

**Comparaison du potentiel de division
cellulaire par quantification des signaux
télomériques**

- **Sénescence cellulaire**
 - Modèles fibroblastiques
 - Cellules hématopoïétiques
- **Déterminisme de la sénescence**
 - Correlation entre FRTmoyen et DPmax (fibroblastes)
 - Cellules immortelles mais normales
- **Méthodes d'estimation de la longueur des télomères**
 - Southern et slots blots
 - FISH
 - Cytométrie en flux
 - Microscopie

Sénescence réplivative:modèle fibroblastique

Les fibroblastes primaires ont un potentiel de division
limité *in-vitro*

- Indépendant de l'âge du donneur.
- Dépendant du donneur: 30-60 DPmax

Cristofalo et al. 1998

Sénescence réplivative:cas des lymphocytes

- Les cellules hématopoïétiques ont un potentiel de division limité *in-vitro* (1)
 - DPmax: Naïves > mémoires
 - supérieur à celui des fibroblastes
- Les cellules hématopoïétiques auraient un potentiel de division limité *in-vivo*
 - SIDA (2)

(1) Weng, Levine et al. 1995

(2) Ho 1995, Wei 1995

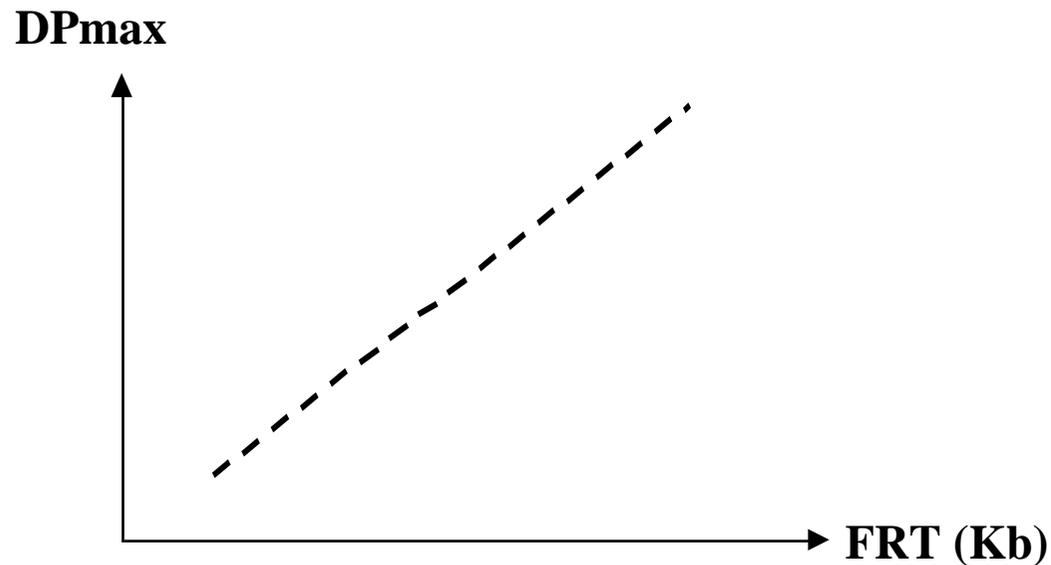
Sénescence réplivative:cellules épithéliales

- Les cellules épithéliales sénescent en culture:
 - ex: Kératinocytes oraux

Déterminisme de la sénescence cellulaire

Rôle des séquences télomériques

- Corrélation positive et significative entre la longueur des télomères en début de culture et le nombre maximum de doublement de population cellulaire



Allsopp et al. (1992)

Déterminisme de la sénescence cellulaire

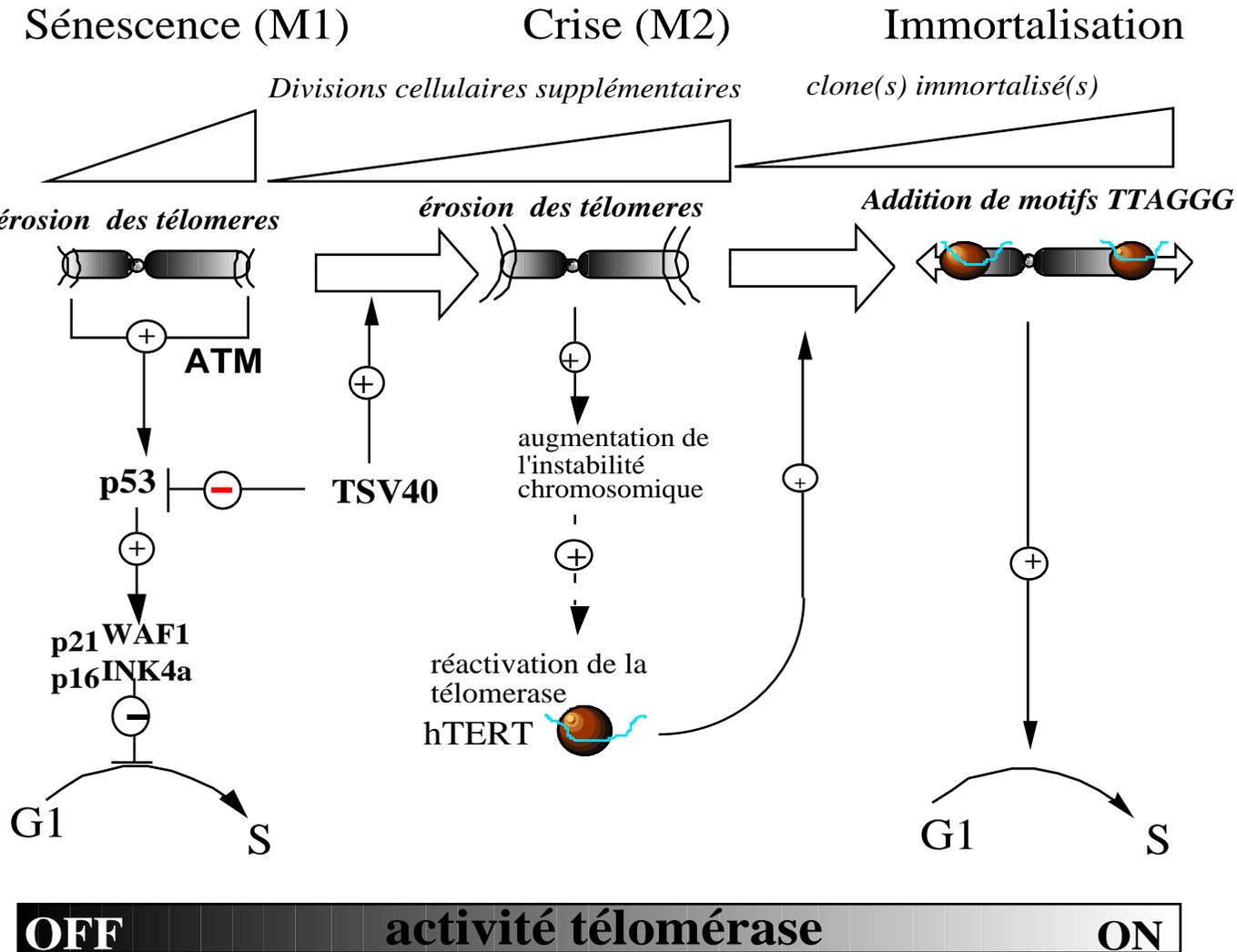
Rôle des séquences télomériques

- L'expression ectopique de hTERT rend les fibroblastes primaires immortels en conservant un phénotype normal.

Bodnar, Ouellette et al. (1998)

Morales et al. (1999)

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



Méthodes d'estimation de la longueur des télomères

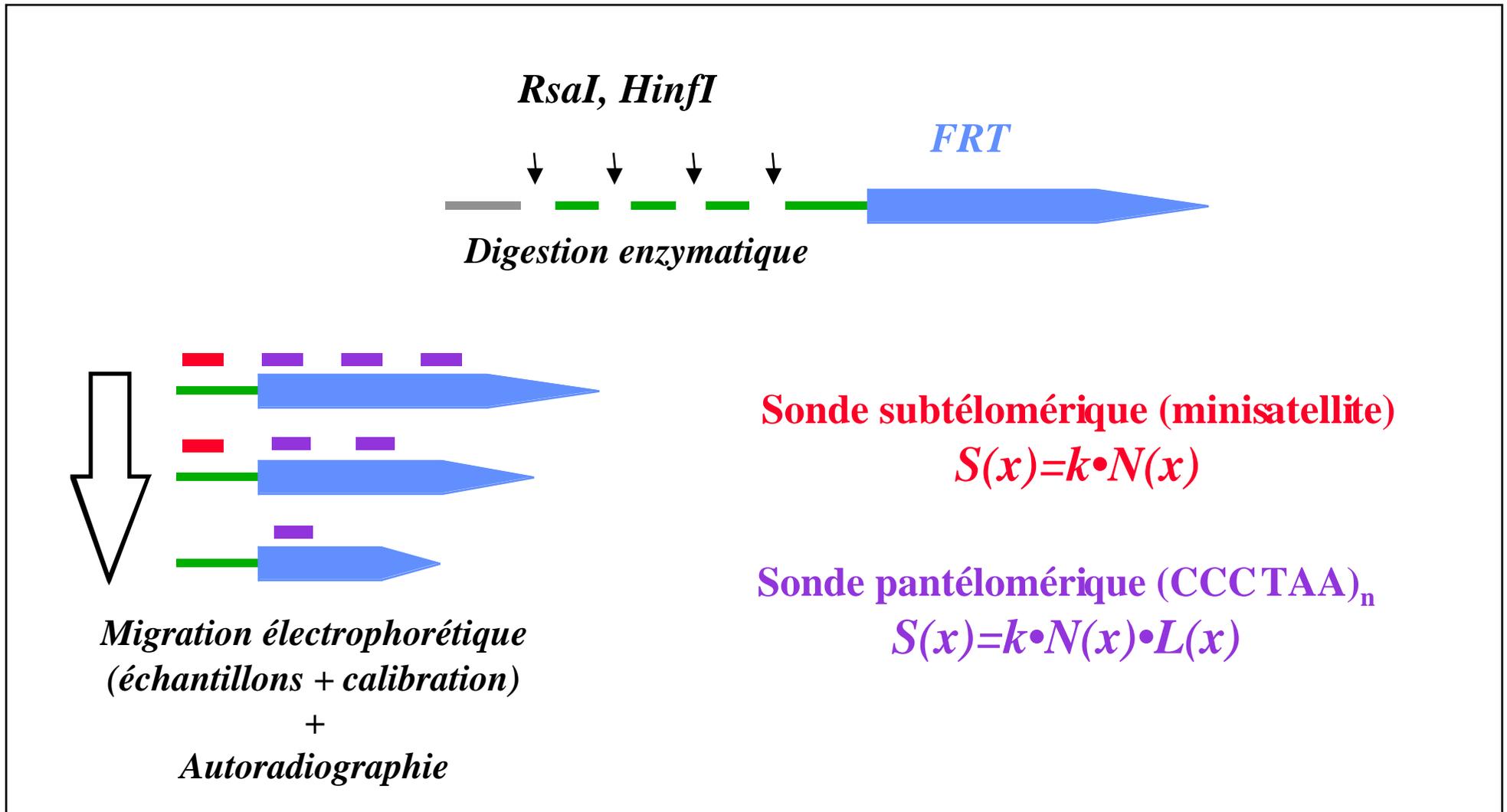
Support	Méthode	Sonde	Marquage	5	6	Ref
ADN génomique	Southern Blot	Telomérique	Chaud	<ul style="list-style-type: none"> •Sensibilité : ^{32}P •Calibration interne •Mesure en Kb 	<ul style="list-style-type: none"> •Quantité ADN •Effet longueur de la cible •Smearing non linéaire •Non télomère spécifique •Subtelo inconnu •Durée •Sensible à la fragmentation de l'ADN •Echantillonnage 	1, 2, 3
			Froid	<ul style="list-style-type: none"> •Pas de ^{32}P •Calibration Interne 	<ul style="list-style-type: none"> •<i>idem</i> sonde chaude •Sensibilité? 	4
		Subtelomérique	Chaud Froid ?	<ul style="list-style-type: none"> •Télomère spécifique 	<ul style="list-style-type: none"> •Disponibilité sonde? •Homologue spécifique? 	5, 6, 7, 8, 9
ADN génomique /Cellules	Slot Blot	Télomérique +alpoïde (ou autre)	Chaud	<ul style="list-style-type: none"> •Quantité ADN •min=9ng •1250 cellules •Insensible à la fragmentation de l'ADN 	<ul style="list-style-type: none"> •Calibration externe pour la longueur •Hybridation séquentielle •Quantité totale 	10

Métaphase	FISH	Télomérique (+autres)	Froid	<ul style="list-style-type: none"> •Hybridation simultannée •Télomère spécifique •Homologue spécifique •Calibration interne. 	<ul style="list-style-type: none"> •Représentativité 12, 13, métaphases/noyaux 14, (Culture cellulaire) 15, •Traitement 16, informatique lourd • Calibration externe pour la longueur ?
Noyaux	FISH	Télomérique (+autres)	Froid	<ul style="list-style-type: none"> •Hybridation simultannée •Quantité de cellules 	<ul style="list-style-type: none"> •Calibration externe 17 pour la longueur •Focalisation (100x)
	Flow FISH	Télomérique (+alpoïde)	Froid	<ul style="list-style-type: none"> •Rapidité 	<ul style="list-style-type: none"> •Cytométrie en flux 18, 19

Méthodes d'estimation de la longueur des
télomères par *Southern blot*

Analyse de la longueur des FRTs

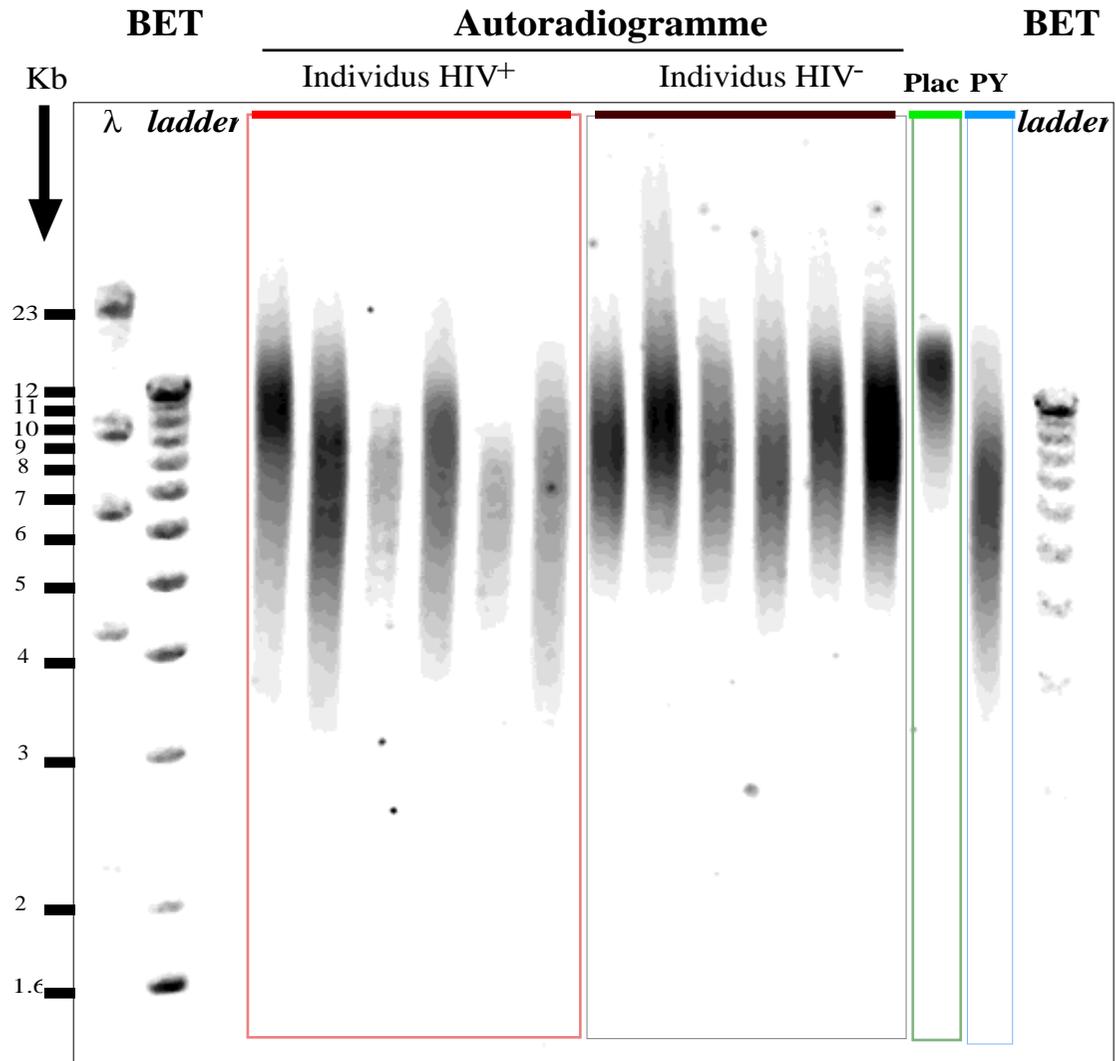
Principes



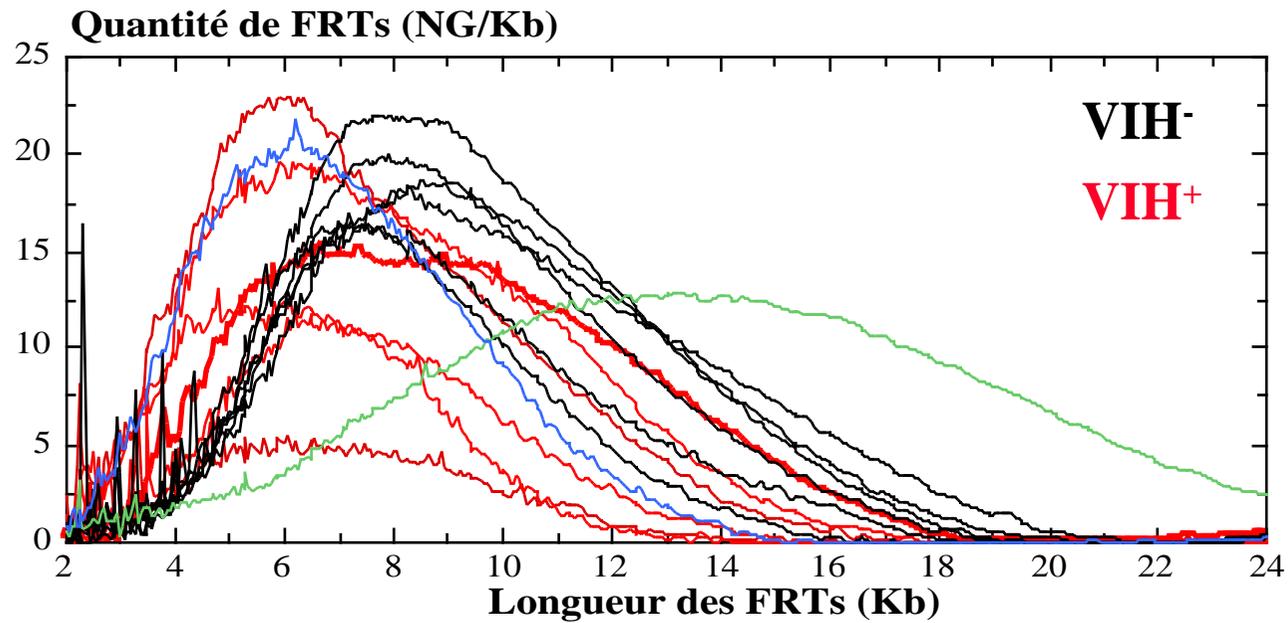
La distribution de la longueur des télomères en *Southern*, est hétérogène.

- Superposition de la distribution de la longueur de chaque télomère à l'intérieur de chaque cellule (Hétérogénéité intracellulaire)
- Superposition de la longueur d'un même télomère d'une cellule à l'autre (Hétérogénéité intercellulaire)

Southern-Blot Patients VIH⁺ vs VIH⁻

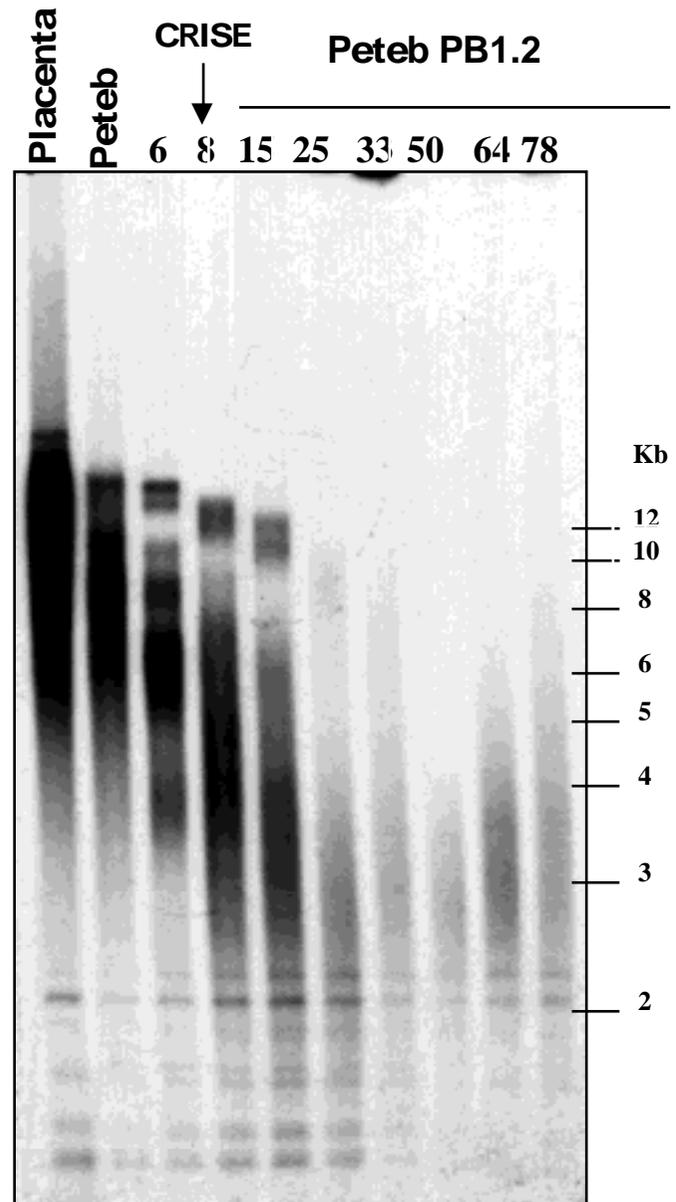
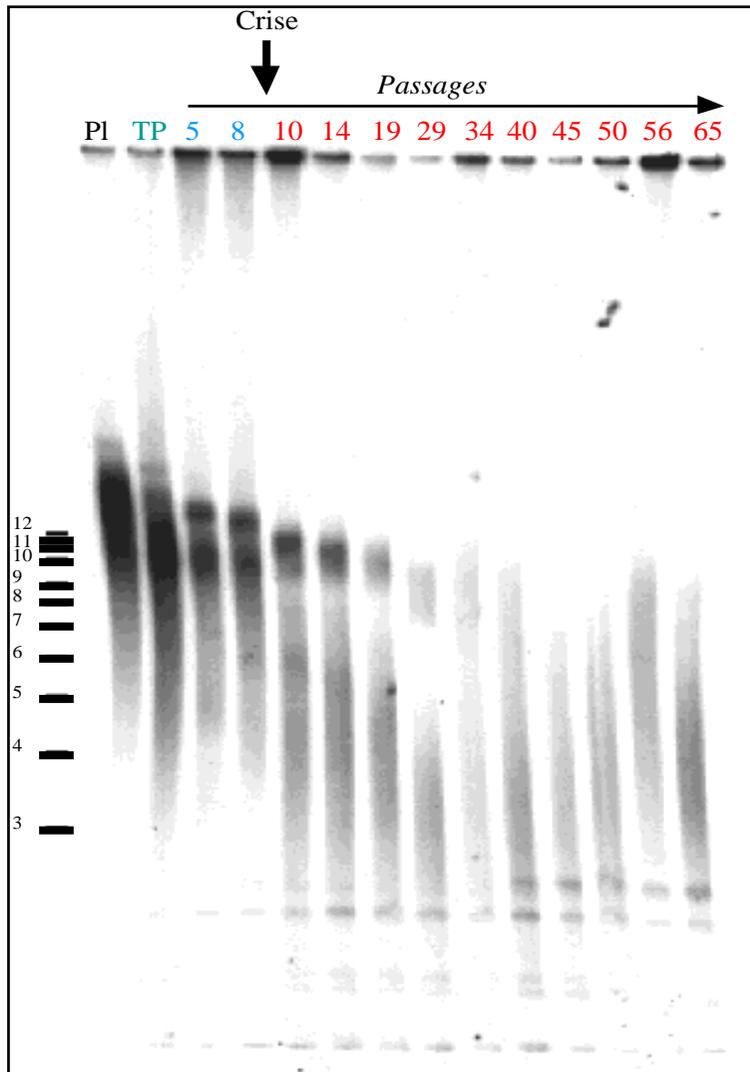


Histogramme de la longueur des télomères dans les lymphocytes au cours de l'infection au VIH



Hétérogénéité de la taille des télomères

TP15.5



Méthodes d'estimation de la longueur des télomères par *FISH*

Chromosomes métaphasiques:
Estimation de l'hétérogénéité intracellulaire

Détection des motifs TTAGGG en FISH

Sondes

PNA (CCCTAA)₃-FITC

PNA (CCCTAA)₃-Cy3

Directement fluorescentes

Spécificité très grande

Stabilité des complexes PNA-DNA

Chromosomes

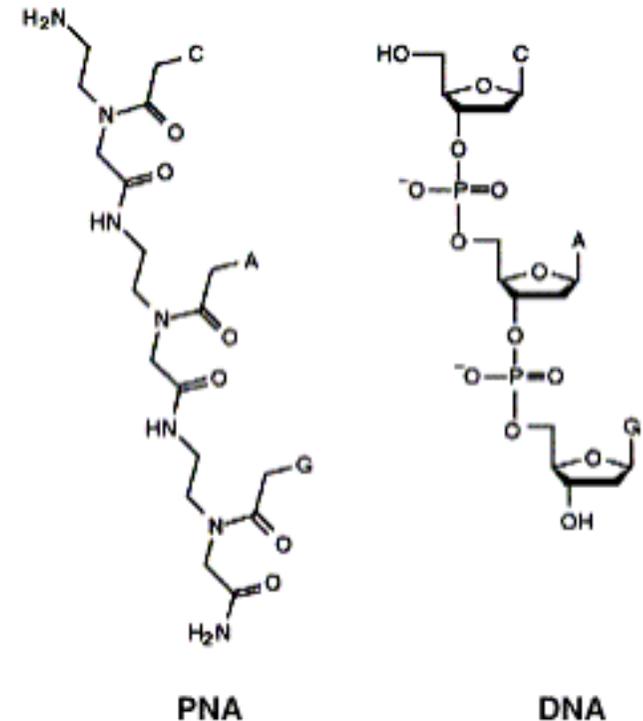
DAPI (Bandes Q)

Acquisition des images

CCD monochromes

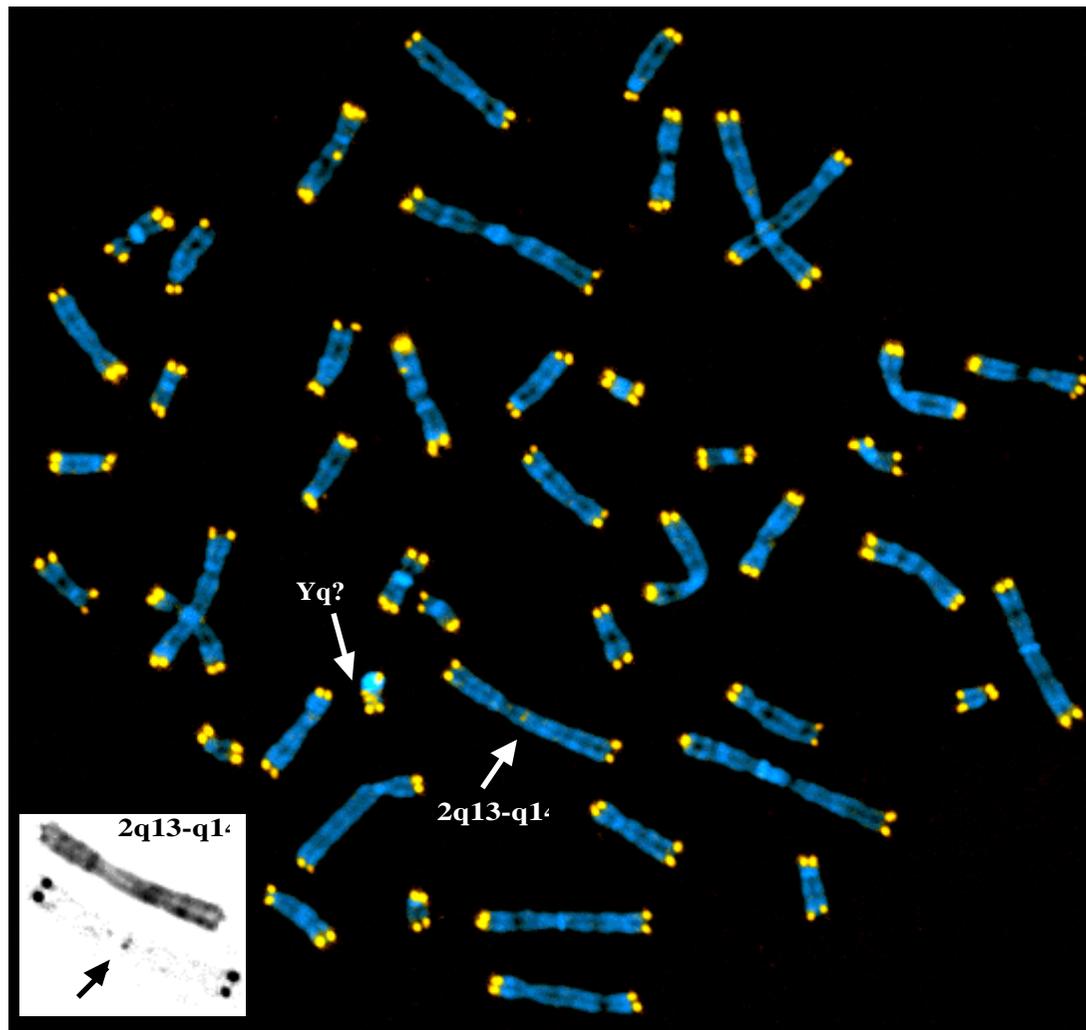
caméra 8bits (256 niveaux de gris)

caméra 12bits (4096 niveaux de gris)

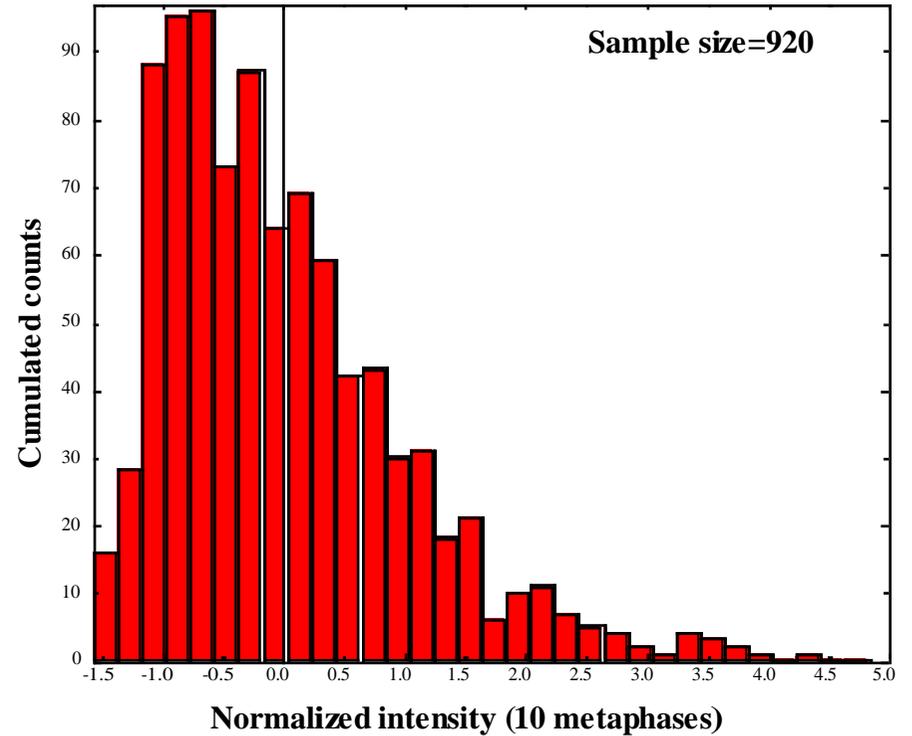
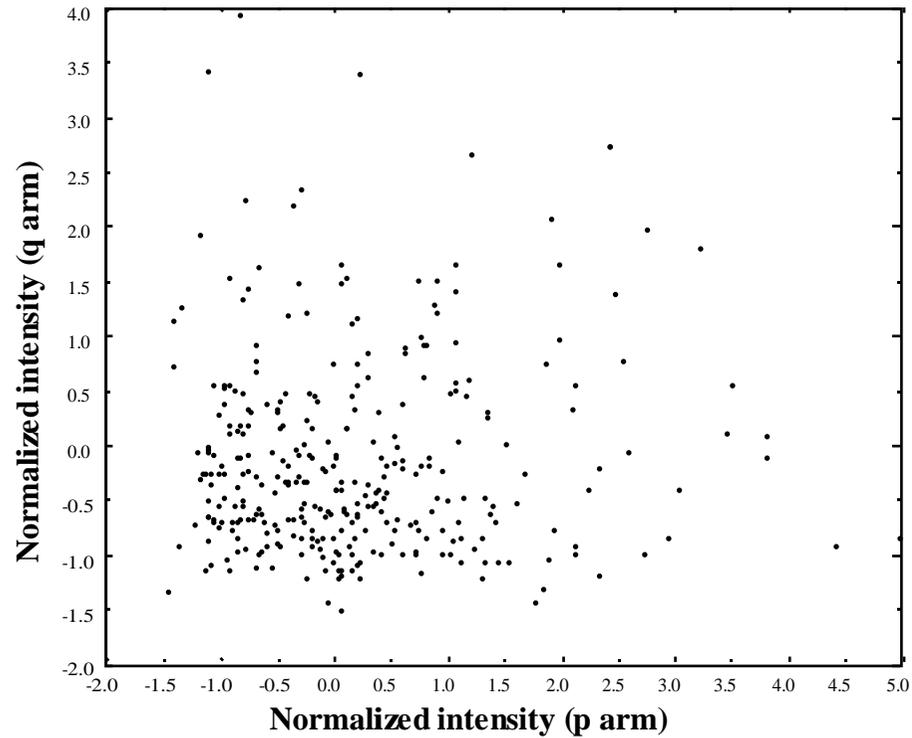


Localisation des signaux télomériques

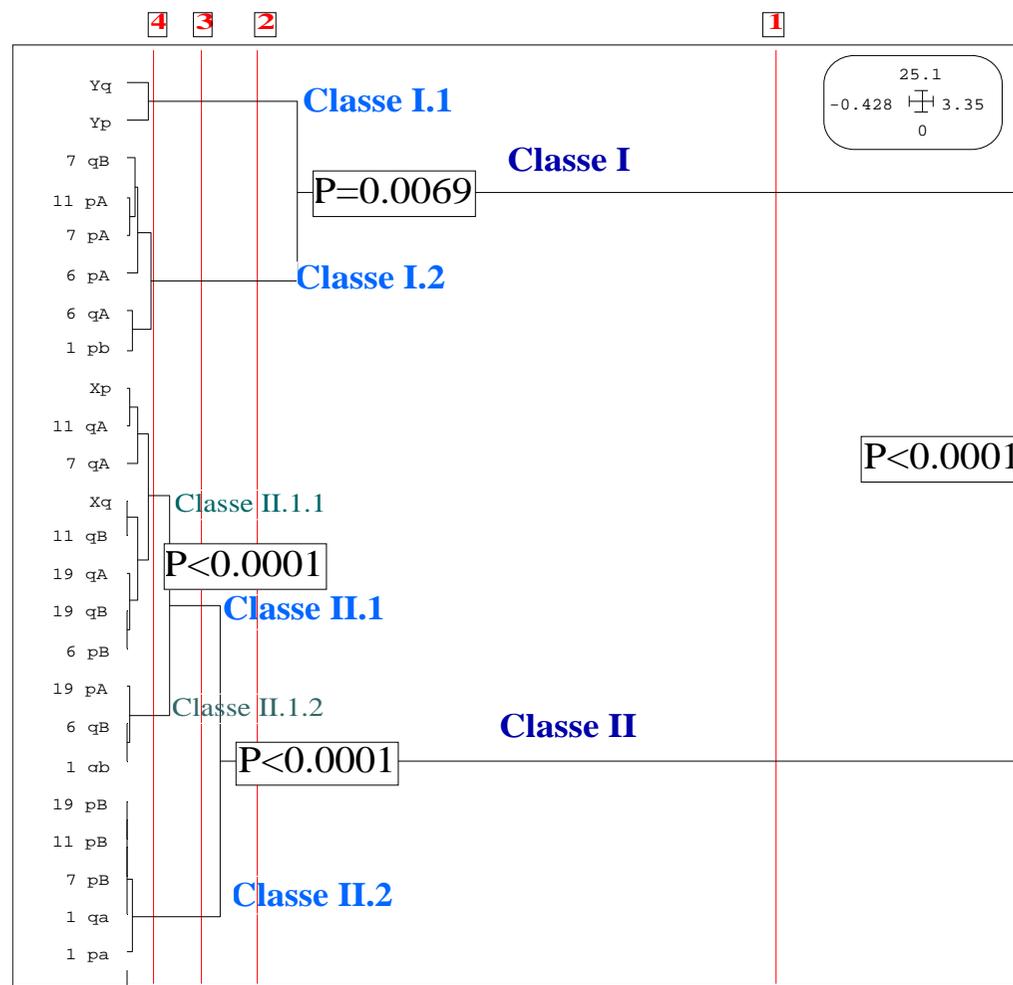
HIS sur chromosomes métaphasiques humains, avec une sonde PNA (CCCTAA)₃-Cy3



Hétérogénéité intracellulaire de la longueur des télomères dans des fibroblastes primaires (TP P14)



5 sous classes de télomères



confirmation de l'hétérogénéité de longueur des télomères (southern)

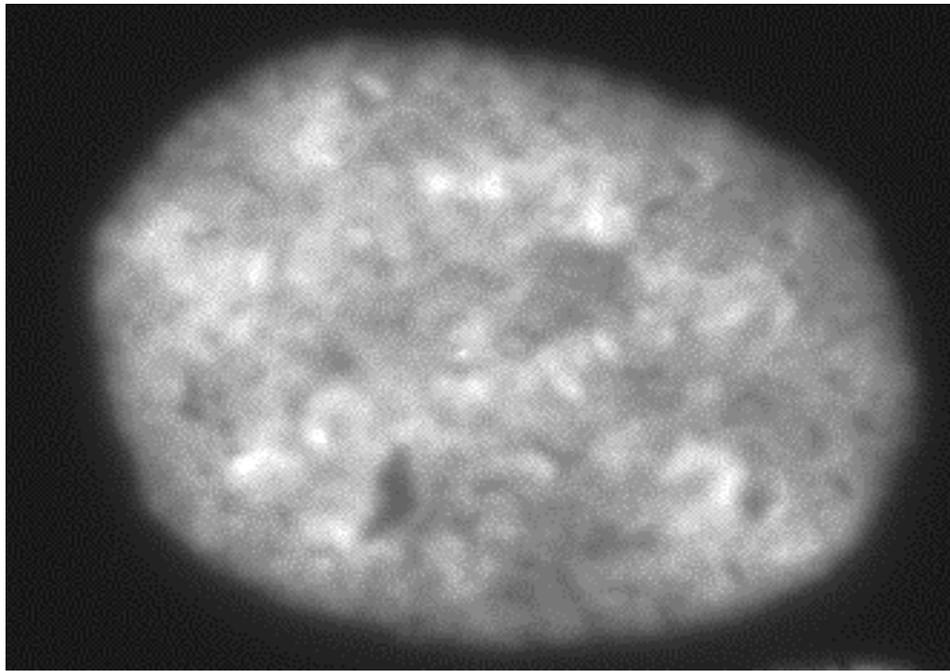
Analyse de la distribution sur chromosomes métaphasiques

- Requier
 - une culture cellulaire
 - un caryotypage (identification de chaque télomère)
- Permet
 - de distinguer les chromosomes homologues
 - de suivre le devenir d'un seul télomère

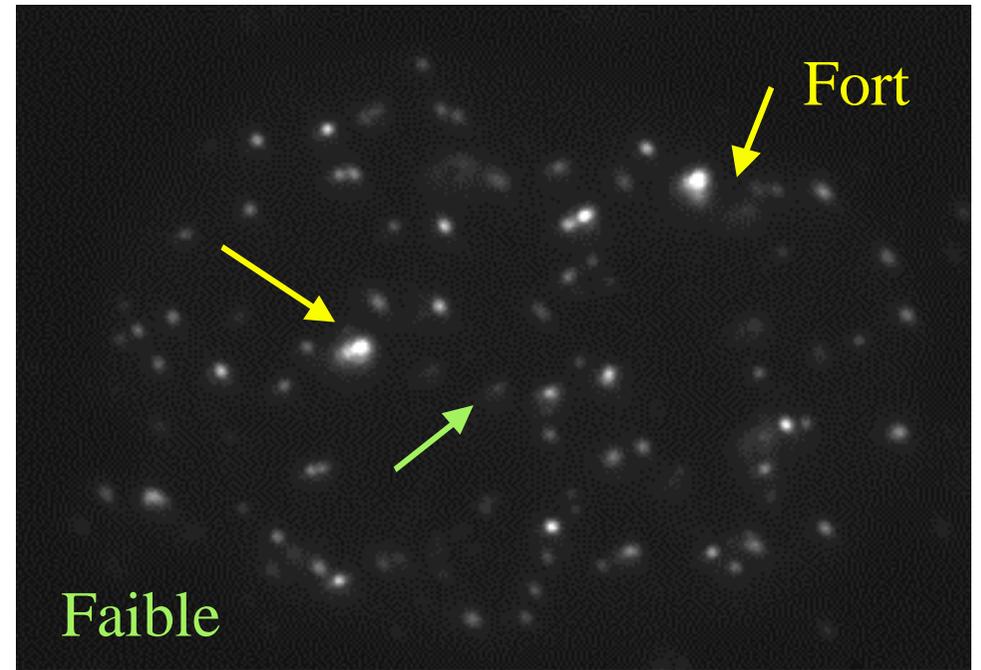
Méthodes d'estimation de la longueur des télomères par *FISH*

- Sur noyaux : à un fort grossissement (100X)
 - Hétérogénéité intracellulaire
 - Hétérogénéité intercellulaire
- Sur noyaux : à un faible grossissement (20X)
 - Hétérogénéité intercellulaire

Fibroblastes primaires TP P14 (X100)

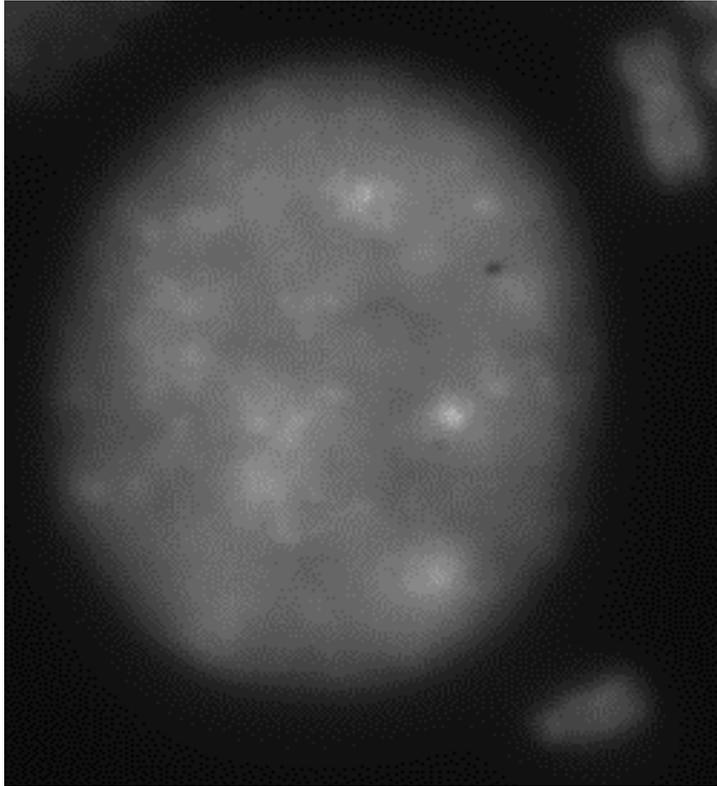


DAPI

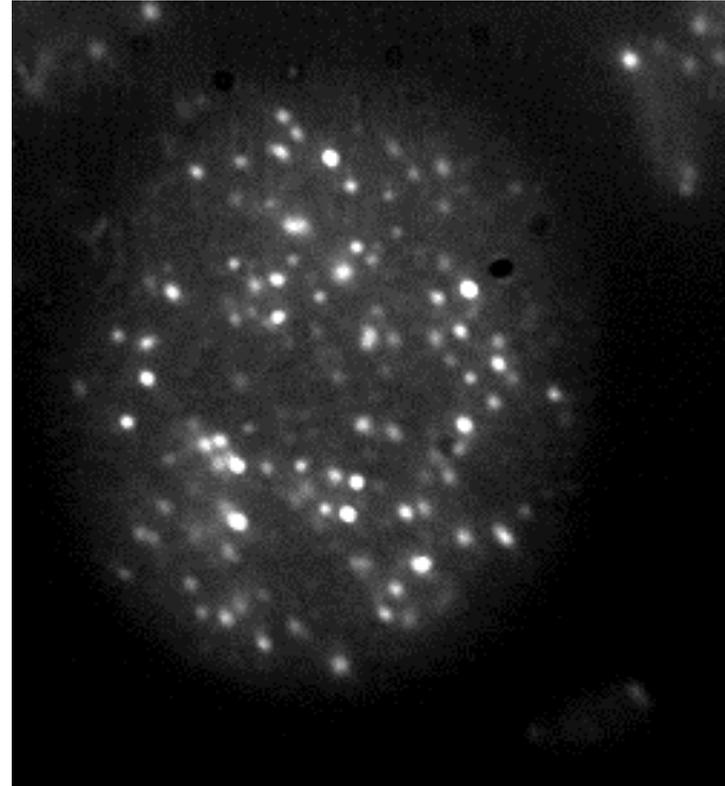


Sonde Cy3-(CCCTAA)₃

Fibroblastes Transformés par LTSV40
TP15.5 P9-avant crise (X100)

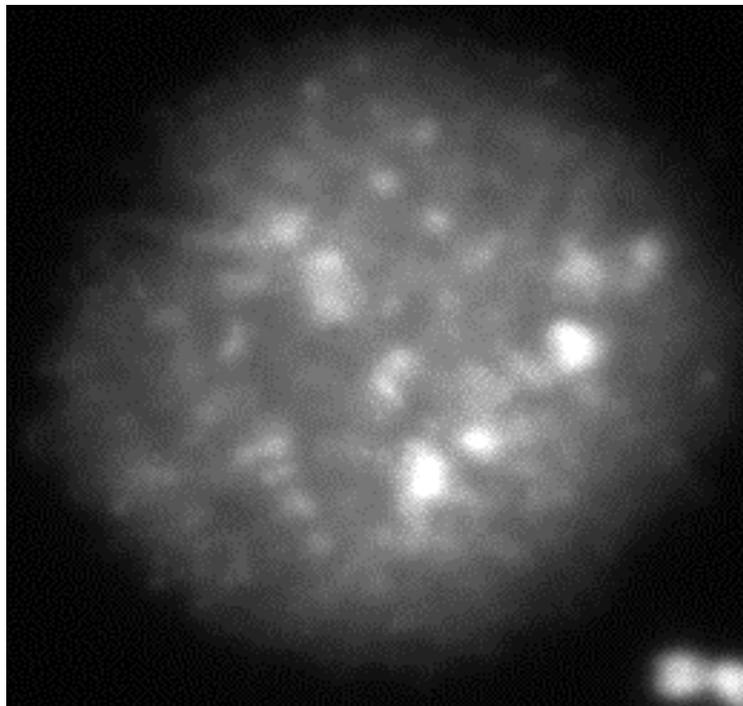


DAPI

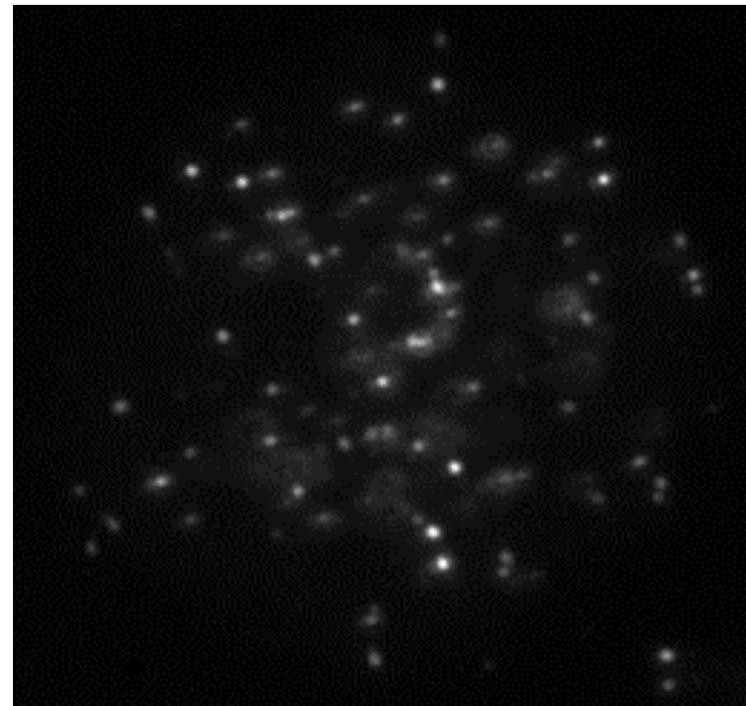


Sonde Cy3-(CCCTAA)₃

Fibroblastes Transformés par LTSV40
TP15.5 P55 P >> crise (X100)



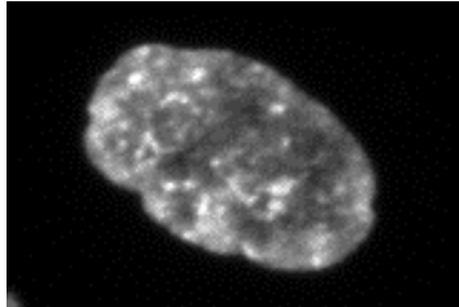
DAPI



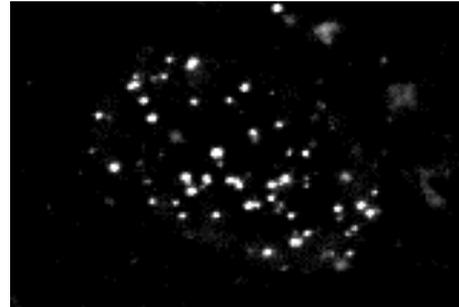
Sonde Cy3-(CCCTAA)3

Noyaux de fibroblastes à un faible grossissement (20X)

TP P14

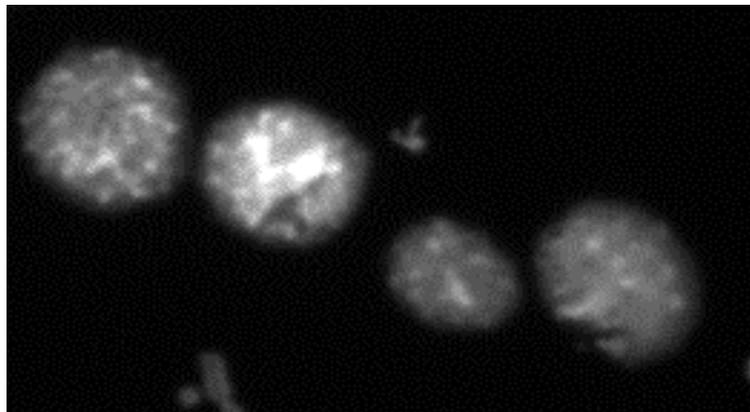


DAPI

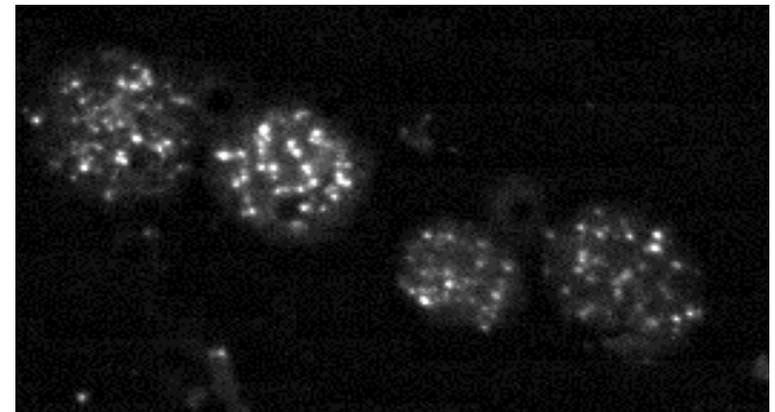


Sonde Cy3-(CCCTAA)3

TP15.5 P11



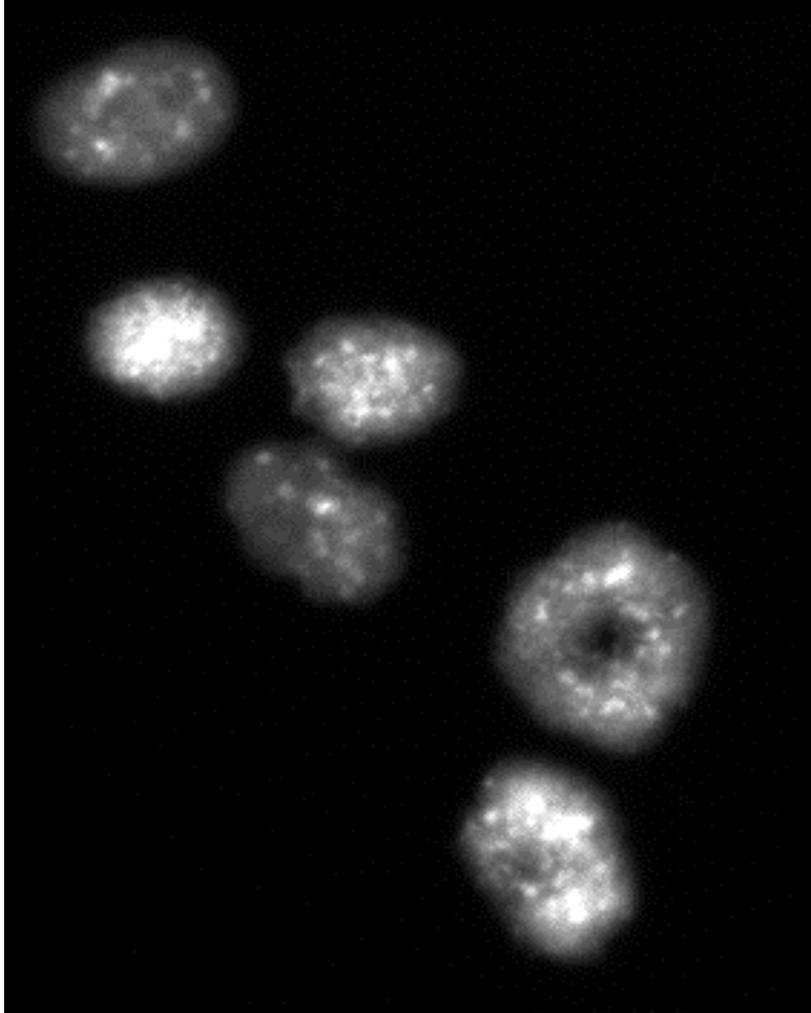
DAPI



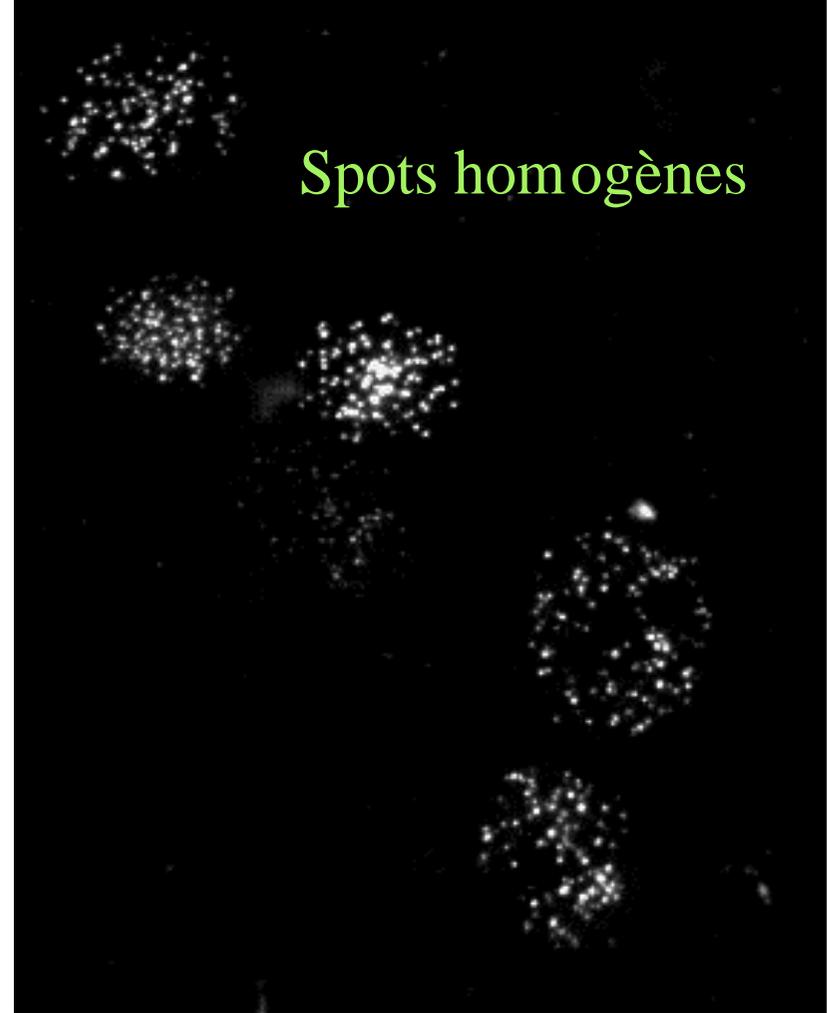
Sonde Cy3-(CCCTAA)3

Noyaux de fibroblastes à un faible grossissement (20X)

TP15.5 P55



DAPI



Sonde Cy3-(CCCTAA)₃

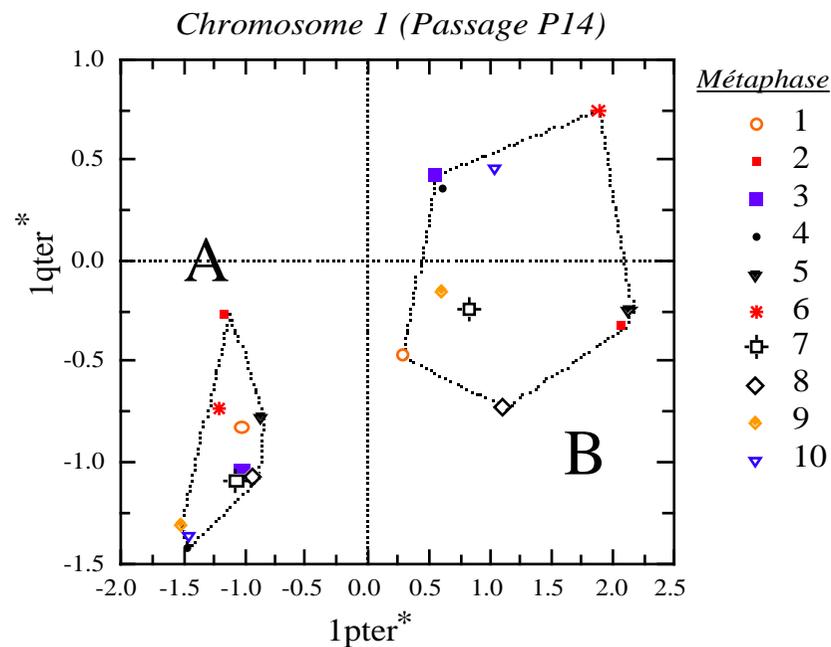
Le FISH sur noyaux permet de quantifier les spots télomériques

- comparaison des télomères de cellules
 - d'un même donneur
 - de donneurs différents
- centaines de noyaux suffisants
 - minicultures cellulaires directement sur une lame de microscope.
 - étalonnage avec des cellules de FRT moyen connu.

Diagramme *pter-qter*

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

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



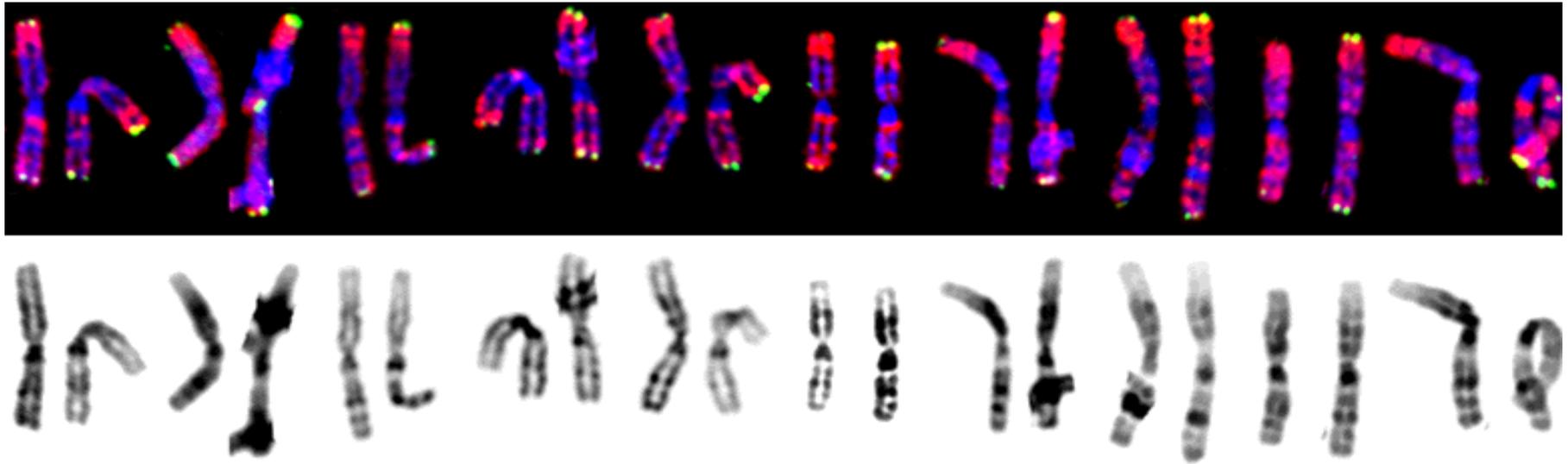
Construction d'un tableau métaphase-ligne :

Tri des télomères des groupes A et B

2 groupes : -> distribution aléatoire?

-> paternel / maternel

Distinction des chromosomes 1 homologues



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

Recherche d'hétéromorphismes télomériques

