Instabilité chromosomique et longueur des télomères

Etude par analyse d'image dans de lignées fibroblastiques transformées par SV40

Jean-Patrick Pommier
CEA-CIRIL

Organisation génomique des télomères

- Séquences répétées en tandems directs jointifs.
- Localisation terminale, brin G orienté en 3’

•Localisation intrachromosomique : Blocs de tandems inverses (ex HS 2q13-q14) ?

Localisation des signaux télomériques

HIS sur chromosomes métaphasiques humains, avec une sonde PNA $(CCCTAA)_3$-Cy3

Cercomona mona (male)

Hamster lignée V79

Porc

Caryotype bovin: marquage purement télomérique

Détection des motifs TTAGGG sur chromosomes métaphasiques

Sondes

- **PNA (CCCTAA)$_3$-FITC**
- **PNA (CCCTAA)$_3$-Cy3**
  - **Directement fluorescentes**
  - **Spécificité très grande**
  - **Stabilité des complexes PNA-DNA**

Chromosomes

- **DAPI (Bandes Q)**

Acquisition des images

- **CCD monochromes**
  - **caméra 8bits (256 niveaux de gris)**
  - **caméra 12bits (4096 niveaux de gris)**

Mesure des signaux télomériques par segmentation binaire

Etiquetage des spots binaires

Type de spot
(Etiquettes en type de spot)

Localisation
(coordonnées cytogénétique)

Etiquetage des chromosomes

Combinaison des informations

Volume des spots

Type
4 couleurs

Localisation
2 couleurs

Objet
46 couleurs

Caryotype
24 couleurs

Homologue
2 couleurs

Standardisation des mesures

- Variabilité des mesures d'intensité des signaux
  - D'un champ à l'autre.
  - D'une lame à l'autre.
  - Selon les expériences
  - Biais dans l'analyse des mesures absolues
  - Calibration externe, mesures en Kb (Lansdorp)
- Nécessité d'une indépendance des mesures / conditions
  - Calibration interne
  - Standardisation interne : mesures centrées-réduites

$$S^*_{i,k} = \frac{S_i - \overline{S}_k}{\sigma_k}$$

Diagramme *pter-qter*

Recherche d'une différence de longueur des télomères entre les chromosomes homologues:

Cas des chromosomes 1 dans les fibroblastes primaires TP (P14).

*

Distinction des chromosomes 1 homologues

Association du marquage télomérique fort au marquage hétérochromatique foncé (P=0.08)

Recherche d'hétéromorphismes télomériques

About Cytogenetic Assistant

Cytogenetic Assistant

Version 1.0

Chromosomes Analysis System

Copyright 1998 CEA

OK

System Info...

Cytogenetic Assistant, User - p5 - [Segmentation]
File Options Tools Help
Capture
Segment
Karyotype
Results
Parameters
Zoom In
Zoom Out
Paintings
Slide
Session
Metaphase
Component
Image
p4137
1
24
DAPI
1
Original
Filtered
Object #3
Object #4
Object #5
Object #6
Object #7
Object #8
Object #9
Object #10
Object #11
Object #12
Object #13
Object #14
Object #15
Object #16
Object #17
Object #18
Object #19
Object #20
Object #21
Object #22
Object #23
Object #24
Object #25
Object #26
Object #27
Object #28
Object #29
Object #30
Object #31

Cytogenetic Assistant
File
Options
Tools
Help
Capture
Segment
Karyotype
Results
Parameters
Zoom In
Zoom Out
Paintings
Slide
Session
Metaphase
Component
Image
p497
24
CY3
2
Original
Filtered
Object #132 - Normal/Normal - q (47)
Object #133 - Double - q (40)
Object #134 - Normal/Normal - p (47)
Object #135 - Normal/Normal - q (48)
Object #136 - Normal/Normal - q (48)
Object #137 - Normal/Normal - q (47)
Object #138 - Normal/Normal - p (44)
Object #139 - Normal/Normal - p (44)
Object #140 - Double - q (5)
Object #141 - Normal/Normal - q (45)
Object #142 - Normal/Normal - q (45)
Object #143 - Normal/Normal - q (43)
Object #144 - Normal/Normal - q (43)
Object #145 - Normal/Normal - q (46)
Object #146 - Normal/Normal - q (46)
Object #147 - Normal/Normal - p (5)
Object #148 - Normal/Normal - p (5)
Object #149 - Normal/Normal - p (6)
Object #150 - Normal/Normal - p (6)
Object #151 - Double - q (6)
Object #152 - Normal/Normal - q (48)
Object #153 - Normal/Normal - p (49)
Object #154 - Normal/Normal - q (48)
Object #155 - Normal/Normal - p (49)
Object #156 - Double - p (50)
Object #157 - Normal/Normal - p (48)
Object #158 - Normal/Normal - q (48)
Object #159 - Normal/Normal - p (48)
Normal
Double
Not
ppair
qpair
npair
Chromosome...

Cytogenetic Assistant. User - gr5 - [Karyotype]
File Options Tools Help
Capture
Segment
Karyotype
Results
Parameters
Zoom In
Zoom Out
Paintings
Slide
jp407
Metaphase
Not classified
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

_jp437#24

Sort by Index
Sort By Column
Export To Excel

	A/B	CHROMOSOME	CONFIG_P	CONFIG_Q	PAIR_ VOLUME_P	PAIR_ VOLUME_Q
9	0	23		0	77345.000000	68210.000000
45	1	23		1	80359.000000	49426.000000
11	0	22		1	110518.000000	87923.000000
40	1	22	1	0	52692.000000	127384.000000
4	1	21	1	1	107422.000000	59054.000000
32	0	21	0	1	113981.000000	51898.000000
35	1	20	1	1	69158.000000	58027.000000
50	0	20	0	0	62962.000000	46176.000000
16	1	19	1	1	67986.000000	94125.000000
23	0	19	1	0	25673.000000	136214.000000
20	0	18	1	1	132311.000000	112338.000000
24	1	18	1	1	110258.000000	102913.000000
22	0	17	1	1	72811.000000	33072.000000
10	0	16	1	1	113918.000000	87437.000000
28	1	16	1	1	92333.000000	69621.000000
12	1	15	1	1	87757.000000	101847.000000
39	0	15	1	0	70148.000000	105768.000000
15	1	14	1	1	103232.000000	66745.000000
44	0	14	1	0	79211.000000	79961.000000
34	1	13	1	1	122105.000000	104389.000000
42	0	13	1	0	32013.000000	20585.000000
17	1	12	1	1	68871.000000	82464.000000
30	0	12	1	1	95036.000000	59815.000000
6	0	11	1	0	45431.000000	80350.000000
18	1	11	1	0	83310.000000	134044.000000
31	0	10	0	1	131789.000000	104942.000000
41	1	10	1	1	76032.000000	24669.000000
19	1	9	1	0	84032.000000	153486.000000
29	0	9	1	1	58075.000000	58360.000000
36	0	8	1	1	31489.000000	130605.000000
46	1	8	1	1	77048.000000	62125.000000
3	1	7	1	1	165899.000000	142903.000000
49	0	7	1	1	51231.000000	127224.000000
8	1	6	0	[NULL]	94350.000000	[NULL]
26	0	6	1	0	78901.000000	35134.000000
25	0	5	1	1	99217.000000	60011.000000
47	1	5	1	1	150378.000000	53933.000000
43	0	4	1	1	79587.000000	105062.000000
48	1	4	1	1	52128.000000	58854.000000
5	0	3	1	0	68748.000000	88356.000000
14	1	3	1	0	212003.000000	157983.000000
13	0	2	1	1	149490.000000	87397.000000
27	1	2	1	1	75500.000000	61683.000000
33	0	1	1	1	100068.000000	123334.000000
38	1	1	0	1	208851.000000	94606.000000
21	1	0	1	1	85968.000000	129869.000000
37	0	0	1	[NULL]	66833.000000	[NULL]

Parameters
General
Chromosome Segmentation
Telomere Segmentation
Number of chromosome pairs of the species
24
Minimum size of objects
4

L'INSTABILITÉ CHROMOSOMIQUE EST SPÉCIFIQUE QUELQUE SOIENT LES ÉVÈNEMENTS INDUISANT LA PROLIFÉRATION

HYP : CARACTÉRISTIQUE INTRINSÈQUE DES TÉLOMÈRES

Buts

- Relation entre la longueur des télomères et la stabilité des chromosomes.

- Mesure de la longueur des télomères
  - **cellule par cellule et chromosome par chromosome**
  - **Comparaison de la longueur des télomères à l'intérieur d'une même cellule.**
  - **Comparaison d'un télomère d'une cellule à l'autre.**

Fusions télomériques dans les fibroblastes sénescents

(Benn 1976)

Chromosomes dicentriques dans les fibroblastes TP

Effets à long terme d'une irradiations aux ions lourds.

Réactivation de l'activité télomérase dans les fibroblastes transformés par LTAg SV40.

Hétérogénéité de la longueur des FRTs dans deux lignées LTAgSV40

Relation entre l'instabilité chromosomique, la longueur des télomères et l'activation de la télomérase

1) érosion des télomères

précrise télomérase OFF -> instabilité chromosomique

postcrise télomérase ON -> chromosomes relativement stables

2) homogénéisation de la taille des télomères

-> évolution autour d'une taille "optimale

Avant crise : corrélation inverse entre la taille moyenne des télomères et le nombre de dicentriques

HYP :
Les télomères courts sont instables

TP15.5, Peteb
-> hétérogènes

MRC5
-> homogènes

La taille critique est-elle identique pour toutes les lignées ?

Erosion des télomères pré et post crise

Corrélation entre l'activation de la télomérase et un ralentissement de la perte des séquences télomériques

- allongement et dégradation en faveur d'un raccourcissement télomérique

- pas d'élongation : la télomérase perturbe le fonctionnement de l'exonucléase

Le taux d'érosion des FRTs varie en fonction de la longueur des télomères dans le clone TP15.5

La télomérase agirait préférentiellement sur les plus petits télomeres

Présence de fusions télomériques après crise TP15.5 P13

Homogénéisation des signaux télomériques TP 15.5 P55

Evolution de l 'hétérogénéité inter/intracellulaire des signaux télomériques au cours de la transformation par LTAgSV40

(Ducray 1999)

Evolution de l 'hétérogénéité intracellulaire des signaux télomériques au cours de la transformation par LTAgSV40

Existence d ’un seuil de la longueur des télomères induisant une instabilité chromosomique

Autres facteurs indépendant de la longueur:

Présence de signaux télomériques intesticiels (NHEJ?)

Ku 86 ?

Origine de l'hétérogénéité de la longueur des télomères?

Facteurs d'homogénéisation:

Télomérase

Réplication

HYPOTHESE

Par recombinaison entre télomères.

Rôle de la méïose?