

**DESS de BIOLOGIE ET DE PHARMACOLOGIE DU
VIEILLISSEMENT
UNIVERSITE DE MARNE-LA-VALLÉE**

**RAPPORT DE STAGE PRÉSENTE PAR
JEAN-PATRICK POMMIER**

**DYNAMIQUE DE LA LONGUEUR DES TÉLOMÈRES ET DE
L'INSTABILITÉ CHROMOSOMIQUE DANS UN MODÈLE DE
CELLULES HUMAINES TRANSFORMÉES PAR SV40.**
ANALYSES PAR HYBRIDATION IN-SITU ET PAR SOUTHERN-BLOT

**LABORATOIRE DE CYTOGENETIQUE ET GENETIQUE DU
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE**

FONTENAY-AUX-ROSES 1994

I. INTRODUCTION.....	3
II. MATERIEL ET METHODES.....	7
II. 1 HYBRIDATION IN SITU (H I S)	7
II. 1.1. Principe.....	7
II. 1. 2. Hybridation in situ des télomères.....	8
II.1.3.Hybridation in situ de chromosomes entiers (painting chromosomique).....	8
II.2. EVALUATION DE L'INSTABILITÉ CHROMOSOMIQUE GÉNÉRALE :.....	9
II.3. ANALYSE DES FRAGMENTS DE RESTRICTION TÉLOMÉRIQUES (TRF) PARSOUTHERN-BLOT....	10
II.3.1. Principe	10
II.3.2. Extraction de l'ADN génomique.....	10
II.3.3. Digestion de l'ADN.....	10
II.3.4. Migration	11
II.3.5. Transfert du gel sur membrane de nylon	11
II.3.6. Marquage de la sonde.....	11
II.3.7. Préhybridation et hybridation de la membrane.....	11
II.3.8. Lavage de la membrane	12
II.3.9. Révélation et analyse du profil de migration.....	12
II.3.10. Décomposition des profils de migration des TRFs par des courbes de la famille :	
$Y=Axe^{p(-ax(X-X_0)^2)}$	12
III. RESULTATS.....	14
III.1. CYTOGÉNÉTIQUE.....	14
III.1.1. Evolution générale de la stabilité des chromosomes dans la lignée TP 15.5.....	14
III.1.2. Evolution de la stabilité des chromosomes 13 et 16 au cours des passages par HIS.....	15
III.1.3. Marquage des télomères par hybridation in-situ.....	17
III.2. ANALYSE DES SÉQUENCES TÉLOMÉRIQUES DE LA LIGNÉE TP 15.5 PARSOUTHERN-BLOT	22
IV. DISCUSSION	26
IV.1 CYTOGÉNÉTIQUE.....	26
IV.1.1.Evolution de la stabilité des chromosomes 13 et 16	26
IV.1.2. Stabilité relative des chromosomes 13, 16, 6, 1.....	27
IV.2. ANALYSE DES PROFILS DE MIGRATION EN SOUTHERN BLOT.....	28
V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	30

I. INTRODUCTION

Les télomères constituent l'extrémité physique des chromosomes. Le clonage des séquences télomériques a permis de montrer qu'elles étaient constituées par la répétition de plusieurs centaines à plusieurs milliers de fois d'un motif de base de la forme, chez l'homme, TTAGGG pour le brin 5'. Ce motif a été extrêmement bien conservé au cours de l'évolution (1), ce qui suggère qu'il joue un rôle physiologique important.

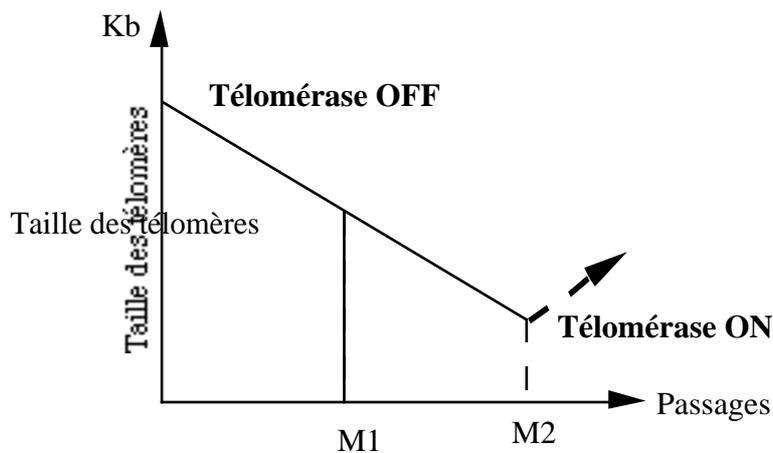
On a montré que le brin riche en guanine, chez *Tetrahymena*, présentait une extrémité 3' sortante sur une dizaine de nucléotides (2). Sur le plan structural, des oligomères d'ADN, dont la séquence est constituée de quelques répétitions de ce motif riche en guanine, sont capables d'adopter une structure en hélice quadruple faisant intervenir des liaisons dites *non Watson-Crick* entre les guanines (3). Chez les eucaryotes inférieurs, différentes protéines capables d'interagir avec les télomères ont été clonées, leurs fonctions ne sont pas encore clairement connues *in vivo*. *In vitro* (4,5,6) certaines seraient impliquées, dans la formation de l'hélice quadruple, dans l'interaction avec la matrice nucléaire.

La réplication d'une séquence d'ADN double brin et linéaire, et *a fortiori* d'un chromosome, par le complexe de réplication, du fait de la dégradation des amorces ARN, synthétisées de manière récurrente sur le brin retardé, va conduire à une diminution progressive des extrémités physiques de l'ADN répliqué, c'est à dire des télomères. Ce phénomène de délétion progressive des télomères est appelé réplication incomplète des télomères (7).

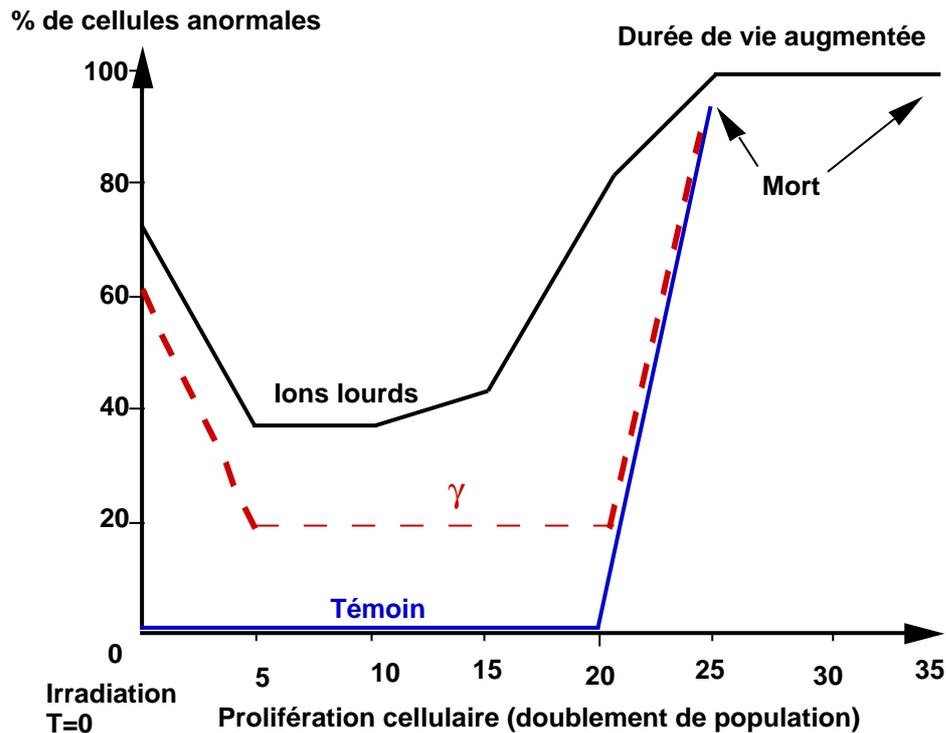
La réplication incomplète des télomères est un phénomène qui se déroule *in vivo*. Chez l'homme la taille des télomères de fibroblastes de la peau diminue avec l'augmentation de l'âge du donneur (8). *In vitro* ce phénomène se déroule également lorsqu'on cultive des fibroblastes (9). La diminution de la taille des télomères s'accompagne d'une baisse du potentiel de division des cellules en culture, des fibroblastes humains ne peuvent pas normalement dépasser le passage 50 (10), c'est la limite de Hayflick encore appelée crise de mortalité cellulaire M1.

On a postulé l'existence d'un enzyme particulier, la télomérase capable d'allonger les télomères par leur extrémité 3', car la taille des télomères des cellules de la lignée germinale ne diminue pas en fonction de l'âge du donneur (8) et la taille des télomères des cellules immortalisées, par l'antigène T de SV40, ne diminue plus au cours des passages. Cet enzyme est une ribonucléoprotéine qui comporte un ARN capable de servir de matrice interne pour l'élongation des télomères (11). Cet enzyme serait inactif dans la lignée somatique et actif dans la lignée germinale et réactivé dans les cellules immortalisées ou tumorales (12, 14).

Au cours de la transformation cellulaire, dans les passages précoces, la longueur des télomères décroît, comme c'est le cas pour les cellules normales, à ceci près que le potentiel de division ne diminue pas au cours des passages. La limite de Hayflick atteinte, les cellules transformées continuent de se diviser au même rythme, la crise M1 est abolie et la taille des télomères continue de décroître. Survient alors une autre crise de mortalité cellulaire, M2. Quelques clones vont survivre à la crise M2, la plupart des modèles d'évolution de la dynamique des télomères postulent que la télomérase est réactivée dans ces clones et en effet aux passages tardifs succédant à la crise M2, les télomères se stabilisent et on peut détecter une activité télomérase (cf figure ci-dessous).



Au laboratoire des modèles d'instabilité chromosomique dans des fibroblastes humains, normaux ou irradiés aux ions lourds, ont été développés (15, 16). Ces modèles ont permis d'étudier l'évolution comparée de la stabilité des chromosomes dans les fibroblastes normaux jusqu'à la sénescence et dans les fibroblastes irradiés aux ions lourds. Il a été montré que l'on retrouve les mêmes aberrations chromosomiques, touchant préférentiellement le chromosome 13, puis le chromosome 16 et le bras court du chromosome 1. Ces aberrations sont principalement constituées par des chromosomes dicentriques terminaux, générés par la fusion de deux chromosomes au niveau de leurs télomères ou par la fusion d'un télomère d'un chromosome et d'une cassure portée par un autre chromosome. Il est plus difficile d'observer ces anomalies dans les cultures primaires de fibroblastes car la durée du cycle cellulaire augmente à chaque passage. Pour les fibroblastes irradiés, l'instabilité chromosomique se manifeste 15 passages après irradiation et cette instabilité est transmissible d'une génération à l'autre, enfin la durée de vie des fibroblastes irradiés est augmentée par rapport à celle des cellules non irradiées (cf figure ci-dessous).



Dans tous les cas, aussi bien dans les fibroblastes sénescents qu'irradiés ou transformés par l'antigène T de SV40, l'instabilité chromosomique est maximale au cours de la crise qui conduit à la mort de toutes les cellules dans le cas de fibroblastes sénescents et à la mort de la majorité des cellules transformées. Aucune étude n'a permis de montrer que des points d'insertion du plasmide codant pour l'antigène T de SV40 sont à l'origine de l'instabilité spécifique d'un chromosome, l'hypothèse communément admise est que l'expression de l'antigènes T, de SV40, dérégule le contrôle du cycle cellulaire responsable du maintien de l'intégrité du génome. Schématiquement, un des rôles principaux de l'antigène T serait de piéger la forme monomérique de la protéine p53 impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire.

Counter *et al.* ont montré qu'au cours des passages en culture, pour différentes populations de fibroblastes transfectés par le plasmide codant pour l'antigène T de SV40, le nombre d'anomalies chromosomiques augmente au cours du processus d'immortalisation et que parallèlement la taille moyenne des télomères, plus précisément celle des fragments de restriction télomériques, diminue pour se stabiliser à des passages tardifs après la crise de mortalité cellulaire M2 (13). Ces résultats ont conduit à proposer que la diminution de la taille des télomères était à l'origine de la genèse de l'instabilité chromosomique et de l'apparition des chromosomes dicentriques.

La démarche adoptée au laboratoire consiste à étudier, au cours de la transformation cellulaire de fibroblastes transformés par l'antigène T de SV40, l'instabilité

chromosomique et le devenir des télomères, à la fois globalement et spécifiquement pour différents chromosomes.

Les résultats préliminaires obtenus dans le laboratoire montrent que les chromosomes préférentiellement touchés lors de l'immortalisation par l'antigène T de SV40, sont les mêmes que ceux impliqués dans la sénescence et après irradiation. Ce modèle de transformation permet d'étudier la chronologie de déstabilisation touchant successivement les différents chromosomes.

Les résultats présentés dans ce mémoire contribuent à mettre en évidence l'existence d'une chronologie de déstabilisations, dans une lignée de fibroblastes transformés par l'antigène T de SV40, touchant successivement différents chromosomes. Un des objectifs principaux étant de savoir si, oui ou non, la longueur des télomères d'un chromosome spécifique détermine sa stabilité. On a donc mesuré en parallèle l'évolution de la stabilité chromosomique globale et l'évolution de la longueur moyenne des télomères.

II. MATERIEL ET METHODES

II. 1 Hybridation in situ (H I S)

II. 1.1. Principe

Les cellules bloquées en métaphase sont étalées sur une lame de verre puis stockées à -20°C. Avant l'utilisation les lames sont décongelées et selon le type de sonde utilisée, les lames sont soit utilisées immédiatement soit laissées 48 heures, à température ambiante (sondes digoxigénine). Par la suite, les lames sont déshydratées dans des bains d'alcool (50%, 75%, 100%), 10 minutes par bain ; puis les lames sont mises à sécher pendant au moins 15 minutes. On incube les lames à 70°C dans de la formamide 70%/2XSSC durant 100 à 120 secondes pour dénaturer l'ADN des préparations chromosomiques.

Les lames sont rincées dans du 2XSSC pendant 1 minute puis elles sont passées successivement dans les bains d'alcool à 50%, 75%, 100% pendant 5 minutes et enfin les lames sont mises à sécher.

Parallèlement la sonde (ONCOR), couplée à la biotine ou à la digoxigénine, est dénaturée de 5 à 10 minutes à 70°C au bain marie et conservée dans la glace jusqu'à utilisation.

On dépose de 15 à 20 µl de sonde au centre de l'étalement que l'on recouvre d'une lamelle plastifiée.

Les lames sont mises à hybrider dans une boîte dont l'atmosphère est saturée en formamide (papier absorbant + formamide 50%), l'hybridation se déroule pendant la nuit en étuve à 37°C ou à 42°C selon le type d'hybridation. Les lames sont rincées à 37°C dans deux bains de formamide 50%, puis dans deux bains de 2XSSC durant 2 à 10 minutes.

La révélation de la sonde s'opère par deux étages d'anticorps. Les lames sont rincées dans un bain de PBT pendant 10 minutes (saturation des sites aspécifiques). On incube les lames avec 50 µl du premier anticorps, anti-biotine ou anti-digoxigénine, dilué dans du PBT, pendant au moins 45 minutes dans une étuve à 37°C ou 42°C. Les lames sont rincées une première fois au PBT pendant 10 minutes. Le deuxième anticorps, dirigé contre le premier anticorps et couplé à la FITC, est mis à incuber dans les mêmes conditions.

On dépose, sans rincer les lames, 60µl d'iodure de propidium 1mg/ml, dilué au 3000^{ème} pour contre colorer les chromosomes en orange. Les lames sont rincées au bout de 6 minutes au PBS puis on ajoute quelques gouttes de PPD pour éviter l'extinction du chromophore lors de l'observation au microscope à fluorescence et l'on recouvre la préparation d'une lamelle de verre.

Les principales étapes qui déterminent la qualité du signal d'hybridation sont le temps de dénaturation de la préparation chromosomique et la stringence du rinçage après hybridation de la sonde.

II. I. 2. Hybridation in situ des télomères

Les conditions qui ont permis jusqu'à présent le meilleur marquage des télomères, avec les sondes télomériques (ONCOR), sont pour les sondes :

Télomères	Dénaturation des préparations chromosomiques	Rinçage
(20µl) sonde biotine	1'40" à 70°C 70% Formamide / 2xSSC	2xFormamide 50% 2x 2xSSC
(20µl) sonde Dig	2' à 70°C 70% Formamide / 2xSSC	2xFormamide 50% 2x 2xSSC

et pour les anticorps :

Télomères	1er anticorps	2ème anticorps
Système Biot anti	Biot / goat 1/100ème	anti goat-FITC 1/200ème
Système Dig	anti Dig / mouse 1/100ème	anti mouse-FITC 1/200ème

II.1.3. Hybridation in situ de chromosomes entiers (painting chromosomique)

Les kits de "painting" chromosomiques sont constitués par un ensemble de sondes plus ou moins spécifiques d'un chromosome donné. En microscopie on verra le chromosome d'intérêt coloré en vert (avec des anticorps couplés à la FITC) se détacher des autres chromosomes colorés en orange par l'iodure de propidium. Quelques étapes diffèrent de celles de l'H I S des télomères.

L'ensemble des sondes constituant le kit après dénaturation est mis à incuber pendant 2h 30 afin que certaines séquences répétées, présentes, peu spécifiques du

chromosome d'intérêt, puissent se renaturer pour éviter des problèmes d'hybridation croisée avec d'autres chromosomes.

Deux types de kit ont été utilisés, BIOSYS pour le chromosome 13, ONCOR pour le 16. Du DNA génomique soniqué doit être rajouté avec le kit de painting BIOSYS pour diminuer l'hybridation croisée. Dans les deux cas les sondes sont couplées à la biotine. Les conditions utilisées sont les suivantes :

Painting	chromosome 13	chromosome 16
	10µl de sonde + 1µl de DNA génomique (7,5µg/µl)	10µl de sonde
Dénaturation	2' à 70°C 70% Formamide / 2xSSC	
Rinçages	15' à 42°C 50% Formamide/0,5xSSC	1. 15' à 43°C 50% Formamide/0,5xSSC 2. 15' à 60°C 0,1xSSC
1er Ac	anti Biot / goat 1/100ème 100µl par lame	
2ème Ac	anti goat-FITC 1/200ème 100µl par lame	

II.2. Evaluation de l'instabilité chromosomique générale :

Pour dénombrer les chromosomes dicentriques (Dic) ou les anneaux (Ring) les lames sont colorées au Giemsa et observées au microscope à contraste de phase. Du nombre de chromosomes dicentriques ou d'anneaux, on déduira le nombre de cassures à l'origine de leur formation. Deux cassures interchromosomiques peuvent générer un chromosome dicentrique, deux cassures intrachromosomiques vont pouvoir générer un anneau.

II.3. Analyse des fragments de restriction télomériques (TRF) par Southern-blot.

II.3.1. Principe

L'ADN génomique extrait à différents passages des cultures cellulaires est digéré par deux enzymes de restriction, Rsa I, Hinf I. Après migration en gel d'agarose 0,5% et transfert sur membrane de nylon, l'ADN est hybridé avec une sonde (TTAGGG)₇ marquée au ³²P en 5'. Après lavage, la membrane est autoradiographiée ou analysée à l'aide d'un phosphoimager, afin de visualiser le profil de migration des TRFs.

II.3.2. Extraction de l'ADN génomique

La quantité de cellules utilisée pour extraire l'ADN correspond à deux flacons confluents de 75 cm² (de 5 à 20 millions de cellules). Le tapis cellulaire confluent est traité à la trypsine pour détacher les cellules, les cellules sont centrifugées à 1400 rpm pendant 7 minutes, le culot est repris dans du PBS.

Les cellules sont lysées dans un tampon STE (0,1 M NaCl ; 10 mM Tris pH 7,5 ; 1mM EDTA pH 8), SDS 1% final, protéase K 0,25 µg/ml final ; à 37° C pendant 30 minutes. Un volume de phénol est ajouté, après avoir été mélangée et centrifugée la phase aqueuse est extraite ; un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24 /1) est ajouté, on mélange et on centrifuge pour extraire la phase aqueuse. On dépose avec précaution 2 à 2,5 volumes d'éthanol 95% au dessus de la phase aqueuse. Il faut ensuite enrouler l'ADN sur une baguette de verre, au niveau de l'interphase, qu'il faut laisser sécher pour éliminer l'éthanol. L'ADN est redissout dans 3 ml de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA), la solution est ajustée à 0,1 M NaCl final. Après addition de RNase A 50 µg/ml final, la solution est mise à incuber à 37°C pendant 30 minutes, puis après addition de protéase K 12 µg/µl final la solution est remise à incuber 30 minutes à 37°C.

L'ADN est extrait par un volume de phénol et deux fois par un volume de Chloroforme/ alcool isoamylique ; comme précédemment l'ADN est précipité sur baguette de verre. Lorsque l'ADN est sec il est dissout dans 0,1 à 1 ml de TE stérile pour obtenir une concentration de 1 à 2 µg/µl. On mesure la DO de la solution sur un aliquot (20 µl d'ADN dans 1ml de TE) à 260 et 280 nm, le rapport DO280/DO260 doit être supérieur à 1,8.

II.3.3. Digestion de l'ADN

On pratique une double digestion sur 1 µg d'ADN. L'ADN est digéré par deux enzymes de restriction ayant de nombreux sites de coupures dans le génome :HinfI et RsaI. Chacune des digestions est effectuée avec 20 unités d'enzyme dans un volume de 40 µl et dure 2h30.

II.3.4. Migration

Le gel est un gel à 0,5% d'agarose avec 2 mg/ml de bromure d'éthidium pour colorer l'ADN (1,5 g d'agarose + 30 ml de 10 X TBE + 270 ml d'eau + 60 µl de BET à 10mg/ml). 1 µg d'ADN génomique digéré dans 40 µl est mélangé avec 12 µl de bleu de charge et déposé dans les puits. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est l'échelle de 1 kb (GIBCO BRL), 1 µl d'ADN + 21 µl d'eau sont chargés avec 5 µl de bleu de charge. La migration se déroule pendant 16 h, à 60 mV dans 2 litres de tampon 1 X TBE. Un premier cliché est pris au bout d'une heure de migration, un deuxième en fin de migration avec un système d'acquisition d'images, OSI image store 5000, équipé d'une caméra permettant de stocker l'image acquise sur disquette pour ensuite étalonner la migration.

II.3.5. Transfert du gel sur membrane de nylon

Le transfert de l'ADN du gel sur la membrane de nylon (HYBOND N) est réalisé avec un vacuum blotter APPLIGENE sous une pression de 50 mBar. Les étapes suivantes se déroulent sous une pression de 50 mBar : le gel est recouvert d'une solution de dépurination (HCl 0,25N) pendant 45 minutes pour faciliter le transfert des fragments de haut poids moléculaire puis le gel est recouvert d'une solution de dénaturation (0,5N NaOH/1,5M NaCl) pendant 45 minutes, puis d'une solution de neutralisation (1M Tris pH 7,4/ 3M NaCl) pendant 45 minutes et enfin d'un tampon 20xSSPE pendant 2 heures.

La membrane est séchée entre deux feuilles de papier Whatman et mise au four à 80 C pendant 2 heures ou au four à UV pendant deux secondes sous les conditions optimales, pour fixer l'ADN covalamment à la membrane.

II.3.6. Marquage de la sonde

La sonde est marquée en 5'au ^{32}P par la polynucléotide kinase en présence d'ATP $\gamma^{32}\text{P}$. La sonde marquée est ensuite purifiée sur une colonne de séphadex G50.

II.3.7. Préhybridation et hybridation de la membrane

La membrane est préhybridée avec 30 ml de solution de préhybridation filtrée (0,3 g bovine serum albumine Sigma fraction V, 15 ml Na_2HPO_4 1M, 10,5 ml SDS 20%, 60 ml EDTA 0,5 M, 4,5 ml d'eau) dans un tube pendant 1 heure à 62° C dans un four à hybridation. On ajoute une quantité de sonde telle que l'on ait 2 à 3×10^6 cpm / ml dans la solution de préhybridation, l'hybridation se déroule pendant au moins 12 heures.

II.3.8. Lavage de la membrane

Après élimination de la solution d'hybridation, la membrane est lavée 2 à 3 fois avec 25 ml de solution de lavage (1 ml Na_2HPO_4 1M, 1,25 ml SDS 20%, 0,125 ml EDTA 0,5M, eau qsp 25 ml) successivement pendant 5 minutes.

II.3.9. Révélation et analyse du profil de migration

Le profil est révélé soit par autoradiographie, la membrane est alors mise en cassette avec un film Amersham hyperfilm-MP à -80°C et le film est développé au bout de 3 à 5 jours, soit par phosphoimager.

Pour analyser le profil de migration, l'acquisition de l'image du profil de migration est, directe au phosphoimager avec le programme PHOSPHOANALYST, ou indirecte en digitalisant le film sous le programme ADOBE PHOTOSHOP.

II.3.10. Décomposition des profils de migration des TRFs par des courbes de la famille : $Y = A \exp(-a(X-X_0)^2)$

Cette méthode permet de mettre en évidence les différentes sous populations de TRFs composant un profil de migration.

Notons C la courbe du profil expérimental:

1-la première étape consiste à rechercher un premier pic 'évident' pour déterminer:

A : la hauteur du pic

X_0 : la valeur de X telle que $Y=A$

2-Puis il faut choisir un point de (X_i, Y_i) de C proche du point (X_0, A) , ce qui permet de calculer a, en minimisant la distance entre le profil expérimental et la courbe théorique:

$\theta = d^2 = (Y - Y_i)^2$: le carré de la distance entre Y et Y_i

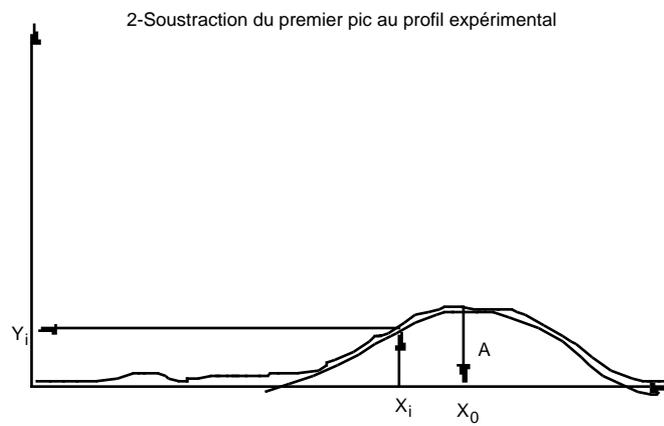
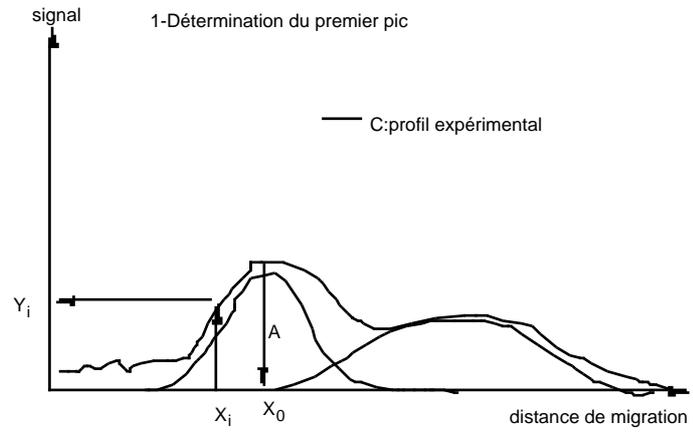
a est tel que: $d\theta/da = 0$; d'où $a = (1/(X_i - X_0)^2) X \ln(A/Y_i)$

3-Connaissant les trois paramètres A, X_0 , a, on soustrait le premier pic au profil C.

4-On poursuit comme en 1 pour trouver tous les pics.

5-A la fin, on compare la surface du profil expérimental à celle du profil reconstitué, le rapport des deux doit être proche de 1.

Exemple



III. RESULTATS

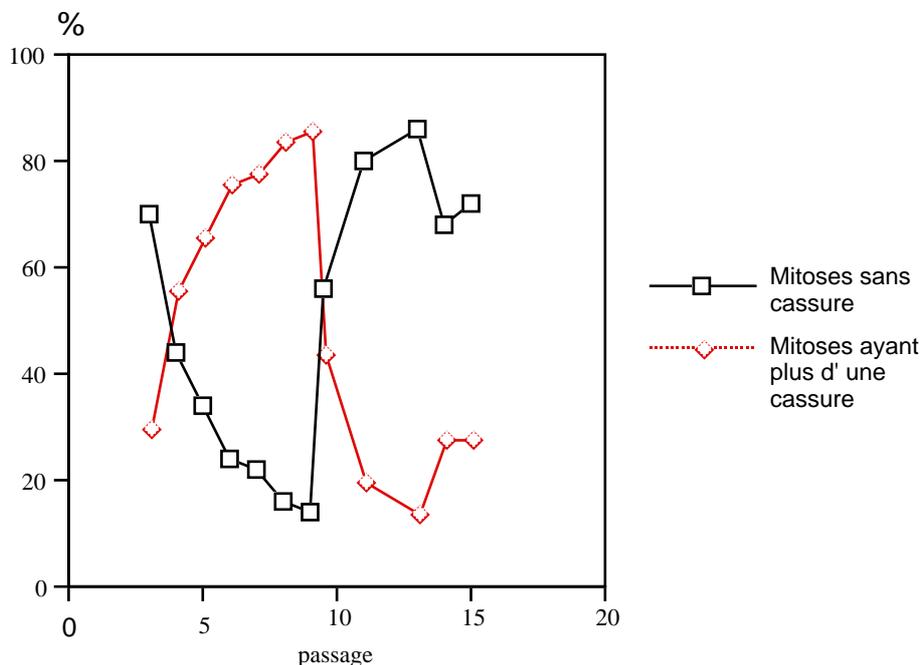
III.1. Cytogénétique

Mon travail a porté sur l'étude d'une lignée, TP 15.5, de fibroblastes de la peau transformés par l'antigène T de SV40 ; d'autres lignées établies à partir du même donneur ou à partir d'autres donneurs sont utilisées au laboratoire. La lignée TP 15.5 a été suivie depuis le passage 2 après transfection, elle est toujours en cours de culture.

III.1.1. Evolution générale de la stabilité des chromosomes dans la lignée TP 15.5

La coloration des mitoses au Giemsa permet d'évaluer la stabilité chromosomique globale en dénombrant les chromosomes dicentriques et les anneaux, ce qui permet de calculer le nombre de cassures chromosomiques qui se sont produites.

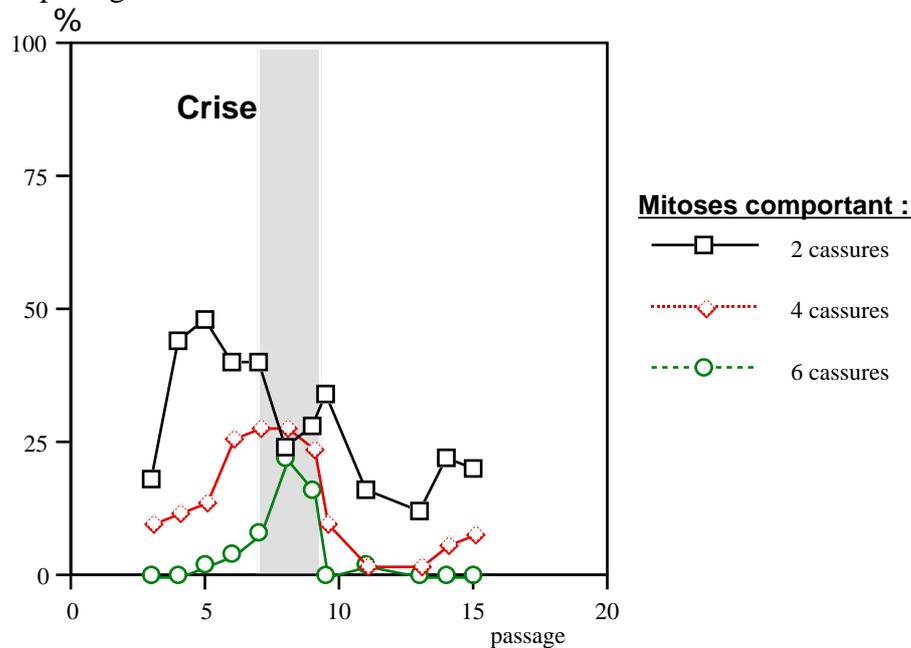
Au cours des passages après transfection il y a une très forte augmentation de la proportion de mitoses ayant plus d'une cassure jusqu'à la crise qui provoque la mort de la majorité des cellules. De la crise vont émerger des cellules dont la majorité ne comportent plus de cassures, il reste cependant une instabilité chromosomique résiduelle comme, après la crise il subsiste environ 20% de cellules ayant des cassures.



Evolution de la proportion de mitoses ne présentant pas de cassure et de la proportion de mitoses à plus d'une cassure

Parmi les cellules ayant plus d'une cassure chromosomique, on trouve, en première approximation, des cellules ayant deux cassures, quatre ou six (ou plus) cassures

chromosomiques. La proportion maximale de mitose comportant des cassures est d'autant plus petite que l'on s'approche de la crise. A la crise le nombre moyen de cassures par mitose est le plus élevé (cf figure ci-dessous). Les mitoses sont réparties en 4 classes : 0 cassures, 2 cassures, 4 cassures, 6 cassures ou plus. Les mitoses comportant deux cassures sont responsable de l'instabilité résiduelle, leur proportion est voisine de 20% ,après la crise, au passage 15.



Evolution de la proportion de mitoses ayant 2, 4 ou 6 cassures au cours des passages

III.1.2. Evolution de la stabilité des chromosomes 13 et 16 au cours des passages par HIS

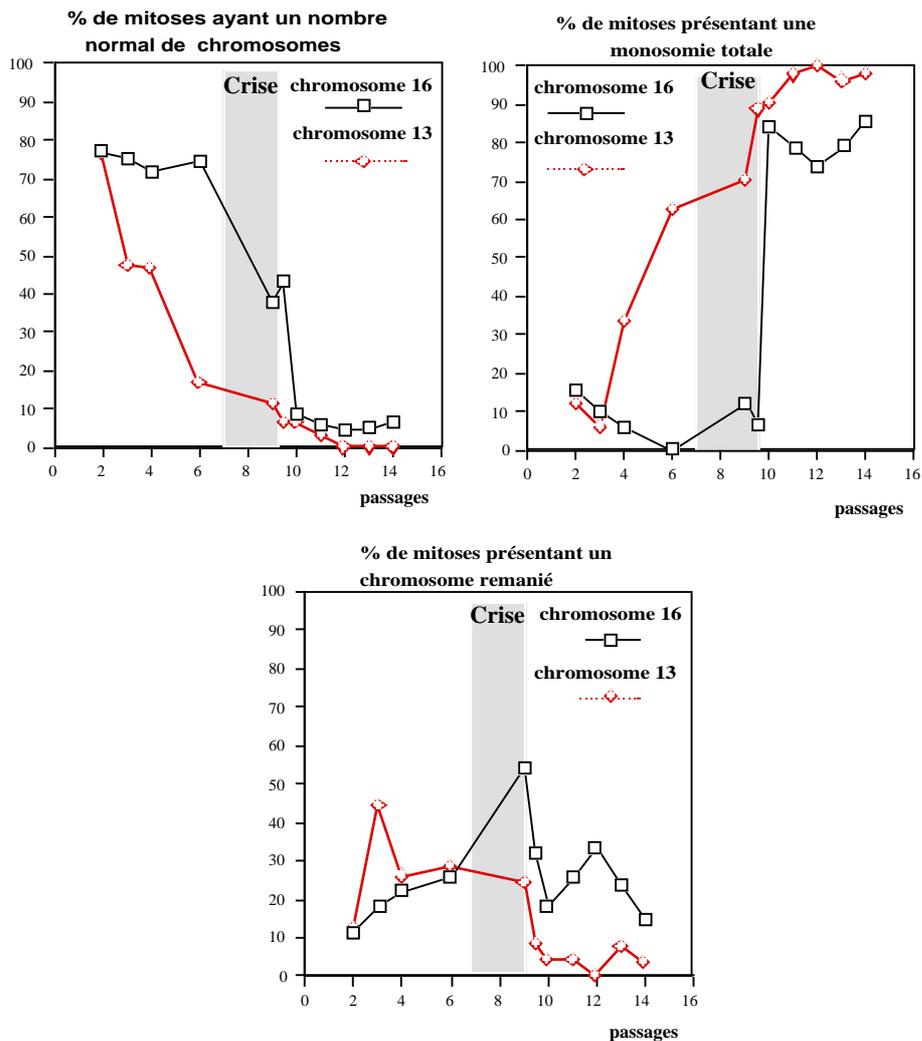
Il a été montré que le chromosome 13 est le plus impliqué dans l'instabilité chromosomique, après irradiation aux ions lourds, de plus le chromosome 16 était également fortement impliqué, de façon plus tardive, dans les remaniement observés. J'ai donc étudié plus particulièrement le devenir de ces deux chromosomes.

L'évolution de la stabilité des chromosomes 13 et 16 ont été suivie dans la lignée cellulaire TP 15.5 en dénombrant le nombre de chacun des chromosomes par mitose, d'où l'on déduit la proportion de mitoses normales, monosomiques ou remaniées (cf figure p14).

On considère comme normale une mitose comportant deux chromosomes 13 ou 16, pour une cellule diploïde ou quatre chromosomes 13 ou 16 pour une tétraploïde. De même une mitose monosomique aura un ou trois chromosomes 13 ou 16, enfin une mitose remaniée comportera au moins un chromosome 13 ou 16 remanié, dicentrique par exemple.

Dans les passages précédant la crise, au sein de la population cellulaire, le chromosome 16 est stable, on trouve 80% de mitoses normales, le nombre de mitoses remaniées avoisine les 10%. Pendant la crise, entre les passages 7 et 9, la stabilité du chromosome subit une brusque transition au passage 9, le nombre de mitoses normales diminue de 50%, conjointement la proportion de mitoses remaniées atteint une valeur maximale de 50% des mitoses observées. La proportion de mitoses présentant une monosomie est encore stable, à 10%. Après la crise, le devenir du chromosome 16 dans la population cellulaire s'oriente nettement vers une prédominance des cellules comportant une monosomie plutôt que vers une population de cellules ayant stabilisé un remaniement du chromosome 16, dans la mesure où, bien après la crise, ce sont les mitoses monosomiques qui sont majoritairement observées (80% des mitoses) et que le nombre de mitoses remaniées diminue. Il apparaît donc que les cellules ayant une monosomie sont sélectionnées au cours de la crise (cf figure ci-dessous).

Pour le chromosome 13, on observe le même type de sélection, mais celle-ci n'apparaît pas pendant la crise, elle est plus précoce.



II.1.3. Marquage des télomères par hybridation *in-situ*

Le marquage des télomères par HIS permet de visualiser les télomères individuellement dans une cellule métaphasique. Nous avons testé la validité de la méthode sur une lignée fibroblastique immortalisée par l'antigène T de SV40 : la lignée CHSV4. Cette étude a été réalisée à trois périodes différentes de la culture cellulaire : à un passage précoce précédant la crise (le passage 15 après transfection), à un passage succédant immédiatement la crise (le passage P32) et à un passage tardif (le passage P112).. Théoriquement les profils de signaux d'hybridation obtenus doivent correspondre à une baisse importante de la taille des télomères dans les premiers passages et à une stabilisation de la longueur des télomères aux passages tardifs correspondant à des clones cellulaires immortalisés présentant une réactivation de la télomérase.

Avec les sondes couplées à la biotine, dans le cas de la lignée CHSV4, trois paramètres ont été évalués, la proportion de chromosomes marqués, la proportion de chromosomes ayant plus d'un télomère marqué et l'intensité du marquage. Le marquage télomérique a été évalué sur chaque extrémité chromatidique. Donc, un chromosome métaphasique présente quatre extrémités. L'intensité du marquage est estimée sur une échelle de 1 à 3 (marquage faible=1, marquage moyen=2, marquage intense=3). Les tableaux ci-dessous résument les proportions moyennes de chromosomes marqués, de chromosomes ayant 1, 2, 3, ou 4 télomères marqués ainsi que l'intensité moyenne des signaux d'hybridation.

La première constatation est que le marquage des télomères est hétérogène au sein d'une mitose, aussi bien du point de vue du nombre de chromosomes marqués que de l'intensité du marquage pour des chromosomes différents et pour un même chromosome. On constate également que la proportion de chromosomes marqués, la proportion de chromosomes à plus d'un télomère marqué, l'intensité du marquage, sont susceptibles de varier au cours des passages étudiés. La proportion de chromosomes marqués évolue au cours des passages, elle est maximum au passage 112, minimum au passage 32. Du fait du faible nombre d'échantillons observés par passage, il n'est pas possible d'affirmer que ces variations sont statistiquement significatives. La proportion de chromosomes ayant plus d'un télomère marqué varie dans le même sens que la proportion de chromosomes marqués, elle est minimum au passage 32, maximum au passage 15. Cette fois-ci, la proportion de chromosomes à plus d'un télomère marqué est significativement plus élevée au passage 15 qu'au passage 32. L'intensité de marquage varie comme les deux autres paramètres ; l'intensité du marquage est moyenne au passage 15, faible au passage 32, moyenne au passage au passage 112. L'intensité du marquage est significativement plus forte au passage 112 qu'au passage 15 et qu'au passage 32. L'intensité du marquage est d'autant plus forte que le nombre de chromosomes marqués augmente.

CHSV4 P15	moyenne	écart-type	I80%
Chrom* (%)	61,86	7,38	53,8 ; 69,8
1 Tel *	28,2	17,4	9,25 ; 47,14
> 1 Tel *	64,2	20	42,3 ; 86,0
Marquage	2,16	0,23	1,90 ; 2,41

CHSV4 P32	moyenne	écart-type	I80%
Chrom* (%)	45,9	16,9	9,11 ; 82,6
1 Tel *	56,8	2,2	52,0 ; 61,5
> 1 Tel *	43,2	2,2	38,4 ; 47,9
Marquage	1	0	1

CHSV4 P112	moyenne	écart-type	I80%
Chrom* (%)	83,8	21,85	68,8 ; 98,7
1 Tel *	32,5	18,1	12,8 ; 52,2
> 1 Tel *	50,13	20	28,3 ; 71,9
Marquage	2,7	0,4	2,4 ; 2,9

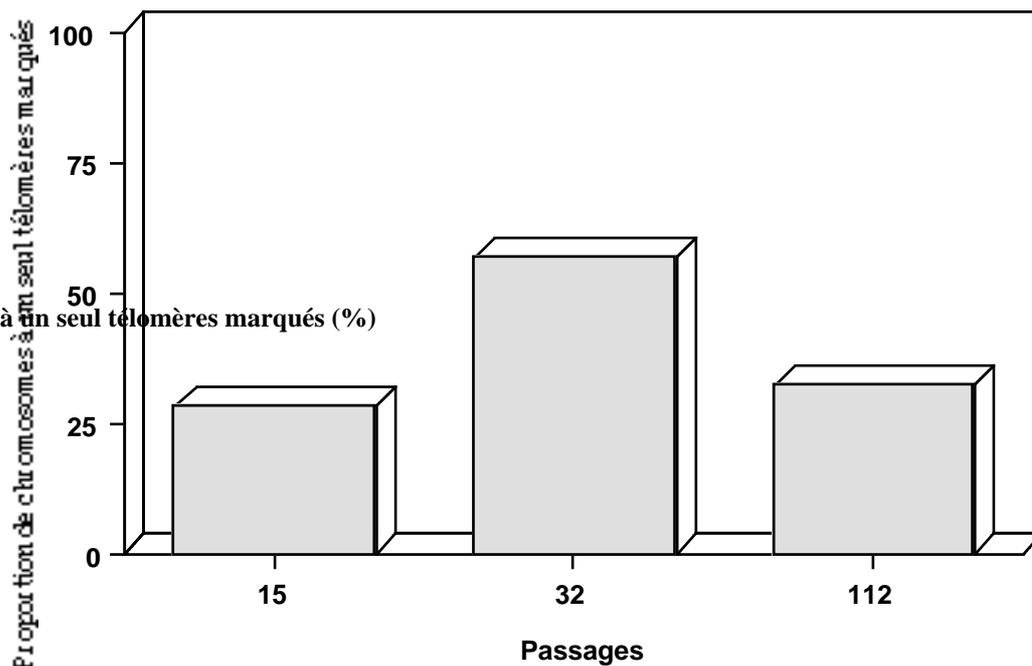
Marquage des télomères de la lignée CHSV4 par des sondes couplées à la biotine

Chrom* : proportion de chromosomes marqués

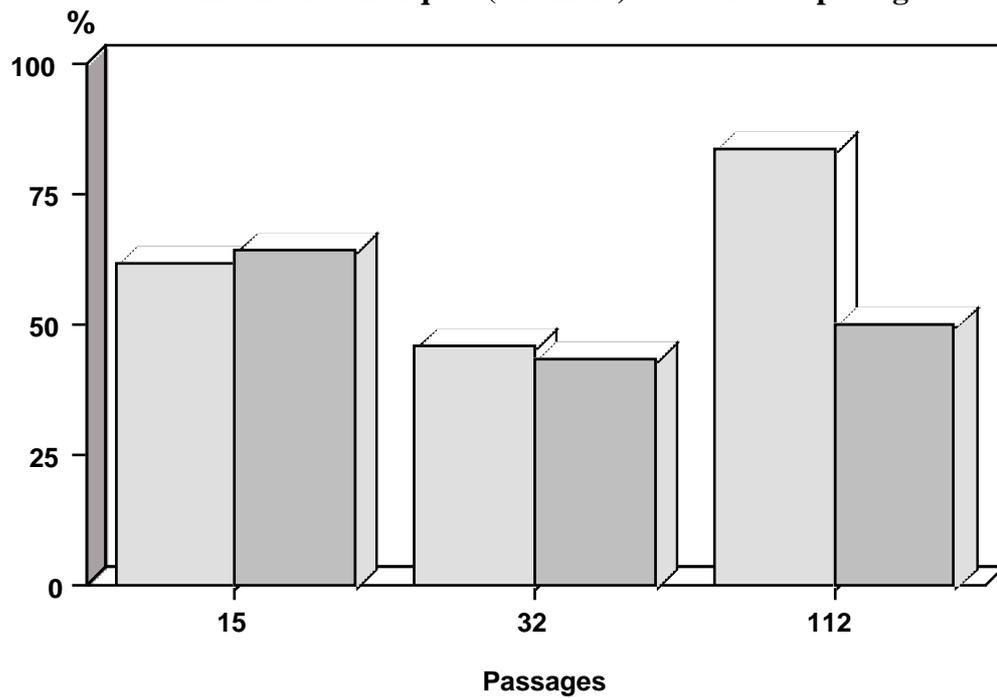
1 Tel * : proportion de chromosomes à 1 télomère marqué

> 1 Tel * : proportion de chromosomes ayant plus d'un télomère marqué

I80% : intervalle dans lequel la probabilité de trouver la moyenne est de P=0.8

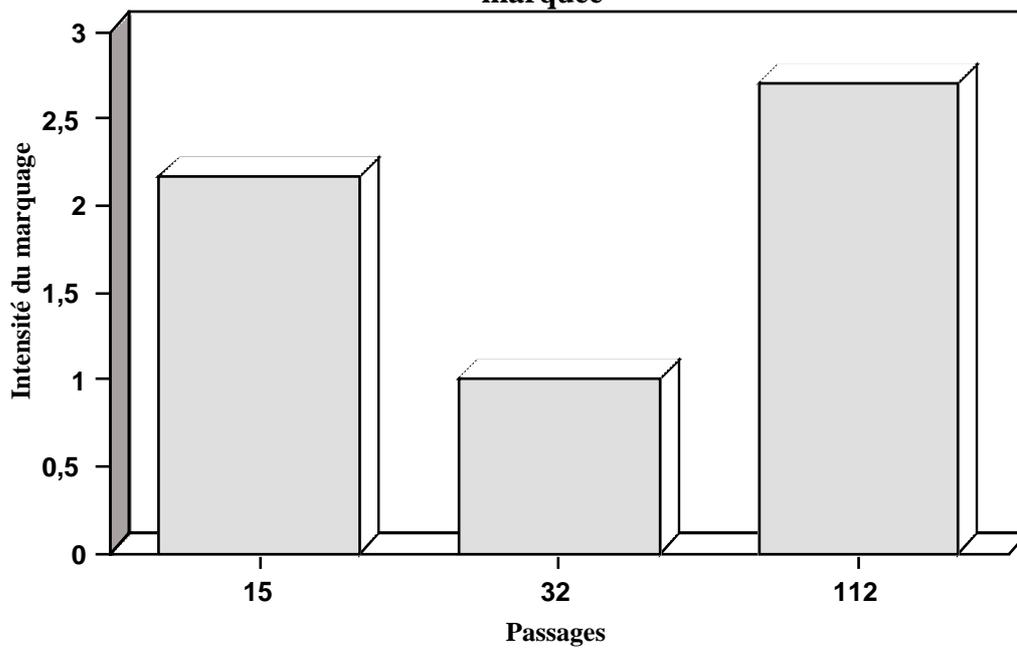


Evolution de la proportion de chromosomes ne présentant qu'une seule chromatide marquée (télomère) au cours des passages.



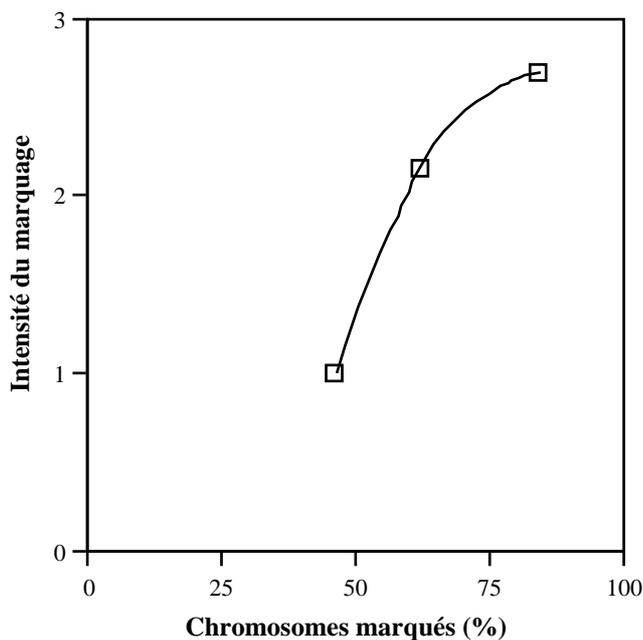
- Proportion de chromosomes marqués (%)
- Proportion de chromosomes à plus d'un télomère marqué (%)

**Evolution de la proportion : - de chromosomes présentant un marquage télomérique
- de chromosome présentant plus d'une chromatide marquée**



Evolution de l'intensité du marquage télomérique en fonction des passages.

Relation entre la proportion de chromosomes marqués et l' intensité du marquage



A cause de la disparition sur le marché des sondes couplées à la biotine, on a réalisé les expériences d'hybridation *in situ* avec les mêmes sondes couplées à la digoxigénine. Dans le cas des sondes couplées à la biotine, la proportion de chromosomes marqués varie de 43% à 84% selon les passages. Les sondes couplées à la digoxigénine n'ont permis d'obtenir chez une lignée de fibroblastes transformés par SV40, la lignée TP 15.5, au mieux qu'un marquage de 42% des chromosomes (cf tableau ci-dessous).

TP 15.5 P4	moyenne	écart-type	I 80%
Chrom* (%)	35,3	13,34	28 ; 42,6
1 Tel *	73,6	21,8	61,8 ; 85,5
> 1 Tel *	16,4	6,6	12,8 ; 20,0
Marquage	1,14	0,3	0,95 ; 1,32

TP 15.5 P6	moyenne	écart-type	I 80%
Chrom* (%)	39,31	10,83	30,4 ; 48,2
1 Tel *	59,2	29,7	26,8 ; 91,5
> 1 Tel *	50,13	nd	nd
Marquage	1,5	0,5	0,1 ; 2,9

TP 15.5 P9	moyenne	écart-type	I 80%
------------	---------	------------	-------

Chrom* (%)	38,4	11,28	30,7 ; 46,1
1 Tel *	77	12,15	68,7 ; 85,3
> 1 Tel *	16,4	11,3	8,7 ; 24,2
Marquage	1,25	0,4	0,9 ; 1,6

TP 15.5 P11	moyenne	écart-type	I 80%
Chrom* (%)	42	12	15,8 ; 68,1
1 Tel *	72,5	2,5	67 ; 77,9
> 1 Tel *	17,1	8,7	nd
Marquage	2	0	nd

TP 15.5 P15	moyenne	écart-type	I 80%
Chrom* (%)	24,99	3,5	17,2 ; 32,7
1 Tel *	84,4	4,44	74,7 ; 94,1
> 1 Tel *	nd	nd	nd
Marquage	1	0	nd

Marquage des télomères de la lignée TP 15.5 par des sondes couplées à la digoxigénine

Chrom* : proportion de télomères marqués

1 Tel* : proportion de chromosomes à 1 télomère marqué

≥ 1 Tel* : proportion de chromosomes ayant plus d'un télomère marqué

I80% : intervalle dans lequel la probabilité de trouver la moyenne est de P=0.8

nd : non déterminé

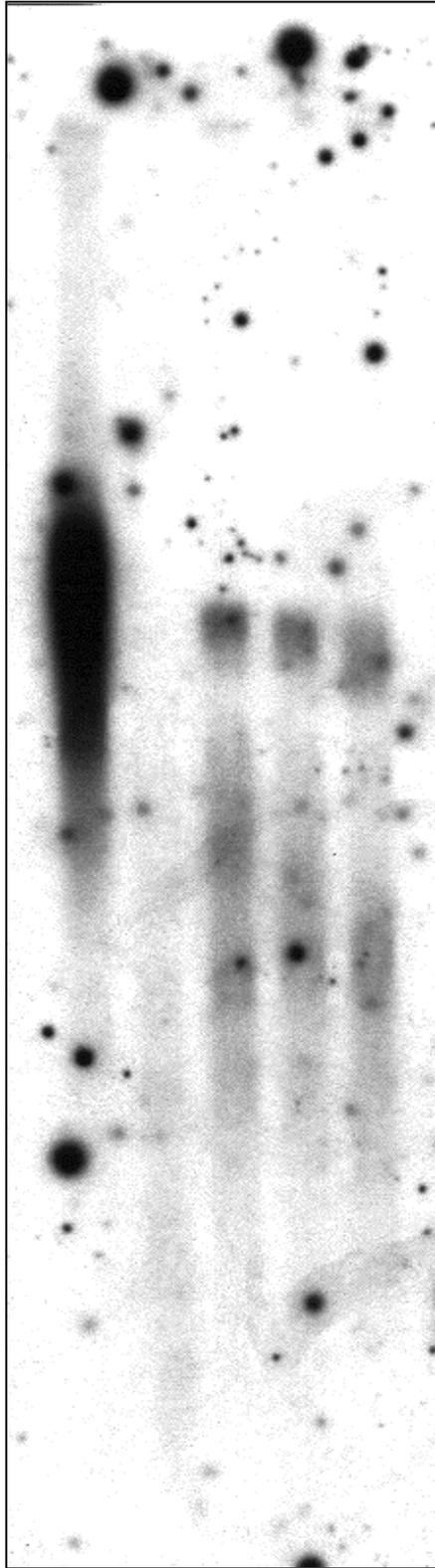
Aucun des trois paramètres ne varie selon les passages, dans cette lignée avec des sondes à la digoxigénine, la proportion de chromosomes à un seul télomère marqué est de 70% contre moins de 40% dans la lignée CHSV4 avec des sondes biotinylées. On peut expliquer ces résultats soit par des variations dans la qualité des sondes utilisées, soit par le choix des passages étudiés pour la lignée TP15.5. En effet, nous avons suivi des passages avant et juste après la crise (P4, P6, P9, P11, P15). Ceci correspond environ à des passages entre P15 et P34 pour CHSV4, qui a présenté une crise en P20. Or nous avons observé une diminution du taux général de marquage télomérique entre ces deux passages. Ceci correspondrait à un fort raccourcissement des séquences télomériques durant la crise. Ce raccourcissement se poursuivrait après la crise durant quelques passages.

Toutefois, afin d'éviter les problèmes liés au moins bon rendement d'hybridation in situ pour les sondes digoxigénines que pour les sondes biotinylées, il faudra synthétiser au laboratoire des sondes couplées à la biotine .

III.2. Analyse des séquences télomériques de la lignée TP 15.5 par Southern-blot

L'analyse par Southern blot permet d'étudier l'évolution de l'ensemble de la population des télomères (cf figure page 21).

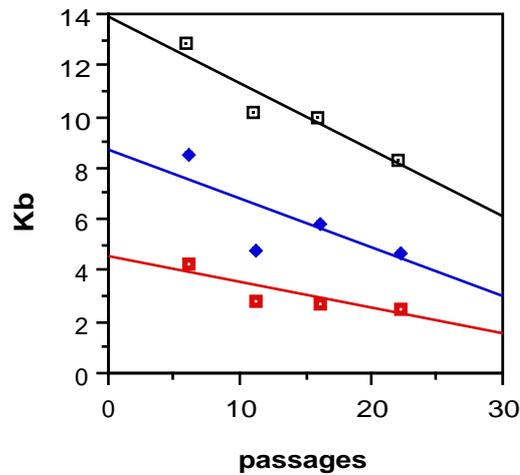
Les télomères des cellules témoins sont de grandes tailles : > à 14 kb pour l'ADN de placenta et environ 13kb pour les fibroblastes TP avant transformation. De plus leurs profils de distribution sont assez homogènes. Les cellules TP15.5 présentent un raccourcissement des séquences télomériques par rapport aux fibroblastes TP témoins. Ce raccourcissement augmente au fur et à mesure des passages en culture. De plus, l'analyse des séquences télomériques de la lignée TP 15.5 révèle très clairement, quel que soit le passage que l'on considère (du passage 6 au passage 22), que la distribution de ces séquences n'est pas unimodale mais hétérogène. Le profil de distribution des TRFs, au passage 6, montre de manière très reproductible l'existence de trois sous populations de fragments de restriction télomériques, lourde, moyenne et légère. Visiblement chaque sous population se distribue le long du gel selon une courbe en cloche, en décomposant le profil de migration des TRFs, on a toujours retrouver ces trois sous populations de TRF. Un lissage intensif des profils de migration ne permet pas de réduire le nombre de sous populations à moins de trois, de plus les profils reconstitués à partir des sous populations sont comparables aux profils obtenus expérimentalement, on peut donc considérer que la démarche proposant de décomposer un profil de migration est valide.



	Pic lourd (Kb)	Pic moyen(Kb)	Pic léger (Kb)	<TRF>	<Surface>
Témoïn Peau	10,14	6,33	3,22	7,87	7,6
TP15.5 P6	12,9	8,64	4,32	6,22	5,02
TP15.5 P11	10,14	4,88	2,94	4,38	4,82
TP15.5 P16	9,96	5,95	2,82	4,3	2,9
TP15.5 P22	8,33	4,81	2,6	4,2	3,45

On a choisit deux paramètres afin d'analyser l'évolution des sous population de télomères, la taille moyenne des TRFs, la surface du pic proportionnelle au nombre de séquences présentes.

La taille moyenne des télomères de chaque sous population décroît :

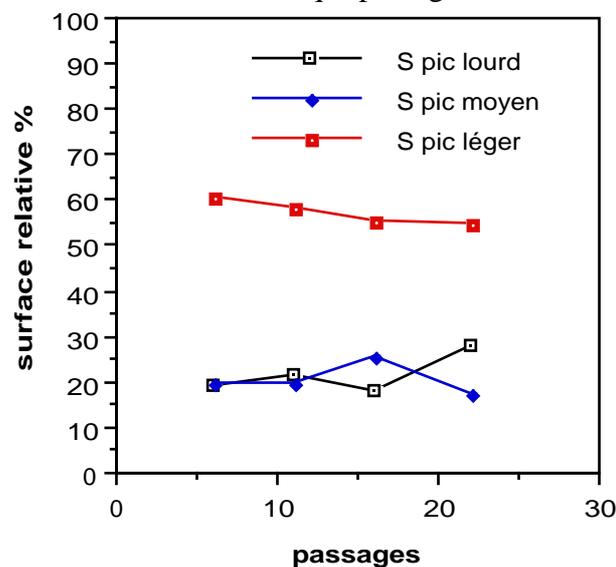


$$Kb = 13,920 - 0,26094p \quad R^2 = 0,889 \quad \square \quad \text{pic lourd}$$

$$Kb = 8,7379 - 0,19403p \quad R^2 = 0,551 \quad \blacklozenge \quad \text{pic moyen}$$

$$Kb = 4,5152 - 9,7833e-2p \quad R^2 = 0,739 \quad \blacksquare \quad \text{pic léger}$$

La surface relative de chaque pic par rapport à la surface totale du profil reste constante, bien que la surface totale diminue à chaque passage :



On montre également, en pondérant la taille moyenne des télomères de chaque sous population par la surface relative de chaque pic, que toutes populations confondues la taille moyenne des TRFs diminue. Le raccourcissement est encore plus marqué lors de la crise cellulaire.



Evolution de la longueur moyenne des trois sous populations de TRFs

La distribution initiale de la longueur des télomères est assez homogène, la sélection des clones s'accompagne rapidement, dès le passage 6, de l'apparition de population de télomères hétérogène dont la taille moyenne diminue au cours des passages, avec une diminution plus rapide pour les télomères les plus longs.

IV. DISCUSSION

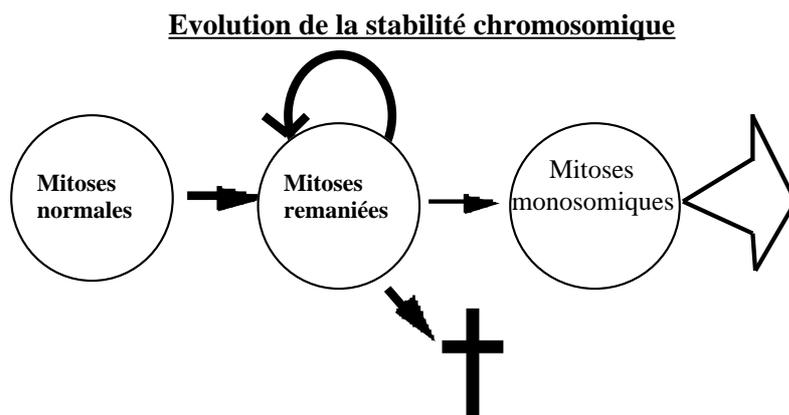
IV.1 Cytogénétique

IV.1.1. Evolution de la stabilité des chromosomes 13 et 16 .

Pour le chromosome 13 comme pour le chromosome 16, on observe une relation de type "précurseur-produit" entre la population de cellules présentant des mitoses normales et la population présentant des mitoses remaniées, de même entre la population cellulaire à mitoses remaniées et à mitoses monosomiques. En effet, pour ces deux chromosomes, lorsque la proportion de mitoses normales diminue, c'est la proportion de mitoses remaniées qui augmente pour diminuer ensuite quand la proportion de mitoses monosomiques augmente. La population de cellules normales engendrerait donc la population de cellules à mitoses remaniées qui à son tour engendrerait la population de cellules à mitoses monosomiques.

Les résultats sur l'instabilité chromosomique globale suggèrent qu'il se déroule une cascade de remaniements chromosomiques aboutissant à des mitoses à remaniements de plus en plus nombreux. Le taux de cassures chromosomiques augmente jusqu'à la crise, puis les cellules les plus instables disparaissent au delà.

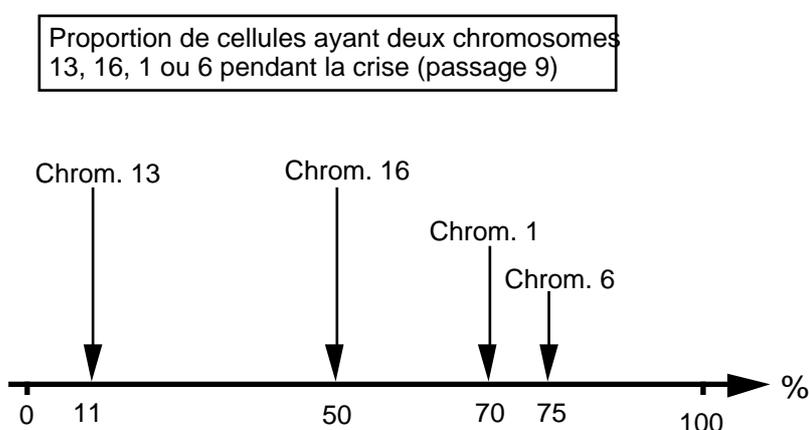
Comme on n'observe pas de crise de mortalité cellulaire au passage 3, correspondant au pic d'instabilité du chromosome 13, toutes les cellules présentant un remaniement chromosomique, ne seraient pas vouées à la mort. Les cellules ayant une monosomie totale du chromosome 13 ou du chromosome 16 auraient un avantage prolifératif sur les cellules comportant un de ces deux chromosomes réarrangés.



IV.1.2. Stabilité relative des chromosomes 13, 16, 6, 1

Le chromosome 1 est impliqué de manière un peu moins importante après irradiation, chez le donneur. Le Chromosome 6 est fréquemment altéré dans le fibroblastes transformés par SV40. Pour les chromosomes 13, 1 et 6, les données proviennent d'autres études effectuées au laboratoire

Dès le passage 3, 50% des cellules ont un lot de chromosomes 13 remaniés. L'instabilité du chromosome 16 est maximale au passage 9 ; concernant les chromosomes 6 et 1, pendant la crise 70 et 75% des cellules ont deux chromosomes 1 et 6 respectivement. On peut donc classer les chromosomes par ordre de stabilité (Figure ci-dessous) :



Au cours de la transformation, vont se succéder une suite d'instabilités chromosomiques dans la population de cellules en culture. La chronologie d'instabilité des différents chromosomes observée pourrait s'expliquer de deux manières. Les cellules pourraient acquérir un avantage sélectif en perdant un chromosome donné à un passage précis (mais cette hypothèse est peu probable). L'autre possibilité serait que certains chromosomes, comme le 13, auraient des télomères très courts, les cycles de réplication se succédant leurs télomères raccourciraient jusqu'à ce qu'ils ne soient plus capables d'assurer la stabilité du chromosome. L'existence de population de chromosomes à télomères plus ou moins longs permettrait d'expliquer cette succession d'instabilité touchant des chromosomes différents ; dans cette optique le chromosome 13 appartiendrait à une population de chromosomes à télomères très courts, le chromosome 16 à une population à télomères légèrement plus longs et les chromosomes 1 ou 6, à une population à télomères encore plus longs.

IV.2. Analyse des profils de migration en Southern Blot

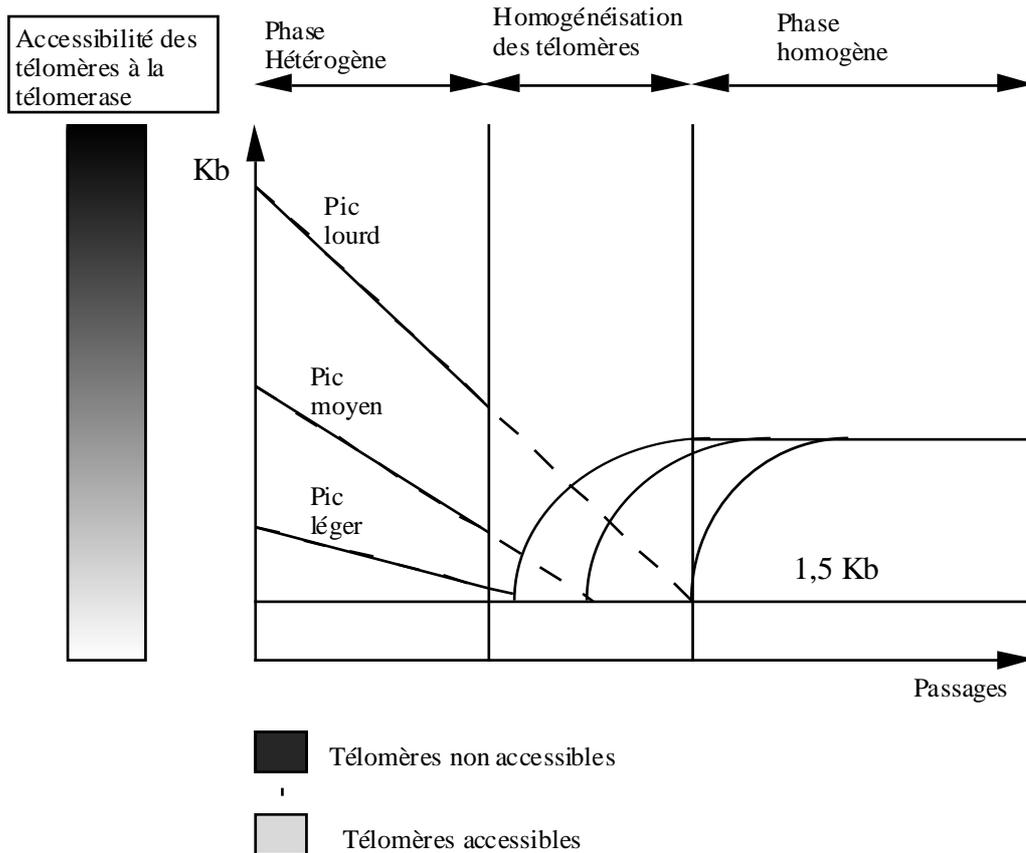
La vitesse de délétion des télomères n'est pas constante, elle est maximum entre les passages 6 et 11 qui bornent la crise, ceci s'explique par le fait que durant la crise la mortalité cellulaire étant élevée, il faudra que les cellules survivantes effectuent plus de divisions pour repeupler un flacon.

L'hétérogénéité des profils s'explique par la superposition des trois sous population de TRFs. L'origine de cette hétérogénéité peut être intercellulaire, à chaque passage il existerait des sous populations de cellules à télomères longs, moyens ou courts en rapport avec la vitesse de division cellulaire. Elle peut être également d'origine intracellulaire, c'est à dire qu'au sein même de la cellule il coexisterait des sous populations de télomères de longueur différentes. Comme les expériences d'hybridation *in situ* des télomères, révèlent qualitativement, dans une même mitose, une hétérogénéité de marquage aussi bien interchromosomique qu'intrachromosomique, l'hétérogénéité des profils de migration doit être d'origine intracellulaire plus qu'intercellulaire. Cette question doit pouvoir être tranchée en étudiant la distribution de l'intensité des signaux d'hybridation. Trouver une distribution trimodale des signaux d'hybridation irait dans le sens d'une hétérogénéité intracellulaire.

Les modèles de la dynamique des télomères, actuellement, proposent qu'après la crise, les télomères rallongent. L'explication est qu'en deça d'une taille critique des télomères, les chromosomes deviennent instables, la pression de sélection est telle que seule les cellules pouvant mettre en oeuvre un mécanisme capable de rallonger les télomères vont survivre. Les mécanismes invoqués sont la réactivation de la télomérase ou la recombinaison entre séquences télomériques.

Les résultats obtenus ne sont pas entièrement compatibles avec de tels modèles, simplement car les télomères continuent de diminuer après la crise. Cependant, certaines observations de Counter et al vont dans ce sens, toutefois ces données n'ont pas été prises en compte lors de la discussion des résultats publiés (13).

Notre postulat est le suivant : **la télomérase est déjà active lors de la crise cellulaire et les télomères sont d'autant plus accessibles à la télomérase qu'ils sont courts.** La vitesse apparente de délétion des télomères serait alors la composante de la vitesse de délétion propre au mécanisme de la réplication de l'ADN et de la vitesse d'élongation par la télomérase (celle-ci dépendant de l'accessibilité des télomères). Si cette hypothèse reflète la réalité, on doit s'attendre à voir la taille des télomères de la population "légère" décroître puis augmenter jusqu'à une longueur limite où les télomères ne sont plus accessibles. Le même phénomène doit se dérouler pour les télomères de la population "moyenne" et "lourde". Comme la longueur des télomères de chaque sous population doit passer par cette taille seuil aux passages tardifs la distribution de la longueur des TRFs devrait être unimodale, d'où le schéma suivant :



Une observation vient appuyer ce modèle. La distribution, pour une lignée donnée, est homogène aux passages tardifs.

Il y aurait peut être présence de l'activité télomérase pendant la crise, le fait que la longueur des télomères continue de décroître après la crise, pourrait s'expliquer par le fait que la télomérase n'agirait que sur des télomères suffisamment courts. Il faut rappeler que les télomères sont constitués par un complexe D'ADN et de protéines, le raccourcissement des télomères pourrait promouvoir le décrochage de certaines de ces protéines le rendant ainsi accessible à la télomérase. Les travaux de Murnane et al indiquent que la dynamique d'élongation des télomères s'effectue par bond (17).

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous avons pu mettre en évidence une chronologie d'apparition de l'instabilité chromosomique au cours du processus d'immortalisation cellulaire. Cette chronologie serait directement gouvernée par la taille respectives des séquences télomériques des chromosomes impliqués dans l'instabilité. Cette hétérogénéité semble confirmée tant au niveau chromosomique (HIS) qu'au niveau moléculaire (Southern Blot).

L'hypothèse selon laquelle l'instabilité spécifique varierait d'un donneur à l'autre, s'expliquerait par le fait que la taille des télomères d'un chromosome varierait d'un donneur à l'autre.

Il s'avère toutefois indispensable de confirmer ces observations sur d'autres lignées en cours d'immortalisation, provenant du même donneur. Nous étudierons aussi l'instabilité spécifique pour d'autres donneurs. Puis, nous nous focaliserons sur la comparaison, pour un même donneur, de la chronologie des instabilité chromosomiques au cours de la transformation de cellules d'origines différentes : épithéliales/fibroblastes.

Notre objectif est d'ainsi démontrer le rôle clé de l'instabilité chromosomique comme une étape dans le processus de cancérogénèse. En effet, nous observons que le mécanisme d'instabilité chromosomique permet le passage de cellules normales, à un état remanié puis monosomiques. Ce mécanisme permettrait, *in vivo*, le passage d'une cellule normale diploïde à une cellule tumorale aneuploïde. Or dans les tumeurs solides, dont l'occurrence augmente dans le dernier tier de la vie (donc dans des cellules vieillissantes), on trouve des cellules avec des profils chromosomiques déséquilibrés. Ces profils sont récurrents pour un type de tumeur donné et varie d'un type de tumeur à l'autre. Sous l'effet d'un stress généralisé, comme le vieillissement par analogie avec la sénescence *in vitro*, selon la distribution de la taille des télomères d'un chromosome à l'autre, chaque individu pourrait avoir une probabilité plus élevée de développer tel type de tumeur solide plutôt que tel autre.