Hara, E., Kato, T., Nakada, S., Sekiya, S. et Oda, K. Subtractive cDNA cloning using oligo(dT)30-latex and PCR : isolationb of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells *Nucl. Acid Res.* **19**, 7097-7104, 1991

Hara, E. et Campisi, J. cDNA synthesis and asymmetric PCR on oligotex^{TM} for substractive cDNA cloning *J. NIH Res.* **6**, 77, 1994

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

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

Hartley, J. A., Berardini, M., Ponti, M., Gibson, N. W., Thompson, A. S., Thurston, D. E., Hoey, B. M. et Butler, J. DNA cross-linking and sequence selectivity of Aziridinylbenzoquinones ; A unique reaction at 5'-GC-3' sequences with 2,5-Diaziridinyl-1,4-benzoquinone upon reduction *Biochemistry* **30**, 11719-11724, 1991

Hayflick, L. et Moorehead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains *Exp. Cell Res.* **25**, 585-621, 1961

Hayflick, L. The cellular basis for biological aging In *Handbook of the biology of ageing* C. Finch et L. Hayflick eds. Van Nostrand Reinhold, New York 159-186, 1977

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

Holbrook, N. J. et Fornace, A. J. Response to adversity: molecular control of gene activation following genotoxic stress *New Biol.* **3**, 825-833, 1991

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

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

Kanungo, M. S. *Biochemistry of aging* New-York, 1980

Kirkwood, T. B. L. et Cremer, T. Cytogerontology since 1881 : a reappraisal of August Weismann and a review of modern progress *Human Genetics* ***60***, 101-121, 1982

Klagsbrun, M., Langer, R., Levenson, R., Smith, S. et Lillehei, C. The stimulation of DNA synthesis and cell division in chondtocytes and 3T3 cells by a growth factor isolated from cartilage *Exp. Cell. Res.* **105**, 99-108, 1977.

Kuribayashi-Ohta, K., Tamatsukuri, S., Hikata, M., Miyamoto, C. et Furuichi, Y. Application of oligo(dT)30-latex for rapid purification of poly(A)+mRNA and for hybrid substraction with the in situ reverse transcribed cDNA *Biochim. Biophys. Acta* **1156**, 204-212, 1993.

Kwon, H. M., Yamauchi, A., Uchida, S., Preston, A. S., Garcia-perez, A., Burg, M. B. et Handler, J. S. Cloning of the cDNA for a Na+/Myo-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein *J. Biol. Chem.* **267**, 6297-6301, 1992

Liang, P. et Pradee, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymérase chain reaction. *Science* **257**, 967-971, 1992

Lisitsyn, Na. , Lisitsyn, Ni. et Wigler, M. Cloning the differnces between two complex genomes *Science* **259**, 946-951, 1993

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J. Protein measuement with folin phenol reagent *J.Biol. Chem.* **27**, 10805-10808, 1951.

Maréchal, D., Forceille, C., Breyer, D., Delapierre, D. et Dresse, A. A subtractive hybridization method to isolate tissue-specific transcripts : application to the selection of brain-specific products *Anal. Biochem.* **208**, 330-33, 1993

McClung, J. K. Isolation of a cDNA that hybrid selects antiproliferative mRNA from rat liver *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 1316-1322, 1989

McIntosh, K. et Chanock, R. M. Respiratory syncitial virus In : *Respiratory syncitial virus.* Fields, B. N. et Knipe, D. M. 1045-1072, New York, 1990.

Murano, S., Saito, Y., Yoshida, S., Thweatt, R., Moerman, E. J., Jones, R. A., Shmookler Reis, R. J. et Goldstein, S. genes overexpressed in Werner syndrome (WS) diploidfibroblasts and aging phenomena In : *Recent advances in ageing science* Beregi, E., Gergely, I. A., et Rajczi, K., Bologne, 1993

Nicolis, G. et Prigogine, I. Self-organisation in nonequilibrium systems *Wiley Interscience, New-York* 1977

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

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

Pasternak, C. A., Aiyathurai, J. E., Makinde, V., Davies, A., Baldwin, S. A., Konieczko, E. M. et Widnell, C. C. Regulation of glucose uptake by stressed cells *J. Cell Physiol* **149**, 324-31, 1991

Poot, M. Oxidant and antioxidant in proliferative senescence *Mut. Res.* ***256***, 177-190, 1991

Remacle, J., Michiels, C. et Raes, M. The importance of antioxidant enzymes in cellular ageing and degeneration *In "Free radicals and ageing" I. Emerit et B. Chance Eds., Birkhäuser Verlag AG, Basel* 99-108, 1992a

Remacle, J., Lambert, D., Raes, M., Pigeolet, E., Michiels, C. et Toussaint, O. Importance of various antioxidant enzymes for cell stability. Confrontation between theoretical and experimental data *Biochem. J.* **285**, 41-46, 1992b

Rodeman, H. P., Bayreuther, K., Francz, P. I., Dittman, F. et Albiez, M. Selective enrichment and biochemical characterization of seven fibroblasts cell types in vitro *Exp. Cell Res.* **180**, 84-93, 1989a

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

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

Satoh, Y., Kashimura, M., Kaneko, S., Karasaki, Y., Higashi, K. et Gotoh, S. Cloning of cDNAs with possible association with senescence and immortalization of human cells *Mut. Research* **316**, 25-36, 1994

Sive, H. L. et St John , T. A simple subtractive hybridization technique employing photoactivatable biotin and phenol extraction *Nucl. Ac. Res.* **16**, 10937, 1988

Smardo, F. L., Burg, M. B. et Garcia-Perez, A. Kidney aldose reductase gene transcription is osmotically regulated *Am. J. Physiol.* **262**, C776-782, 1992

Sohal, R. S. et Allen, R. G. Relationship between oxygen metabolism, aging and development *Adv. Free Rad. Biol. Med.* **2**, 117-160, 1986

Sohal, R. S. et Allen, R. G. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis *Exp. Geront.* **25**, 499-522, 1990

Spiering, A. L. et Smith, J. R. Negative growth effectors and cellular senescence *Mut. Research* **256**, 263-269, 1991

Stadtman, E. R. Protein modification in aging *J. Gerontol.* ***43***, B112-B120, 1988

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

Toussaint, O.,Raes, M. et Remacle, J. Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages *Mech. Ageing Dev.* **61**, 45-64, 1991

Toussaint, O., Raes, M., Pigeolet, E., Michiels, C. et Remacle, J. Failures to increase the maximum *in vitro* life-span of human fibroblasts and some theoretical justifications. Experimental arguments in favour of the concept of critical threshold of error accumulation. In : *Failures to increase the maximum in vitro life-span of human fibroblasts and some theoretical justifications. Experimental arguments in favour of the concept of critical threshold of error accumulation.* Ruiz-Torres, A. et Hofecker, G. pp 25-32, Wien, 1992a

Toussaint, O., Houbion, A. et Remacle, J. Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. II. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture *Mech. Ageing Dev.* **65**, 65-83, 1992b

Toussaint, O. et Remacle, J. Stress, energy and cellular ageing In : *Stress, energy and cellular ageing* Hofecker, G. 43-54, Wien, 1993

Toussaint, O., Houbion, A. et Remacle, J. Relationship between the critical level of oxidative stresses and the glutathione peroxidase activity *Toxicology* **81**, 89-101, 1993

Toussaint, O. et Remacle, J. Review of the theories of cellular ageing From Hayflick's concept to the concept of critical threshold of error accumulation *Pathol. Biol.* **42**, 312-325, 1994a

Toussaint, O. et Remacle, J. Review of the experimental data in favour of the concept of critical threshold of error accumulation in cell death Qualities and limits of this concept in cellular ageing. *Pathol. Biol.* **42**, 305-311, 1994b

Toussaint, O., Houbion, A. et Remacle, J. Effects of modulations of the energetical metabolism on the mortality and ageing of cultured cells *Biochim. Biophys. Acta* **1186**, 209-220, 1994

Toussaint, O., Michiels, C., Raes, M. et Remacle, J. Importance of the energetic metabolism in cellular ageing *Exp. Gerontol.* sous presse

Walravens, K., Kettman, R., Collard, A., Coppe, P. et Burny, A. Sequence comparison between the fusion protein of human and bovine respiratory syncitial viruses *J. General Virol.* **71**, 3009-3014, 1990

Welcher, A. A., Torres, A. R. et Ward, D. C. Selective enrichement of specific DNA, cDNA and RNA sequences using biotinylated probes, avidin and copper-chelate agarose *Nucleic Acids Research* **14**, 10027-10044, 1986

Wistrom, C. et Villeponteau, B. Cloning et expression of SAG : a novel marker of cellular senescence *Exp. Cell Res.* **199**, 355-362, 1992

BUMP
0 0 6 6 5 3 9 2 8
*FM B04/1994/18