

DYNAMIQUE DE LA LONGUEUR DES
TELOMERES AU COURS DE LA SENESCENCE ET
DE L'IMMORTALISATION DE CELLULES
HUMAINES

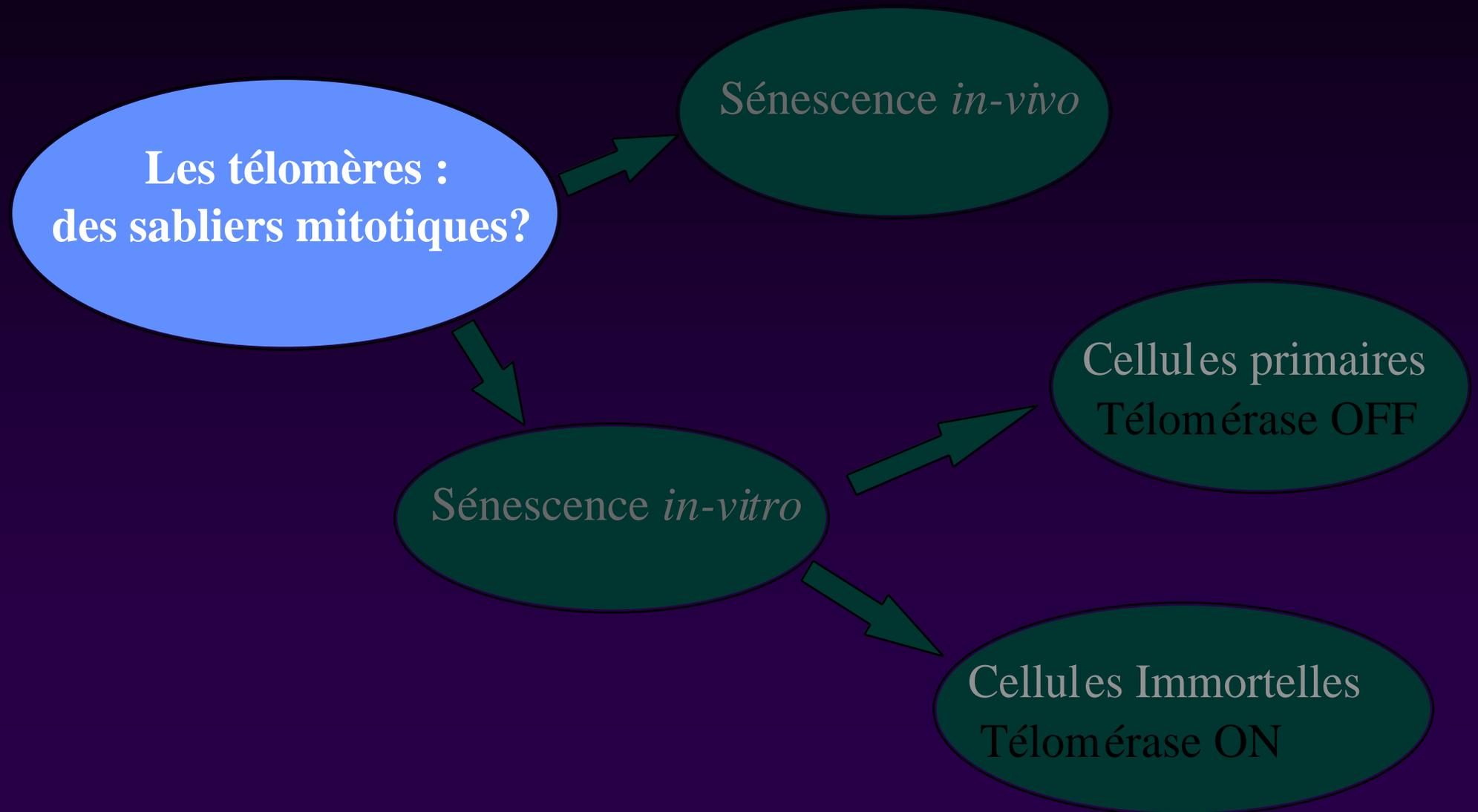
Jean-Patrick Pommier

CEA / DSV / DRR

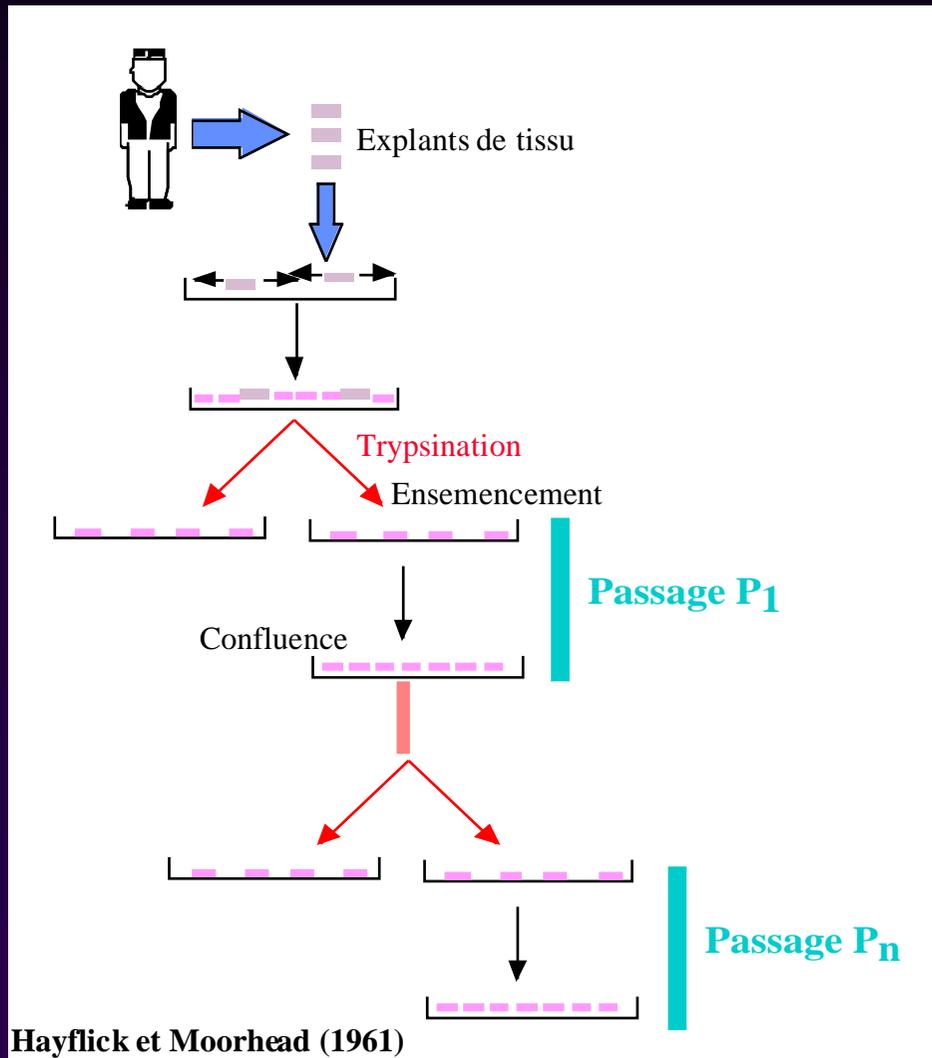
LABORATOIRE DE RADIOBIOLOGIE ET ONCOLOGIE

13 décembre 1999

Dynamique de la longueur des télomères et instabilité chromosomique spécifique



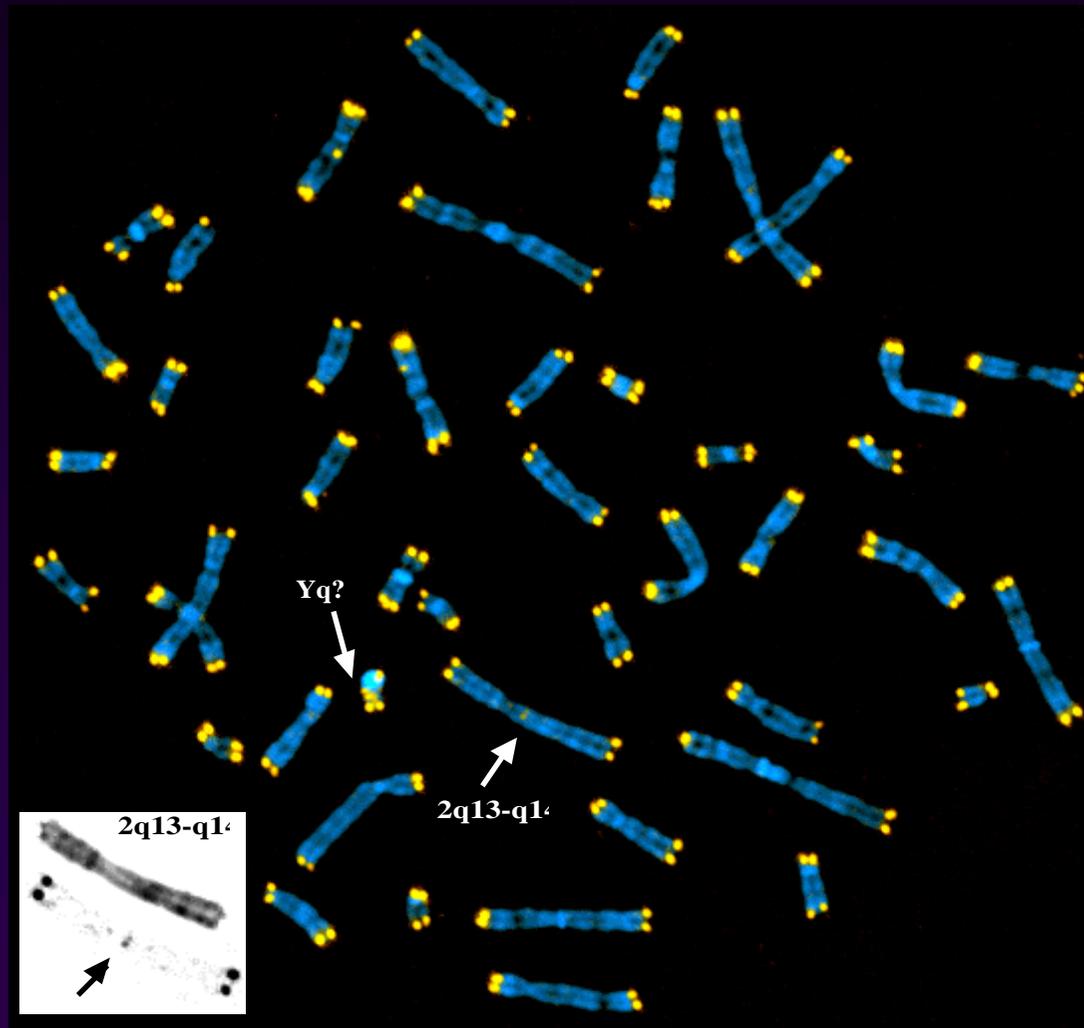
La sénescence répllicative des fibroblastes humains *in-vitro*



- Nombre de passages :**
- Fini : 40 à 60 DPMs
 - Variabilité interindividuelle

Localisation des signaux télomériques

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

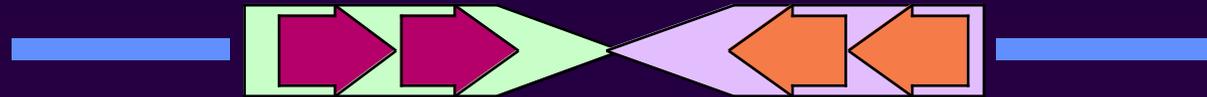


Organisation génomique des télomères

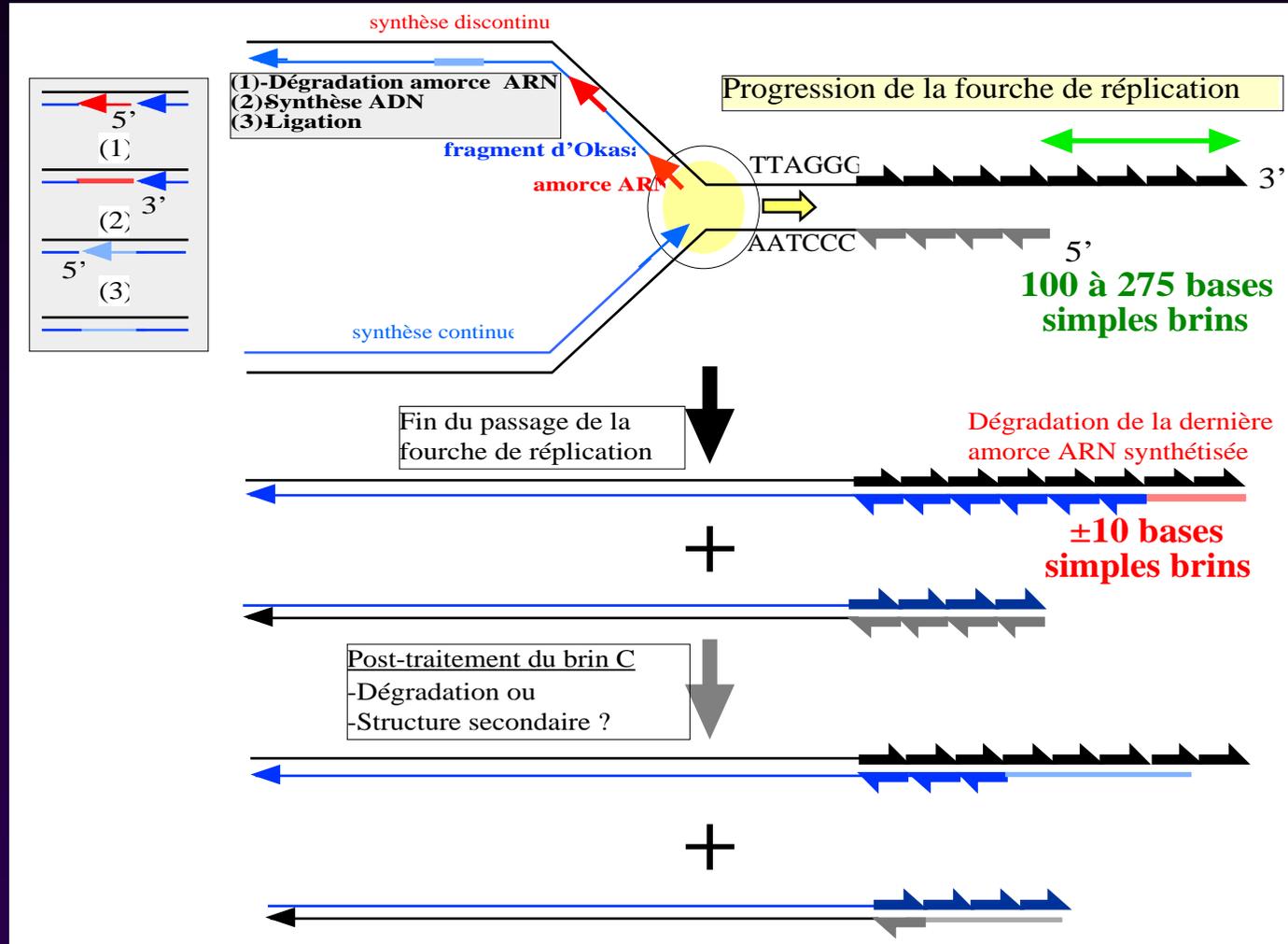
- Séquences répétées en tandems directs jointifs.
- Localisation terminale, brin G orienté en 3'



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



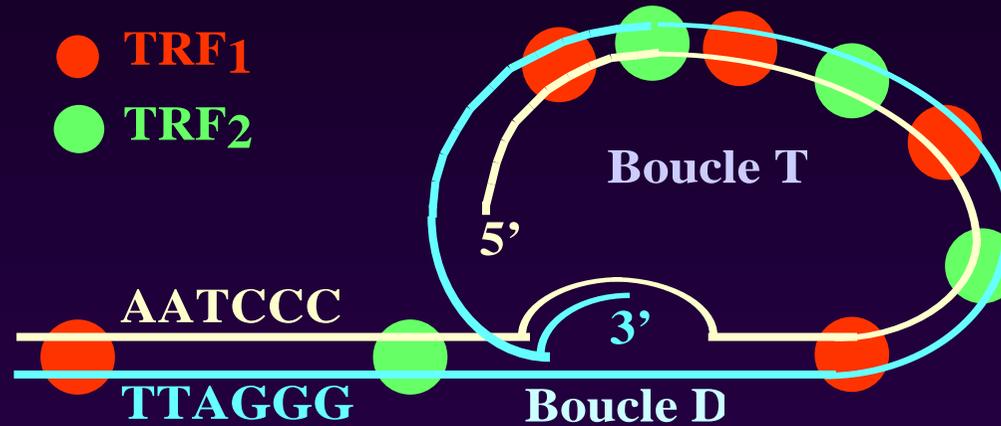
Réplication incomplète des télomères



Fonctions des télomères

- **Stabilisation du génome**
 - Supportent la réplication incomplète de l'ADN.
 - Blocage des fusions chromosomiques dans les cellules mitotiques.
- **Absence de motifs TTAGGG**
 - Blocage irréversible en G1/S (sénescence)
 - Signal apoptotique
- **Topographie des chromosomes interphasiques**
 - Appariement des homologues dans la méiose

Chromatine télomérique des vertébrés



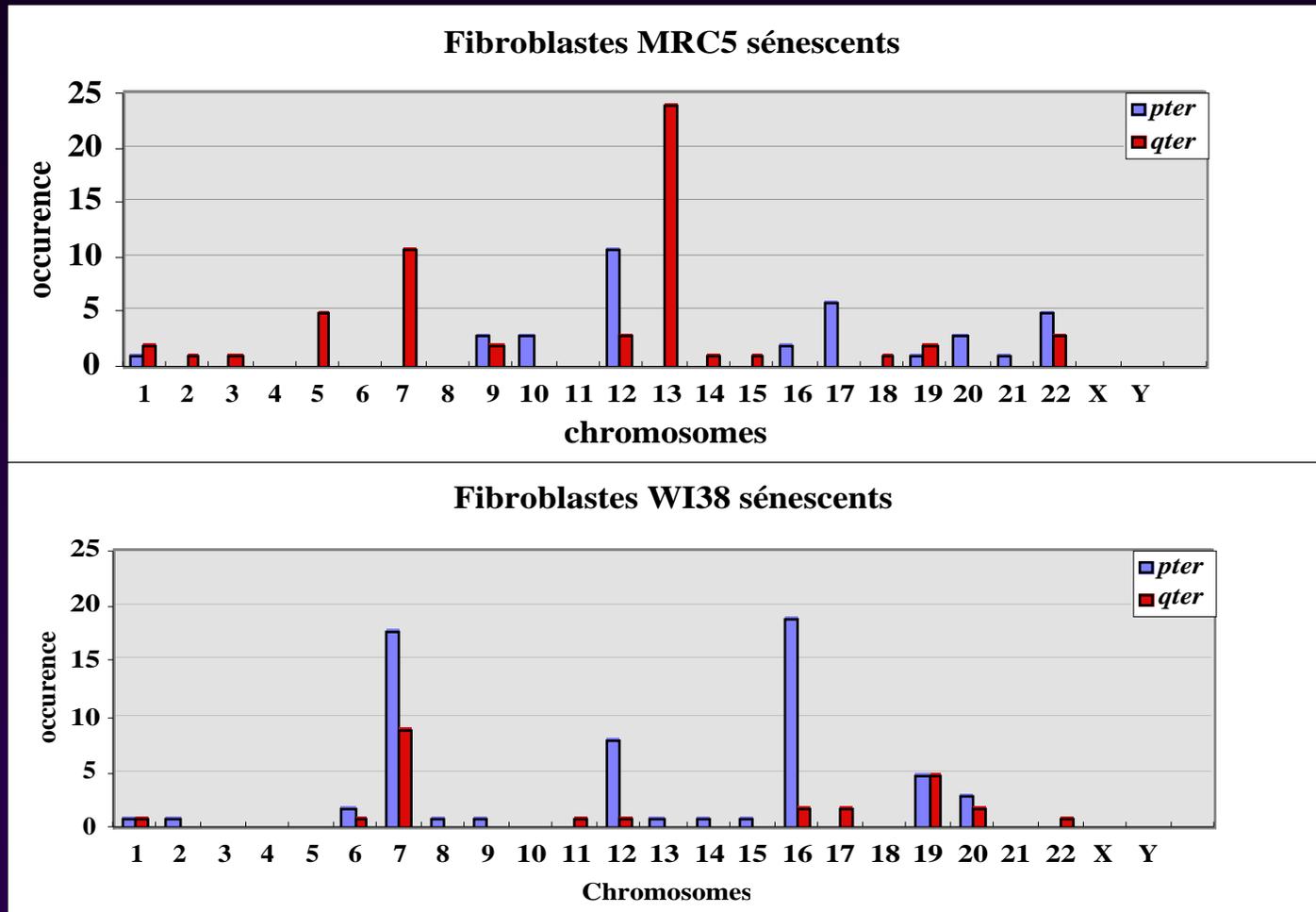
de Lange *et al.* (1999)

Limitation de la prolifération des fibroblastes par la quantité de motifs TTAGGG présente à chaque télomère ?

- **Les fibroblastes primaires n'expriment pas la télomérase.**
- **Les divisions cellulaires génèrent des télomères avec peu ou pas de motifs TTAGGG (réplication incomplète, autre(s) mécanisme(s) ?).**
- **Les télomères privés de TTAGGG sont équivalents à des cassures d'ADN double brin:**
 - Blocage constitutif en G1
 - Réparation par *end-joining*: Dicotrique *ter-ter* (fréquence ?).
- **Expression ectopique de hTERT dans les fibroblastes :**
 - Immortelles
 - Normales : éternellement “jeunes” (Bodnar *et al.* 1998)

Fusions télomériques dans les fibroblastes sénescents

(Benn 1976)



Hypothèses

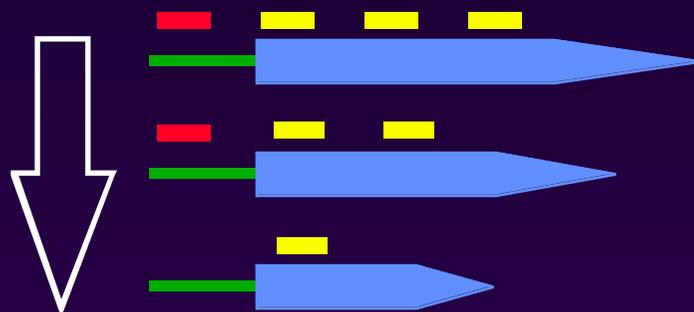
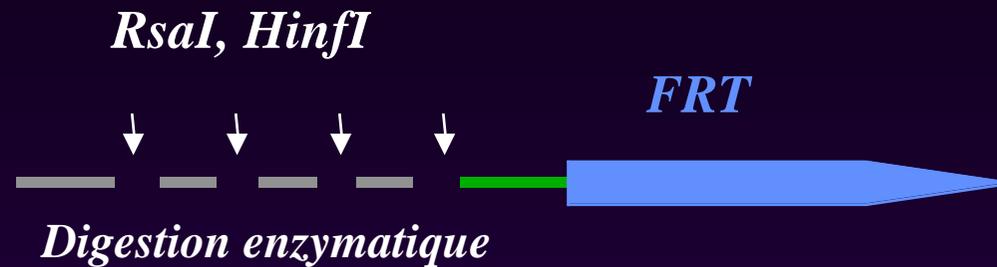
- Les dicentriques sont le produit d'une réparation inappropriée des télomères érodés.
- Etat des télomères érodés dans une cellule sénescence?
- Implications de chromosomes spécifiques
- Différence entre donneurs
- Rôle du polymorphisme de longueur des séquences télomériques?

QUANTIFICATION DES SEQUENCES TELOMERIQUES

Support	Méthode	Sonde	Marquage	+	-
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
Métaphase	FISH	Télomérique (+autres)	Froid	<ul style="list-style-type: none"> •Hybridation simultanée •Télomère spécifique •Homologue spécifique •Calibration interne. 	<ul style="list-style-type: none"> •Représentativité métaphases/noyaux (Culture cellulaire) •Traitement informatique lourd •Calibration externe pour la longueur ?
Noyaux	FISH	Télomérique (+autres)	Froid	<ul style="list-style-type: none"> •Hybridation simultanée •Quantité de cellules 	<ul style="list-style-type: none"> •Calibration externe 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

Analyse de la longueur des FRTs

Principes



*Migration électrophorétique
(échantillons + calibration)*

+

Autoradiographie

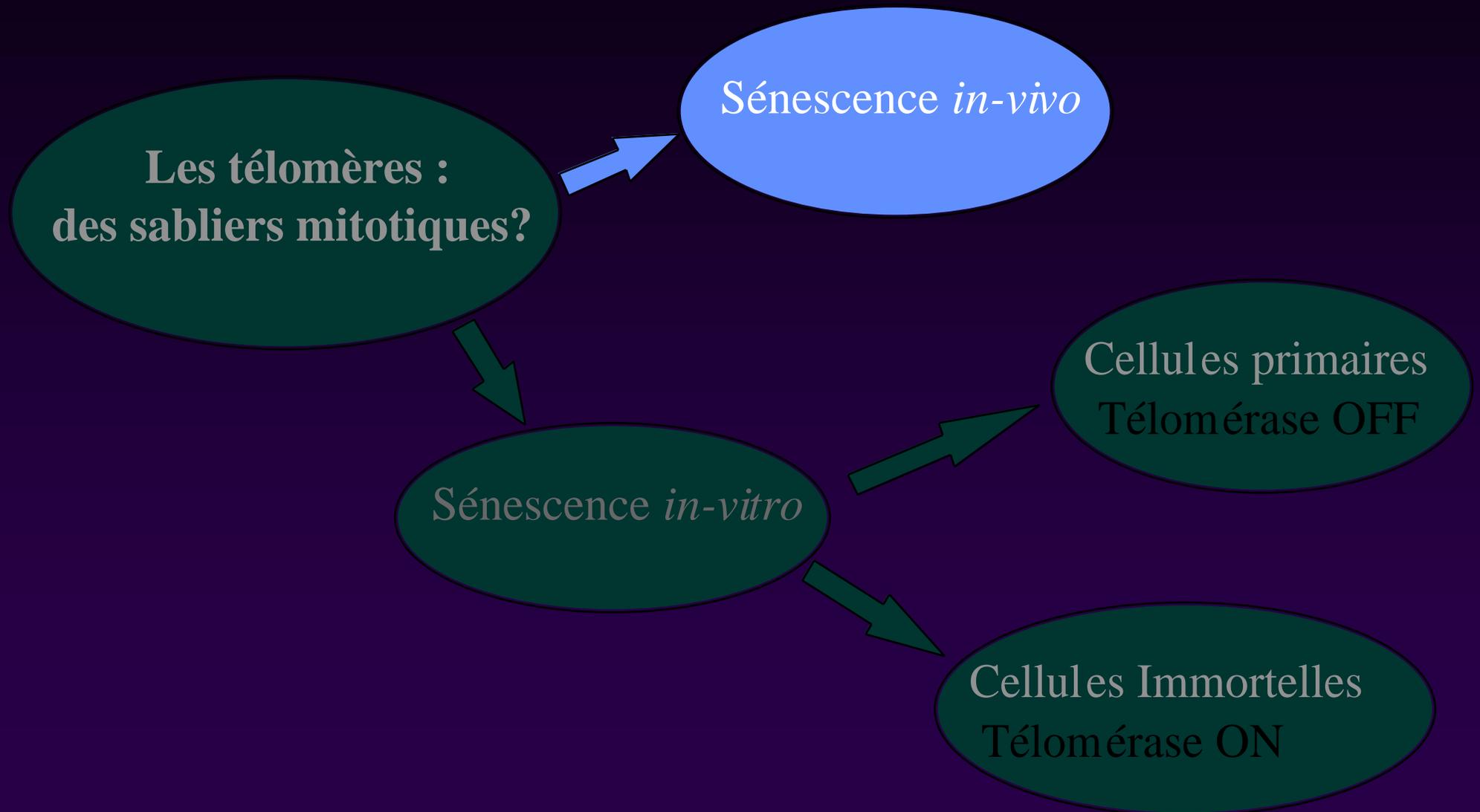
Sonde subtélomérique (minisatellite)

$$S(x) = k \cdot N(x)$$

Sonde pantélomérique (CCCTAA)_n

$$S(x) = k \cdot N(x) \cdot L(x)$$

Dynamique de la longueur des télomères et instabilité chromosomique spécifique

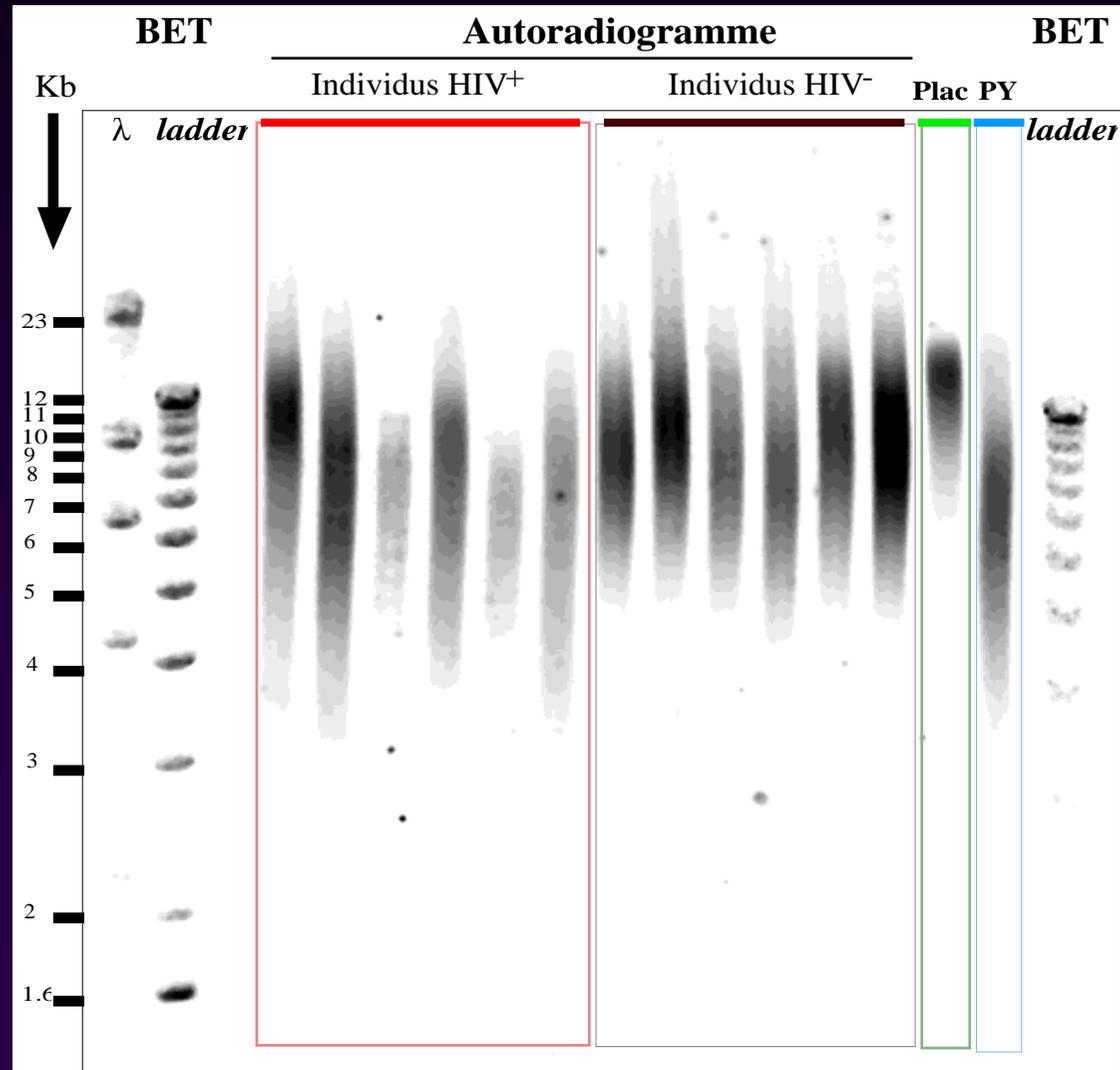


Evolution de la longueur des télomères / immunosénescence

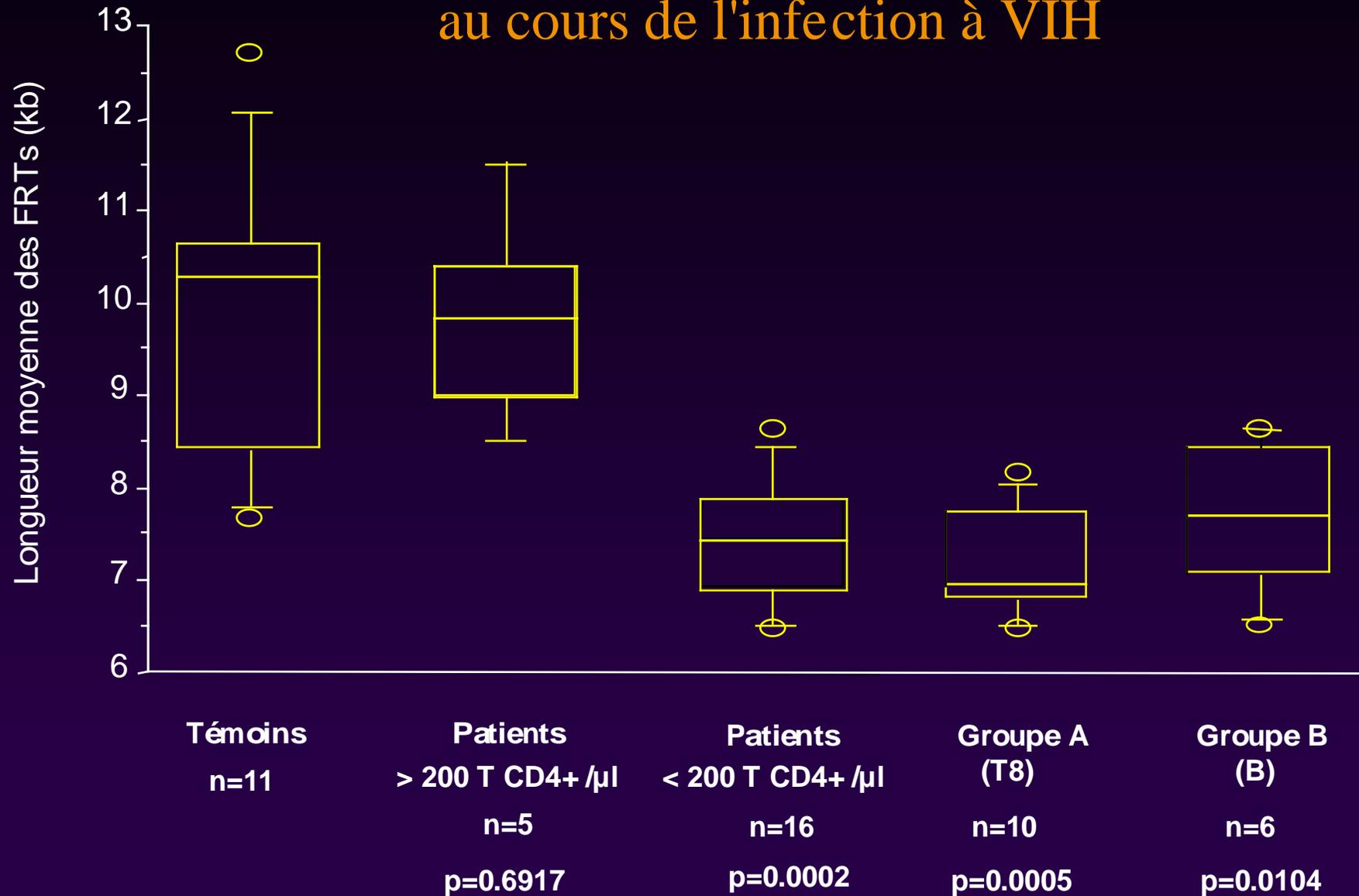
- **Modèle in-vivo**
 - Patients HIV⁺ vs HIV⁻
- **Hypothèse**
 - Augmentation du renouvellement cellulaire
 - =>Erosion des télomères dans les lymphocytes?

Southern-Blot Patients VIH⁺ vs VIH⁻

Calcul de la longueur moyenne des FRTs



Comparaison de la taille des télomères des CMSP au cours de l'infection à VIH

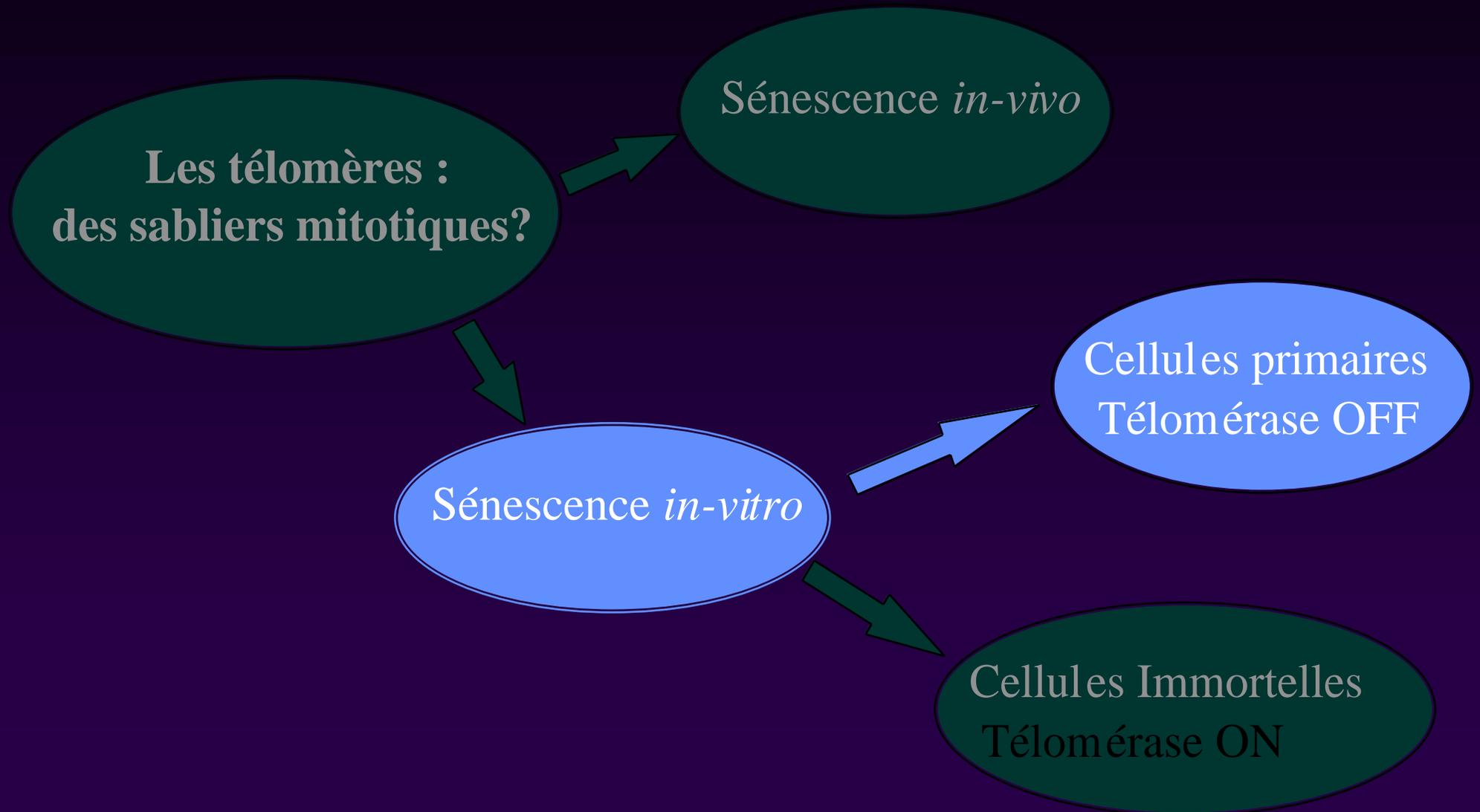


(Pommier JP ,Gauthier L *et al.*, Virology, 1997)

Immunosénescence *in-vivo*

- **-40 bp/an dans les CMSP (Vaziri et al. 1993)**
- **Patients avec moins de 200 T4/mm³ :**
 - $\Delta\text{FRT} = -2,78 \text{ Kb}$: vieillissement de 70 ans des CSMP.
 - Réduction de la longueur des télomères dans les:
 - Lymphocytes T8
 - Lymphocytes B
 - 2 patients avec réduction dans les lymphocytes T4
- **Immunosénescence des progéniteurs hématopoétiques par sénescence répllicative ?**
- **La télomérase est incapable de maintenir la longueur des télomères.**

Dynamique de la longueur des télomères et instabilité chromosomique spécifique

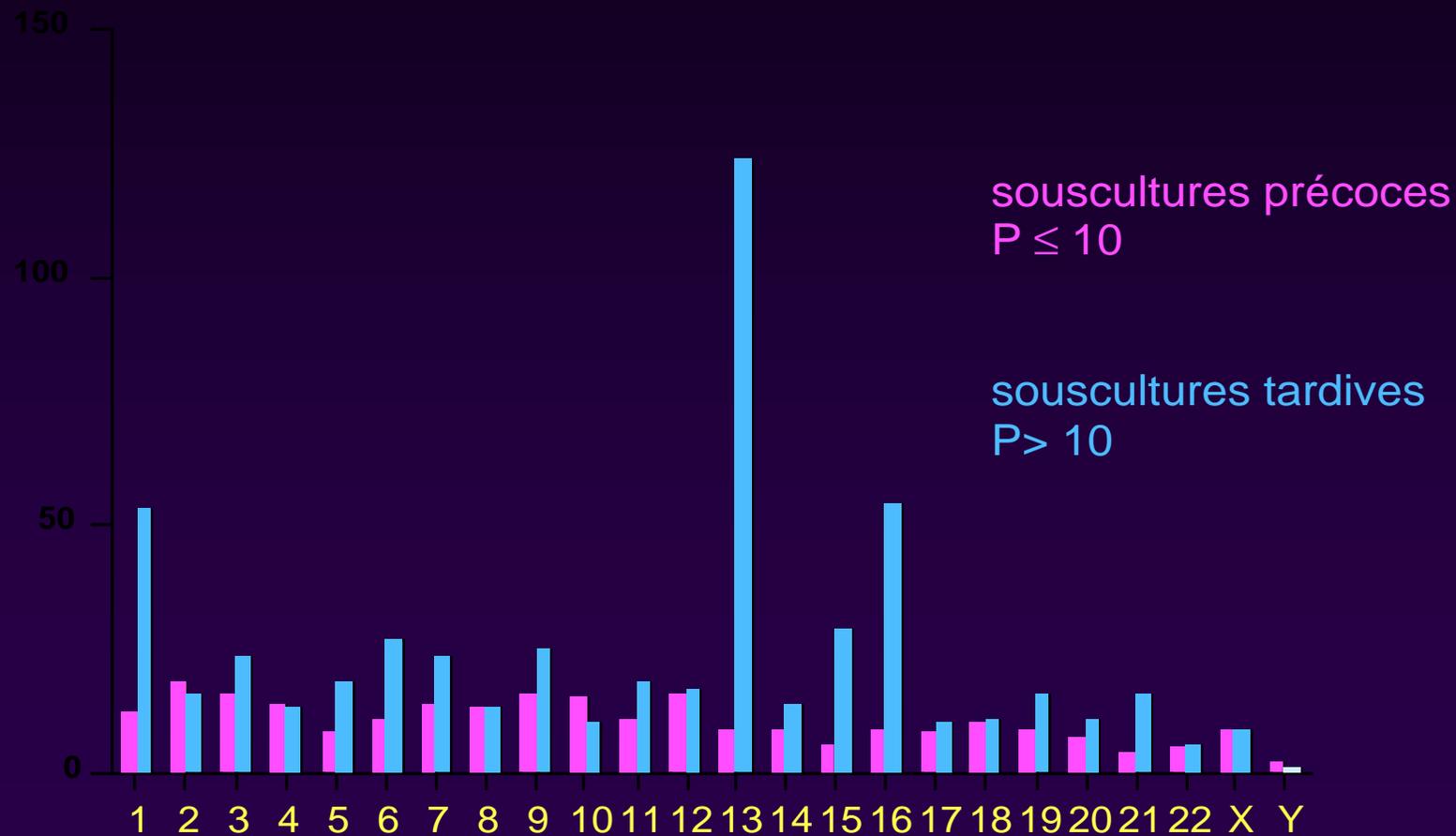


SENESCENCE - CELLULES TP

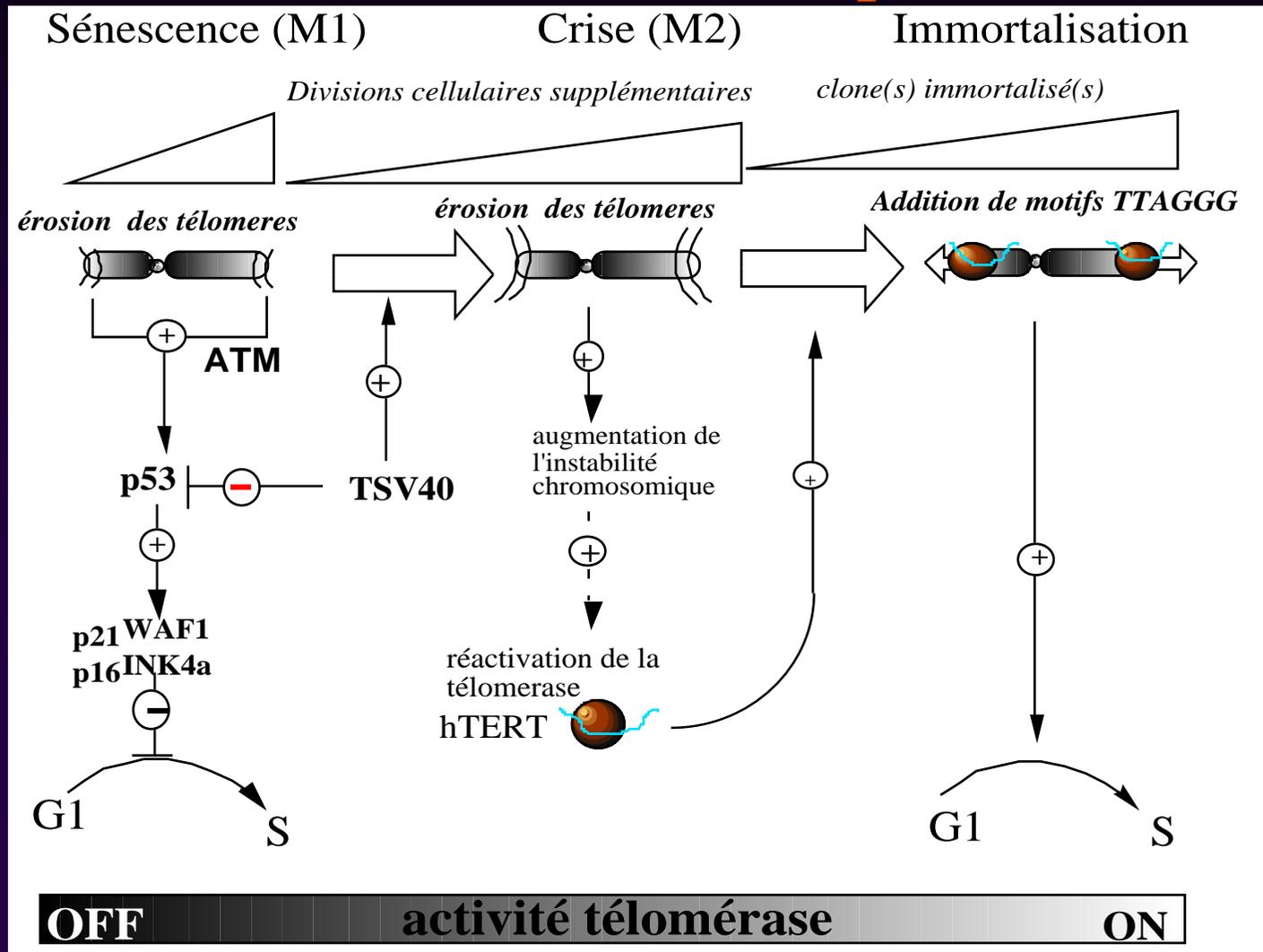
	Passage P20	P35	P44 (senescence)
Analysed mitosis	50	50	20
Abnormal mitosis	0	15	19
Dicentrics+rings	0	14	21
Rea Chr 13	0	13	15

Chromosomes dicentriques dans les fibroblastes TP

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

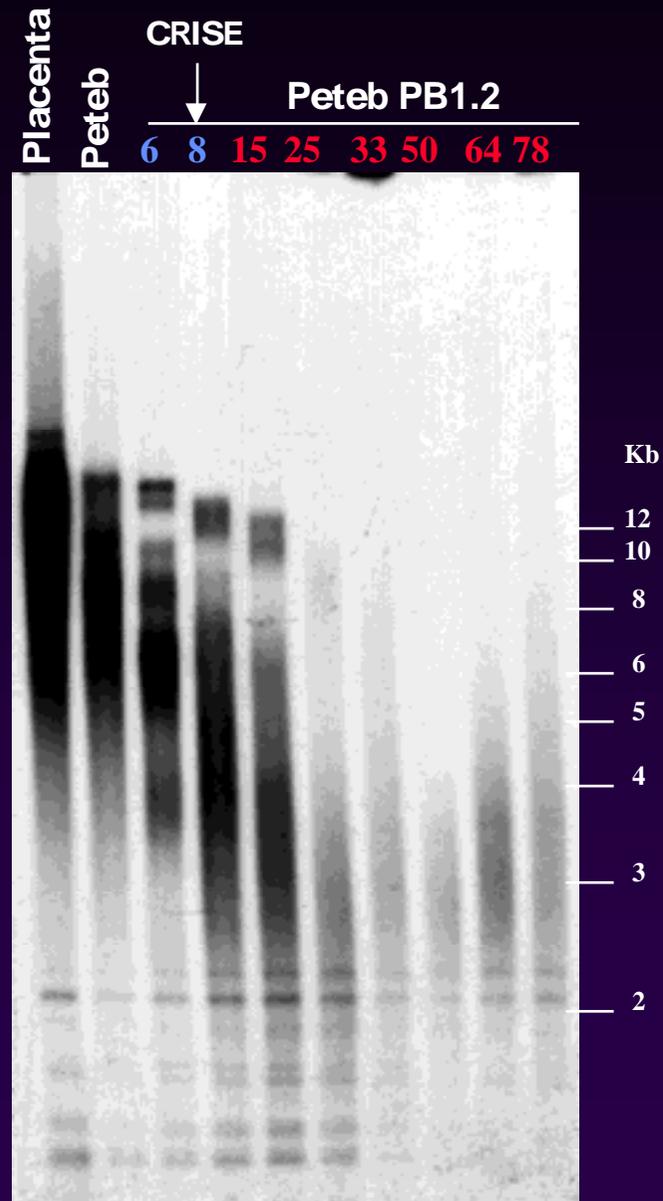
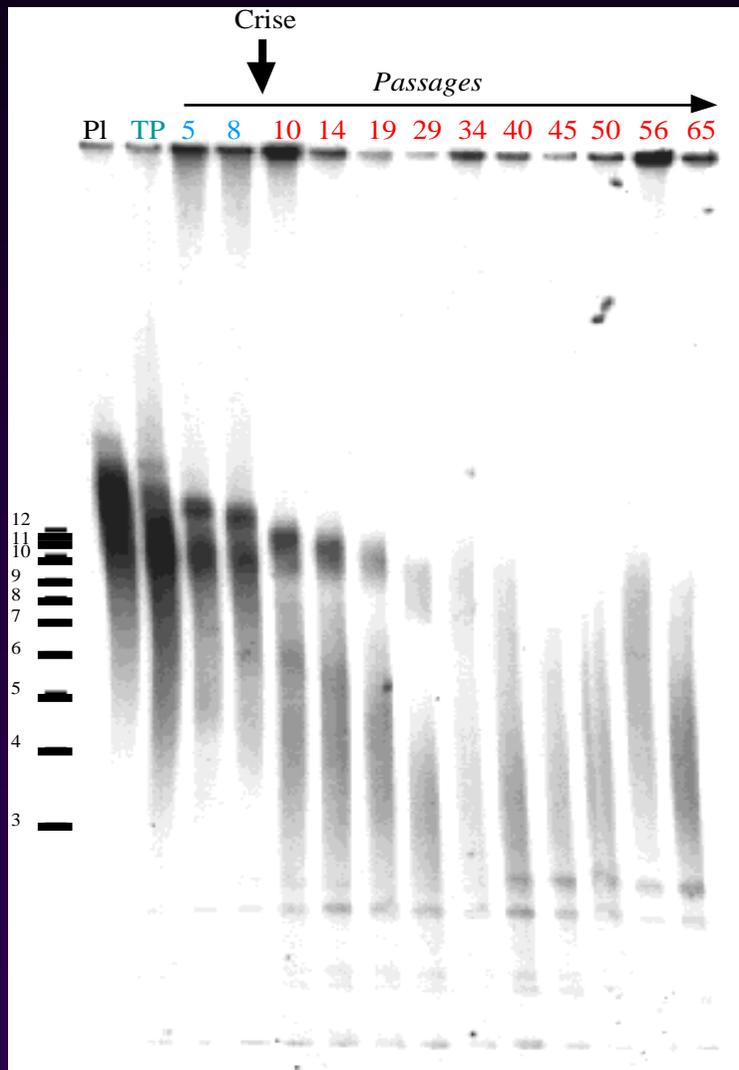


Réactivation de l'activité télomérase dans les fibroblastes transformés par SV40.

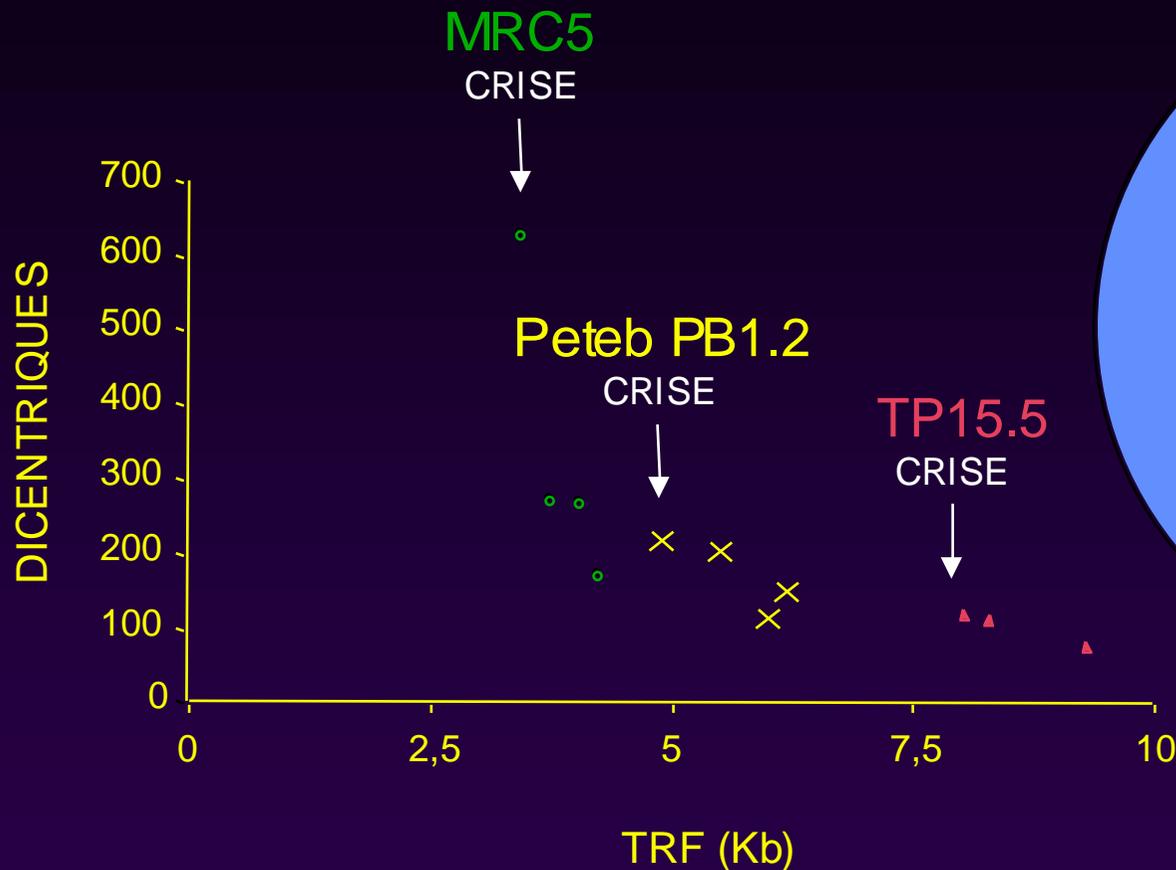


Hétérogénéité de la taille des télomères

TP15.5



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



HYPOTHESE :

Les télomères courts sont instables

TP15.5, Peteb

-> hétérogènes

MRC5

-> homogènes

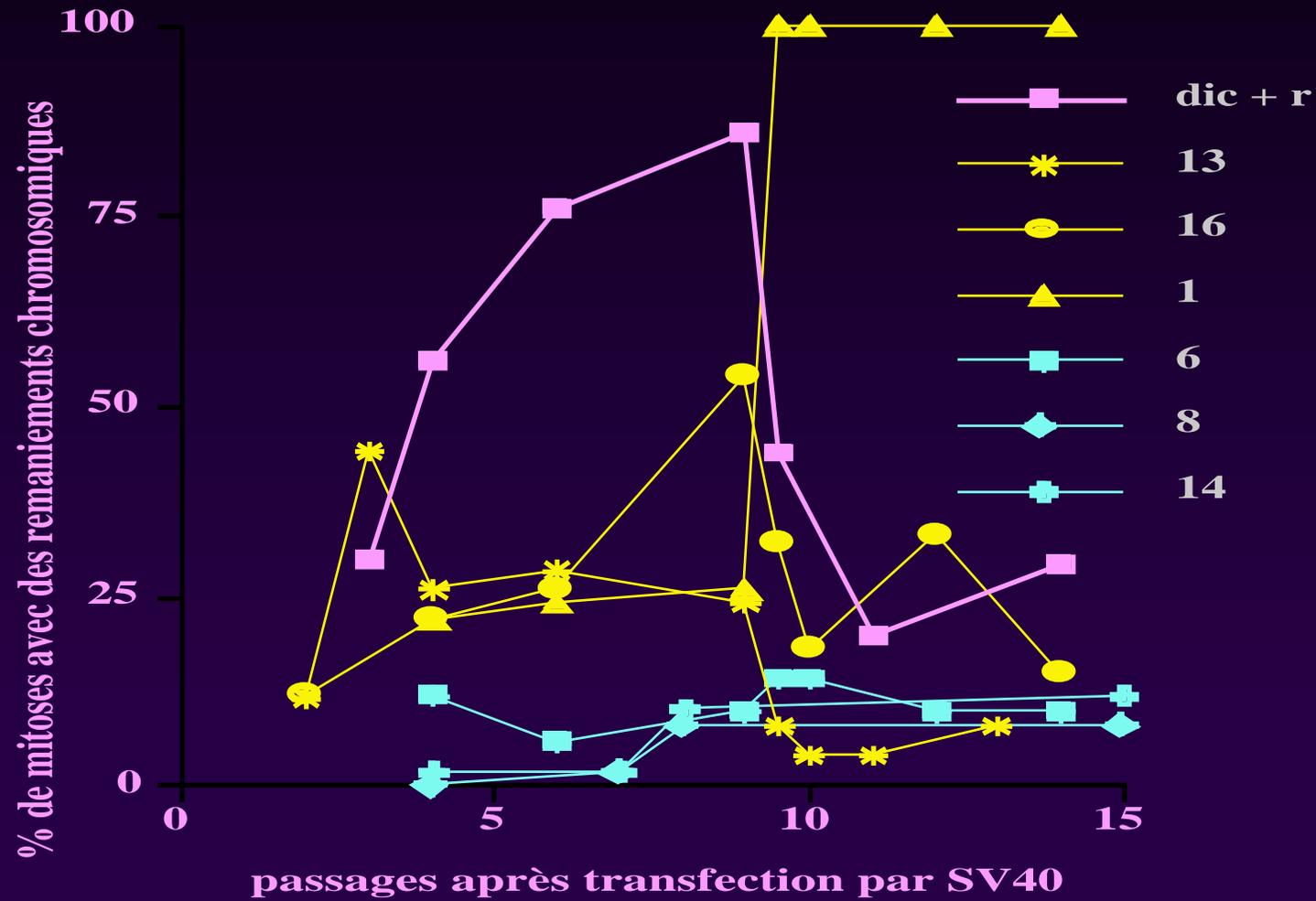
La longueur télomérique critique est-elle identique pour toutes les lignées ?

Localisation des points de cassure dans les dicentriques



- télomère-télomère
- centromère-centromère
- télomère-centromère
- télomère-euchromatine

INSTABILITE CHROMOSOMIQUE



*L'INSTABILITÉ CHROMOSOMIQUE EST SPÉCIFIQUE
QUEL QUE 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.

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

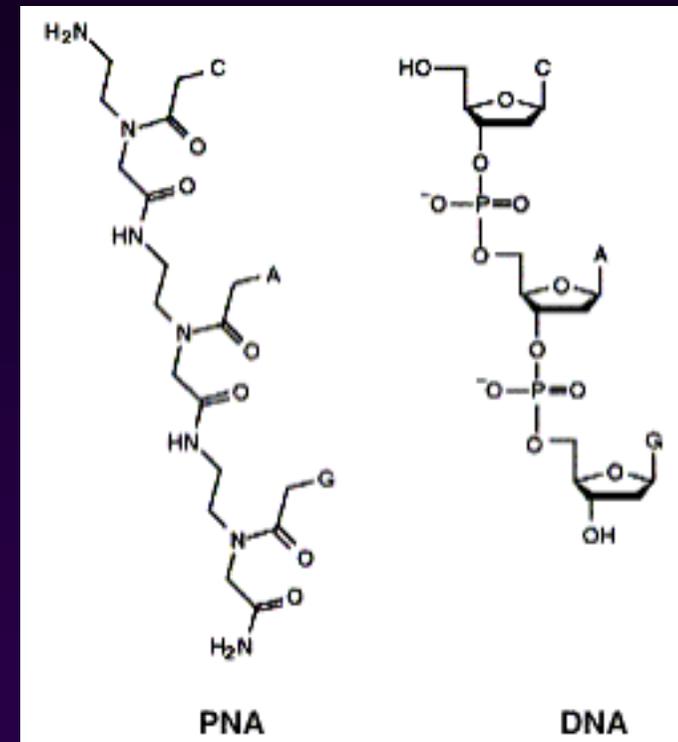
DAPI (Bandes Q)

Acquisition des images

CCD monochromes

caméra 8bits (256 niveaux de gris)

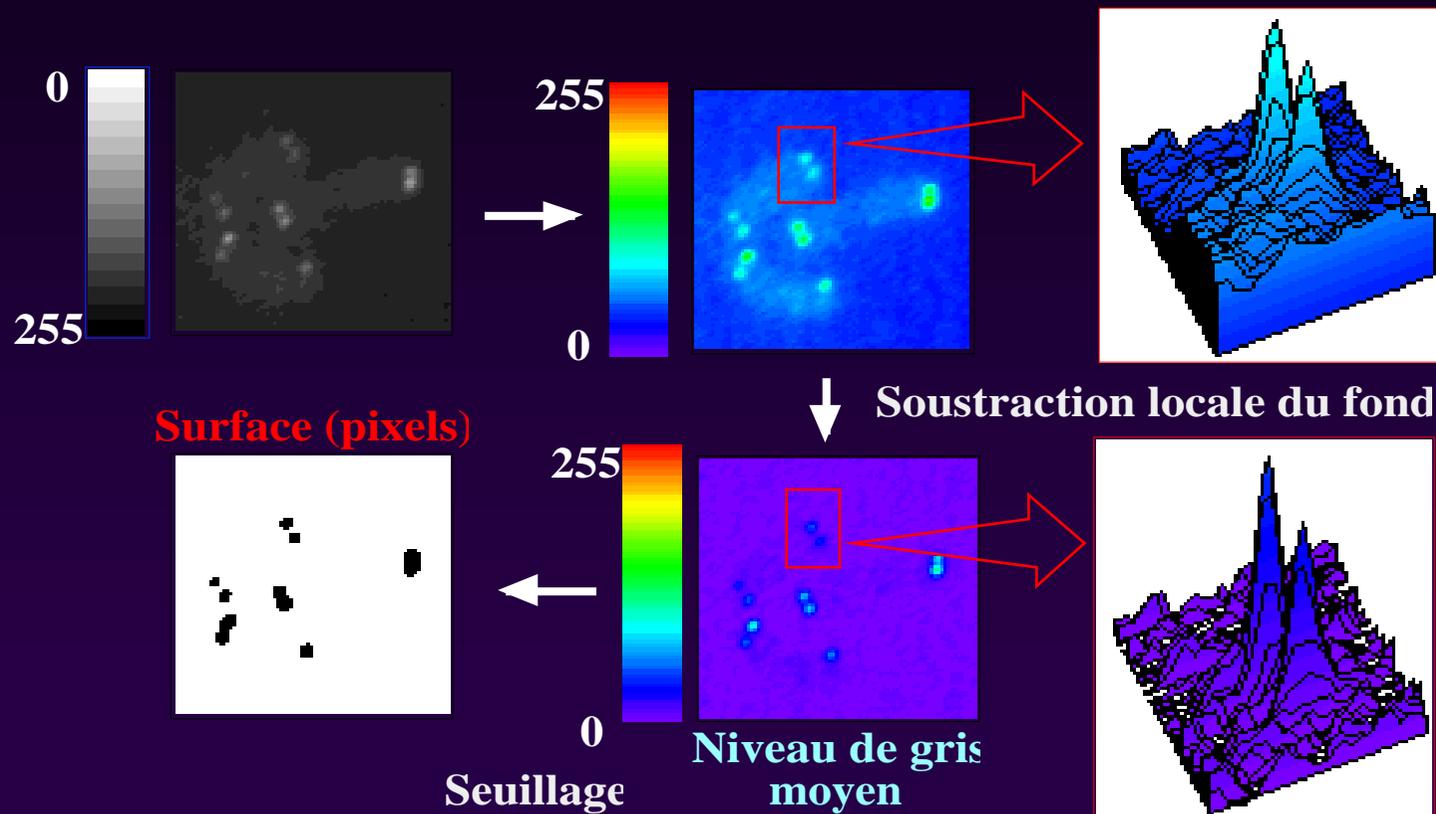
caméra 12bits (4096 niveaux de gris)



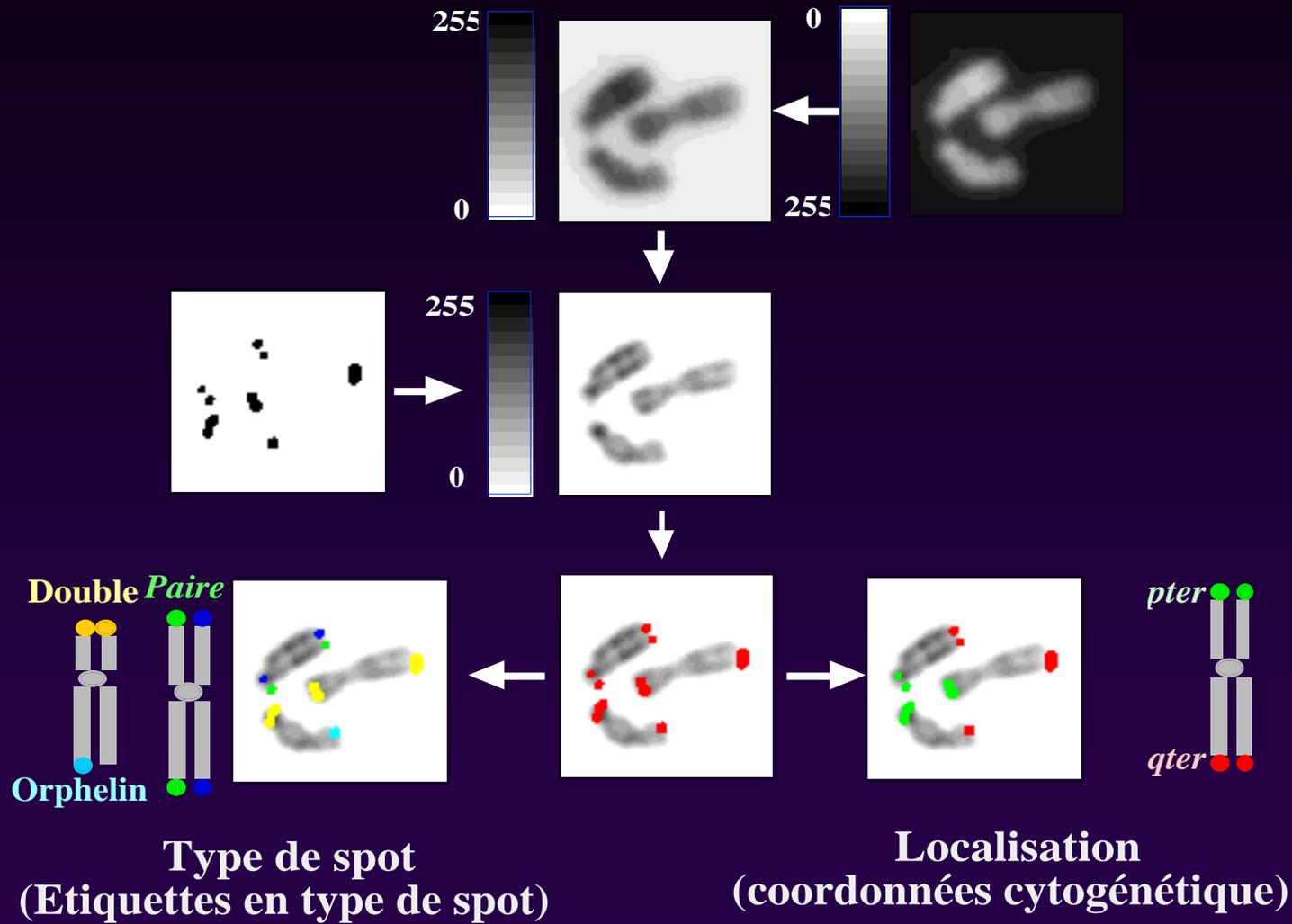
Codage des mesures

- **Association à chaque mesure d'un code numérique arbitraire précisant:**
 - Le type du signal (paire, non résolu, “orphelin”)
 - La localisation (télomère *pter* ou *qter*).
 - Le chromosome auquel elle appartient :
 - “objet chromosome” (1-46)
 - caryotype (1-24 avec X=23 et Y=24)
- **Etiquetage des particules binaires**
 - spots
 - Chromosomes

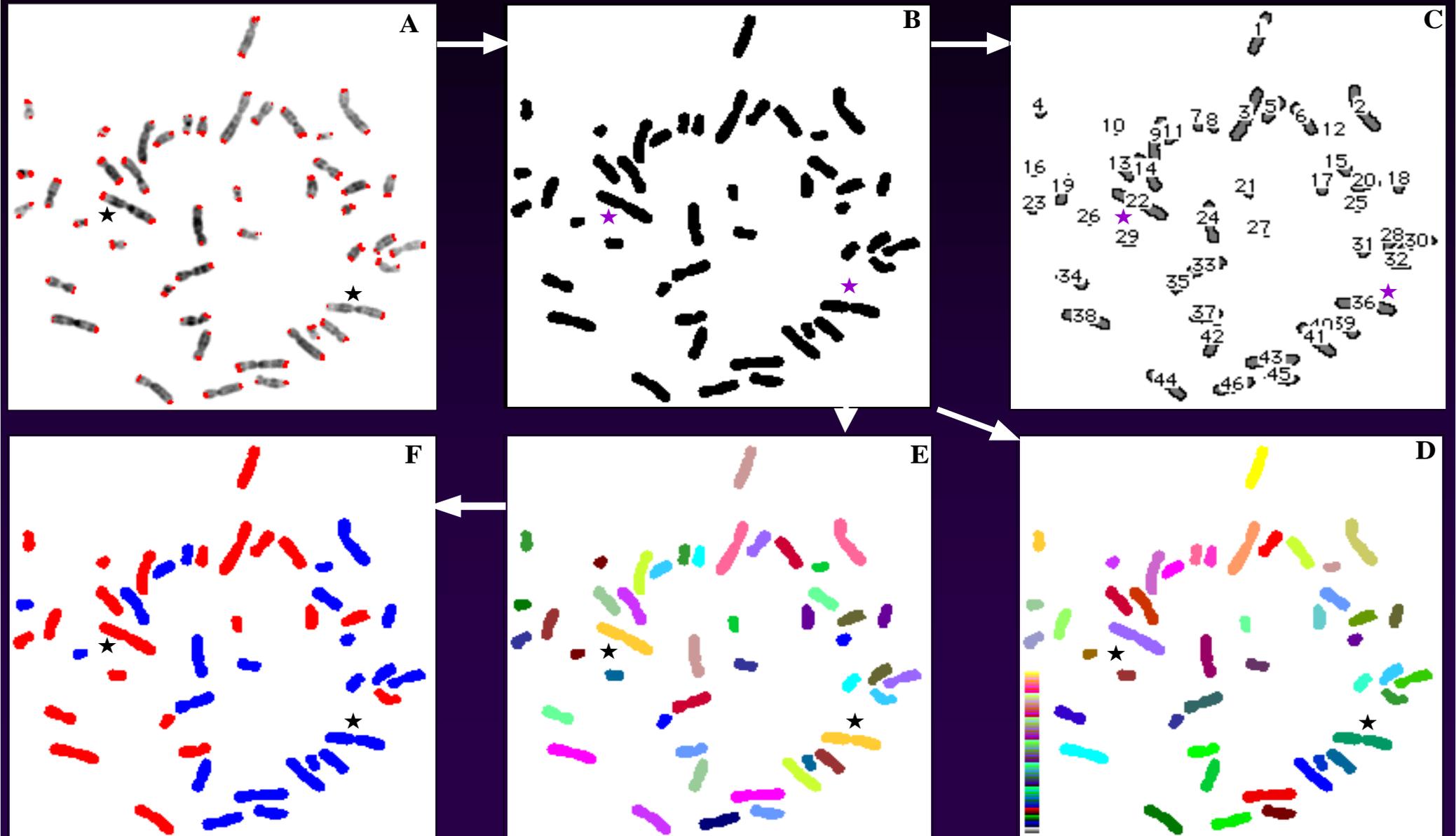
Mesure des signaux télomériques par segmentation binaire



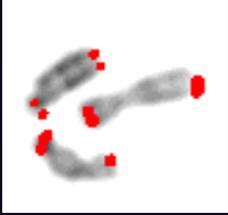
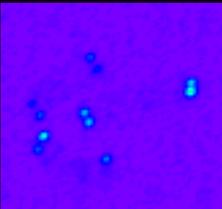
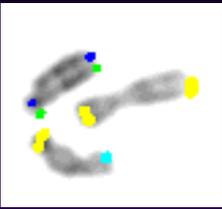
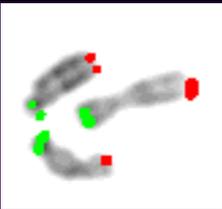
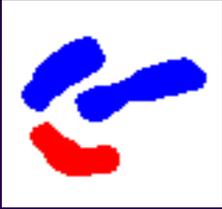
Etiquetage des spots binaires



Etiquetage des chromosomes



Construction du tableau Ligne-particule

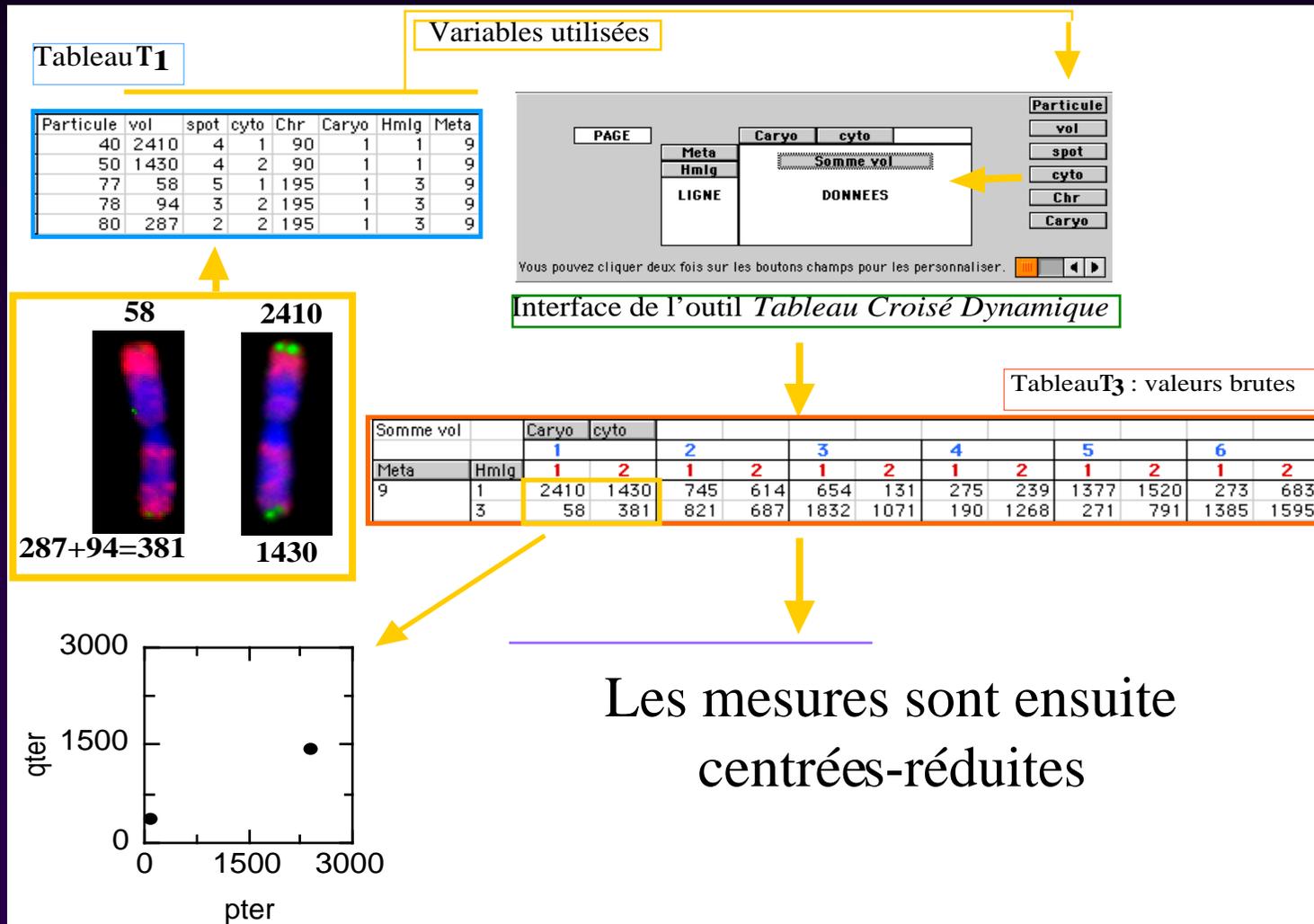
	
	
	
	
<p>Volume des spots</p>	<p>Objet 46 couleurs</p>
<p>Type 4 couleurs</p>	<p>Caryotype 24 couleurs</p>
<p>Localisation 2 couleurs</p>	<p>Homologue 2 couleurs</p>

Standardisation des mesures

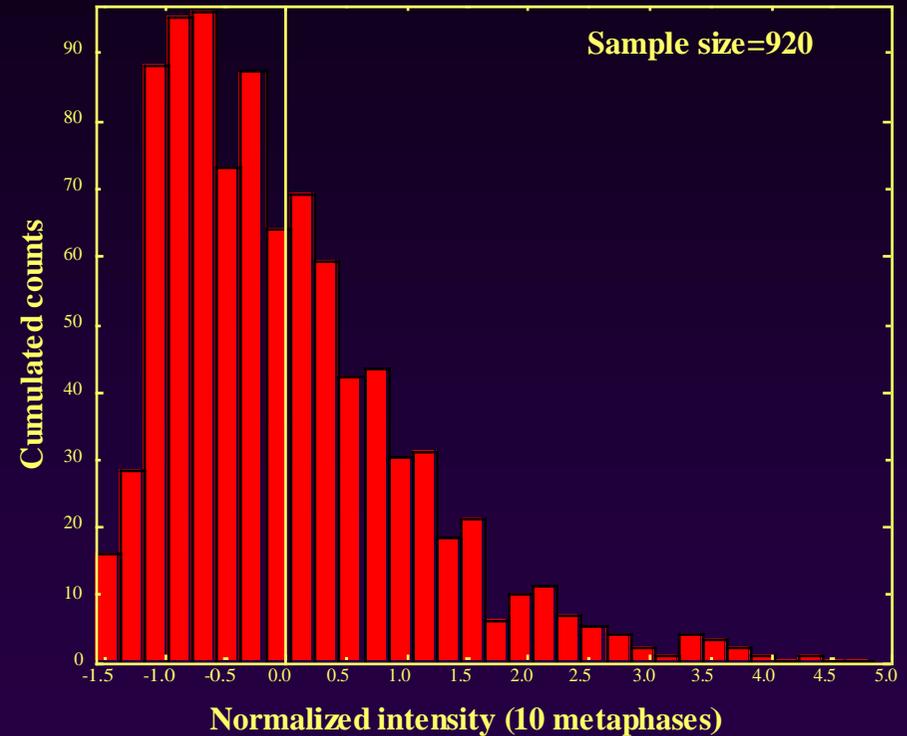
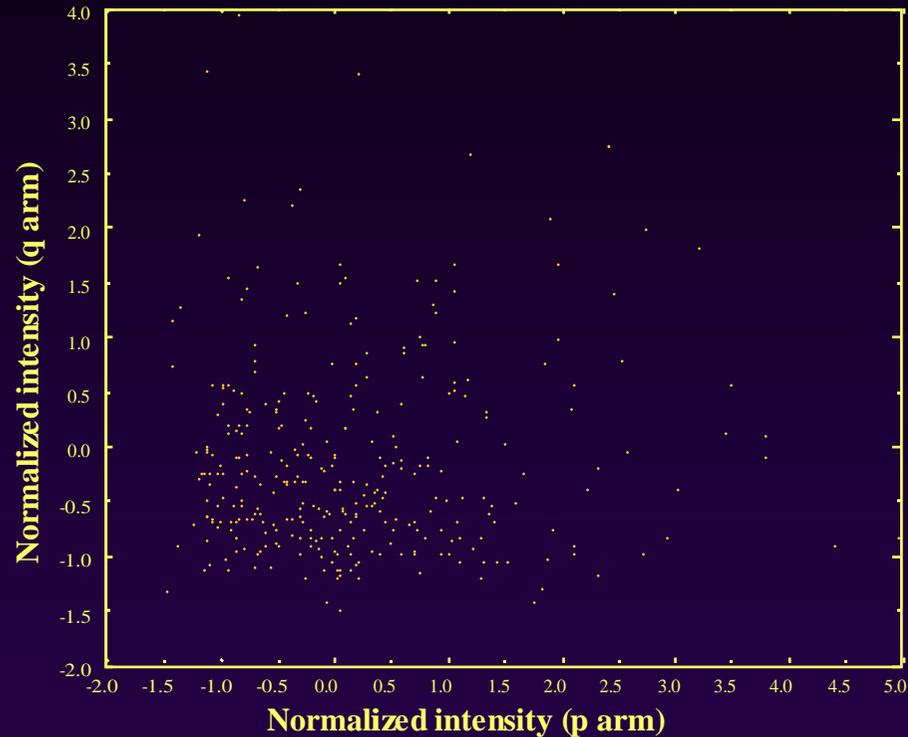
- Variabilité des mesures d'intensité des signaux
 - D'un champ à l'autre.
 - D'une lame à l'autre.
 - Selon les expériences
 - Biais dans l'analyse des mesures absolues
 - Calibration externe, mesures en Kb (Lansdorp)
- Nécessité d'une indépendance des mesures / conditions
 - Calibration interne
 -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

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

Construction d'un tableau métaphase-ligne



HETEROGENEITE DES INTENSITES STANDARDISEES DE 10 MÉTAPHASES

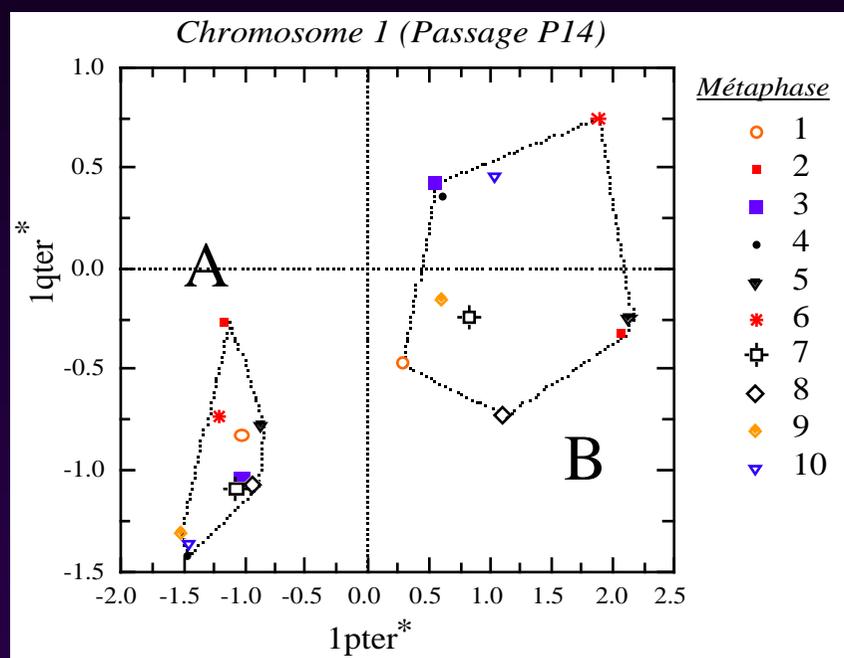


? LES TÉLOMÈRES LES PLUS COURTS SONT-ILS IDENTIQUES
POUR CHAQUE MÉTAPHASE?

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

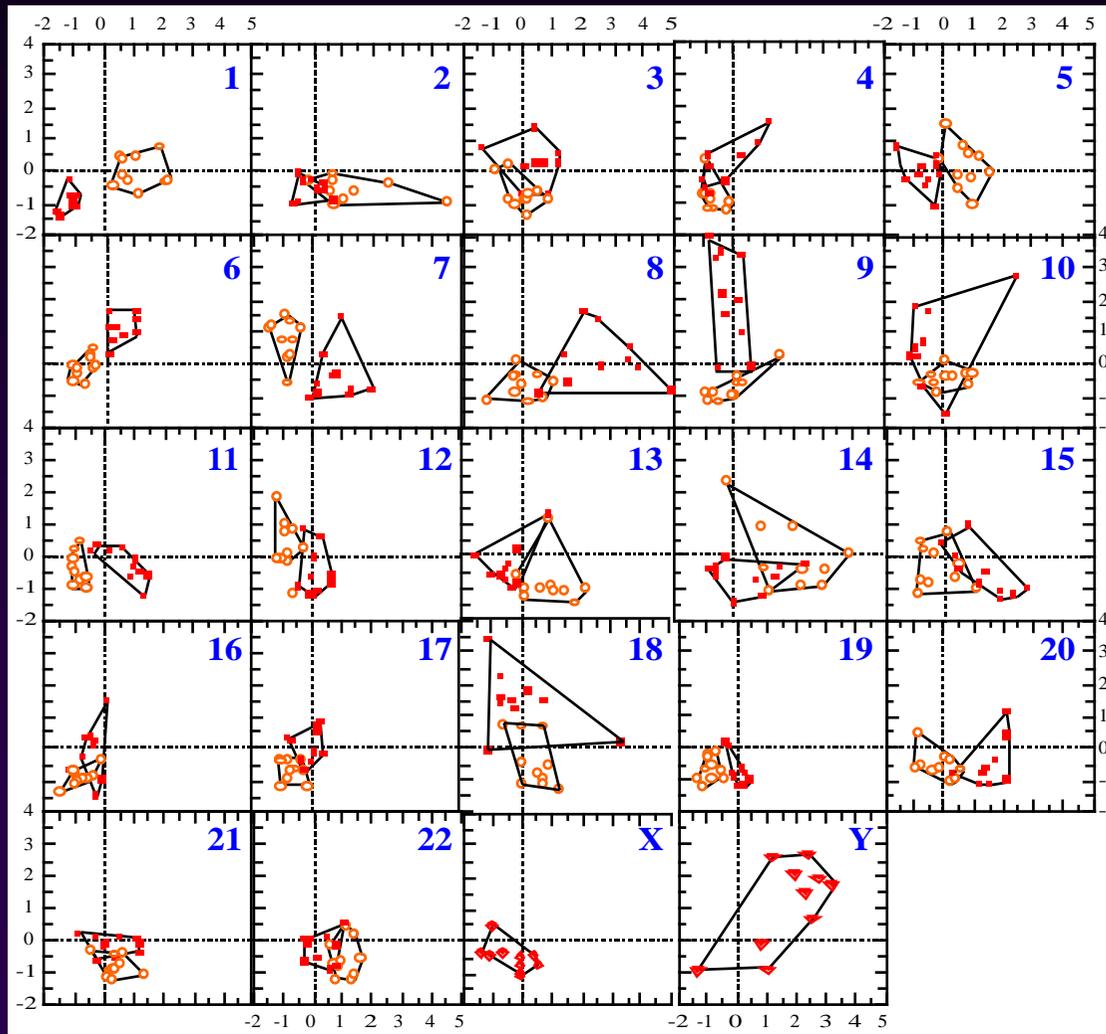
2 groupes : -> distribution aléatoire?

-> paternel / maternel

Distinction des chromosomes 1 homologues

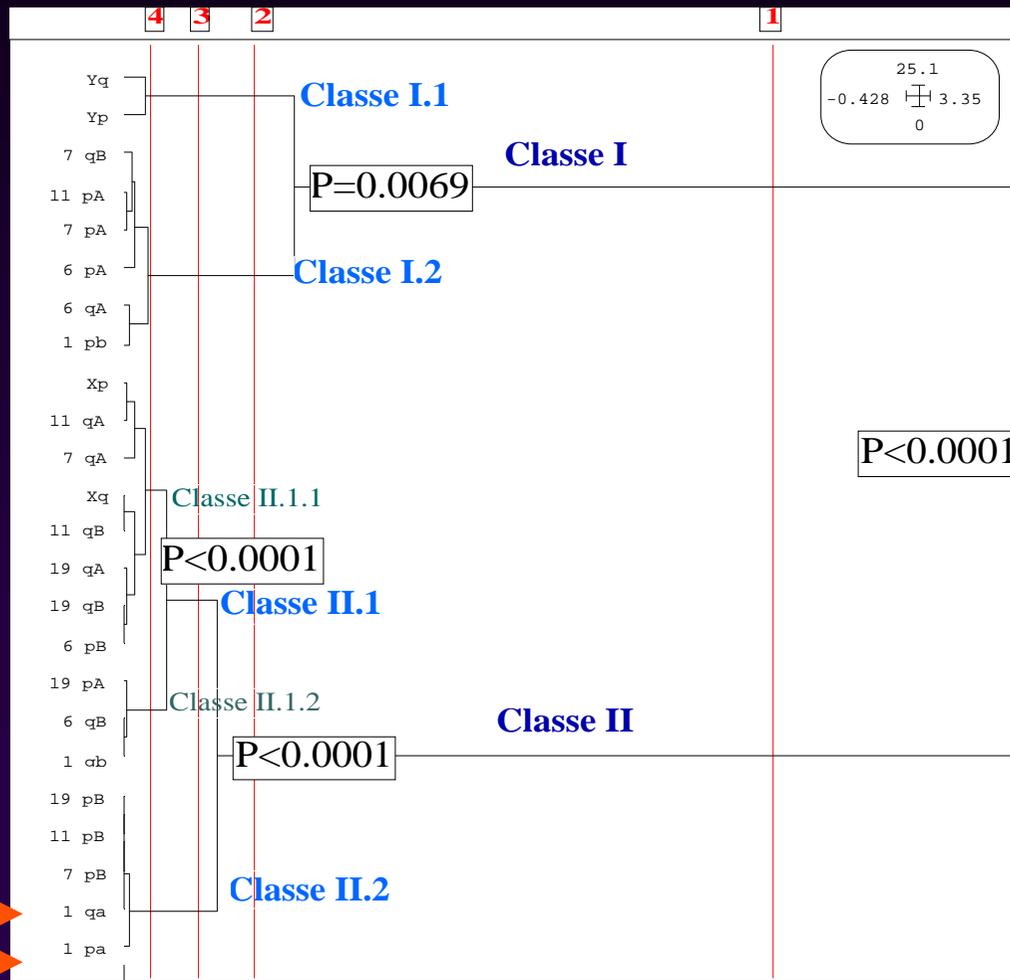
Association du marquage télomérique fort au marquage
hétérochromatique foncé (P=0.08)

Recherche d'hétéromorphismes télomériques



Recherche du nombre de sous classes de longueur des télomères

5 sous classes de télomères



1pa = 1qa

Seul 1pa instable

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

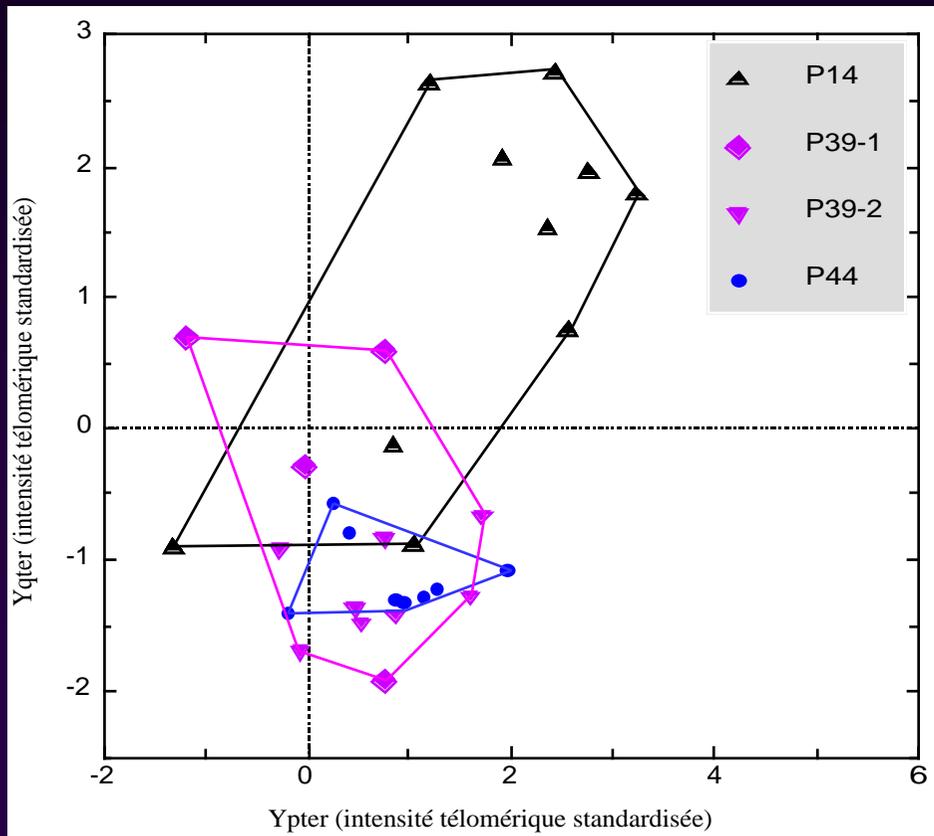
Instabilité chromosomique et longueur des télomères

- Differentiation de chromosomes homologues 1, 6, 7, 11, 19, X, Y
- Les chromosomes instables aux passages proches de la sénescence avaient des petits télomères en P14 (chromosome 1A, 7B ?, 19B ?).
- Les chromosomes avec des petits télomères (11B, 6B) en P14 ne sont pas forcément instables.
- La faible longueur des télomères est nécessaire mais pas suffisante.

Hypothèses

- Le taux d'érosion est différent pour chaque télomère ?
- Sélection cellulaire ?
- Effet des séquences flanquantes : recombinaison préférentielle ? (associations préférentielles : Dic 13-13; Dic 1-13)

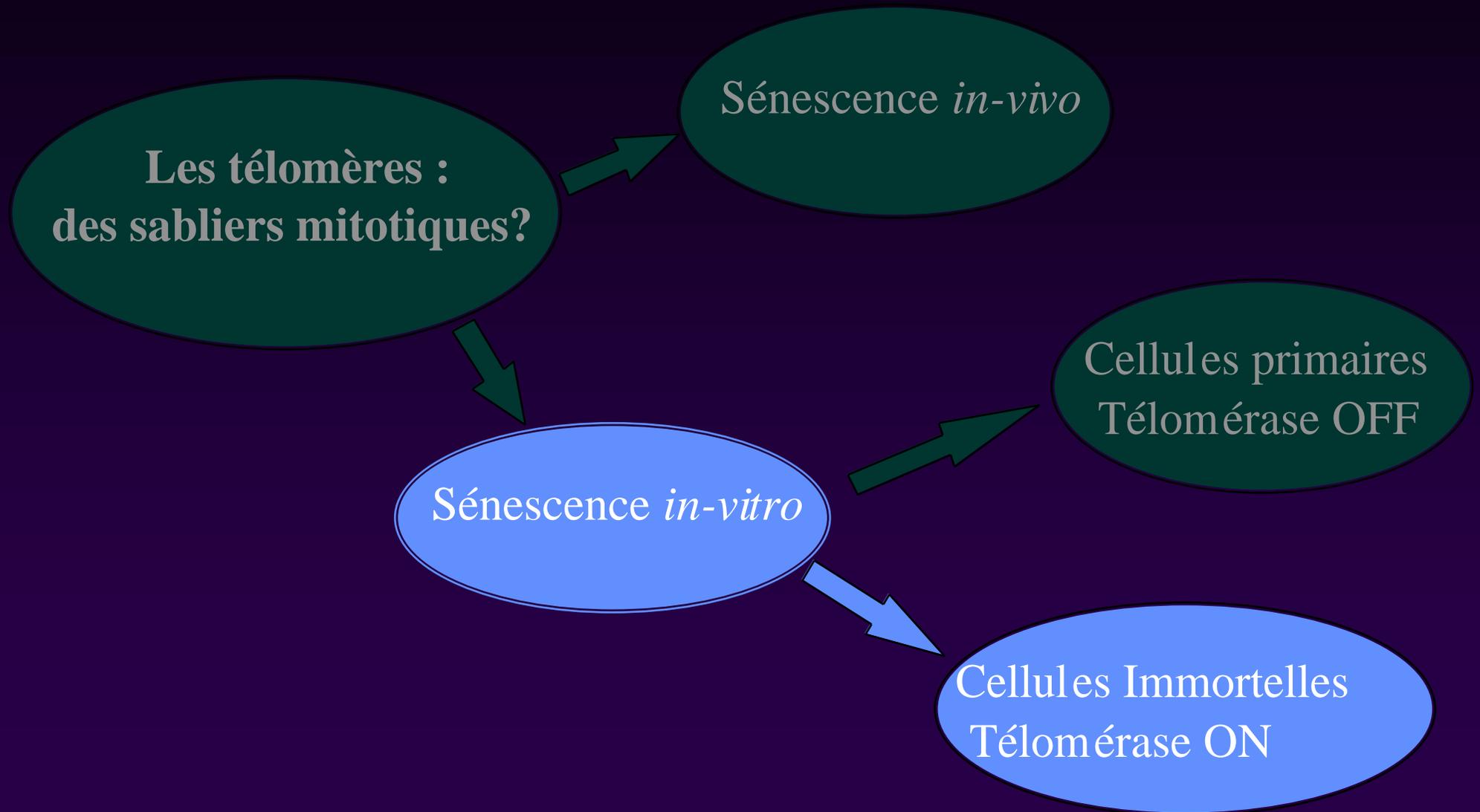
Erosion des télomères du chromosome Y au cours de la prolifération cellulaire.

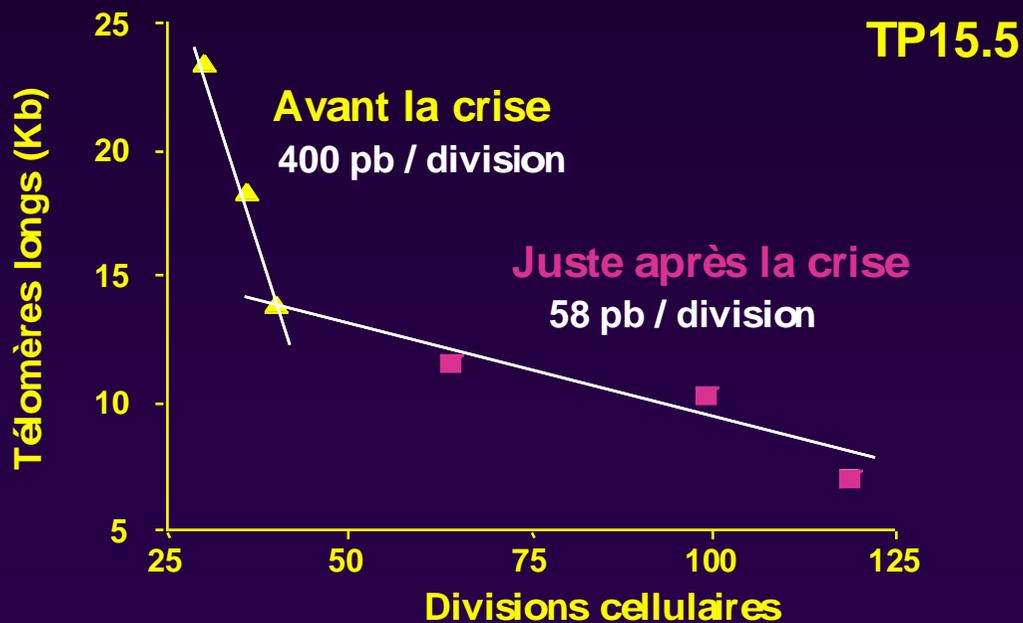
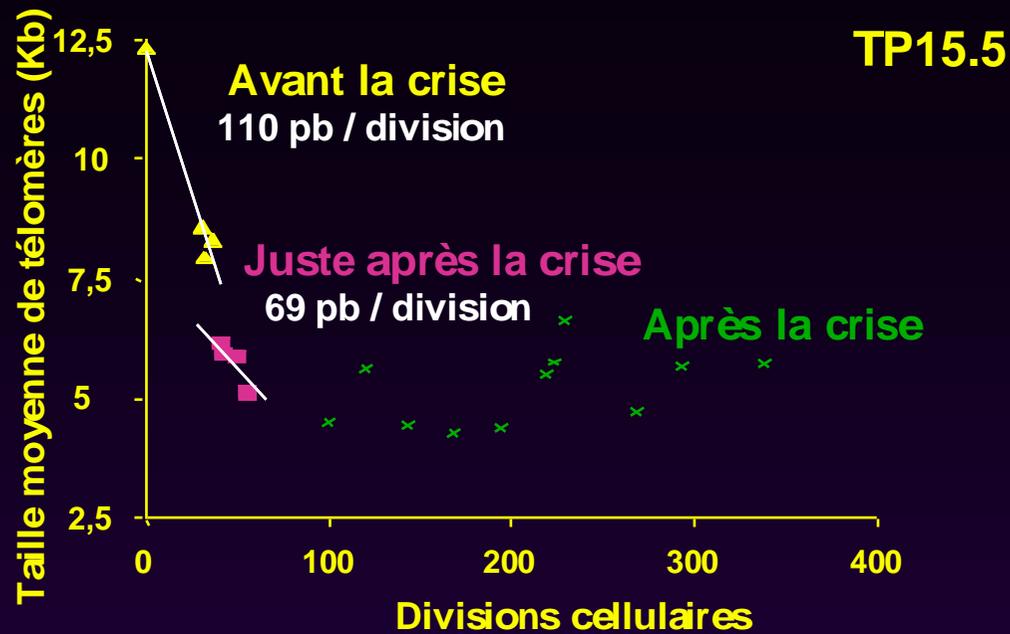


Erosion Yq >> Yp

Hypothèse:
dégradation plus élevée
ou
recombinaison intratéломérique
->expulsion mini cercle

Dynamique de la longueur des télomères et instabilité chromosomique spécifique





Erosion des télomères pré et post crise

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

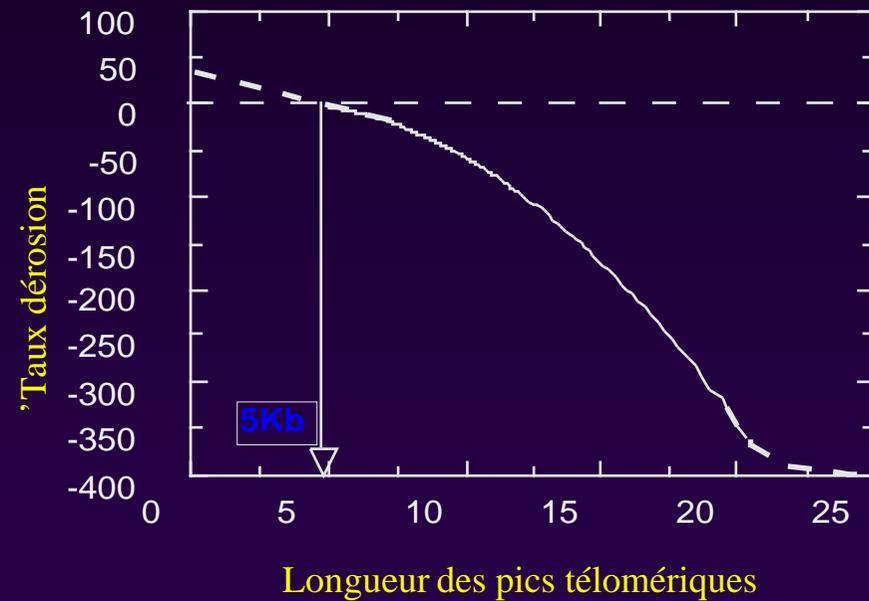
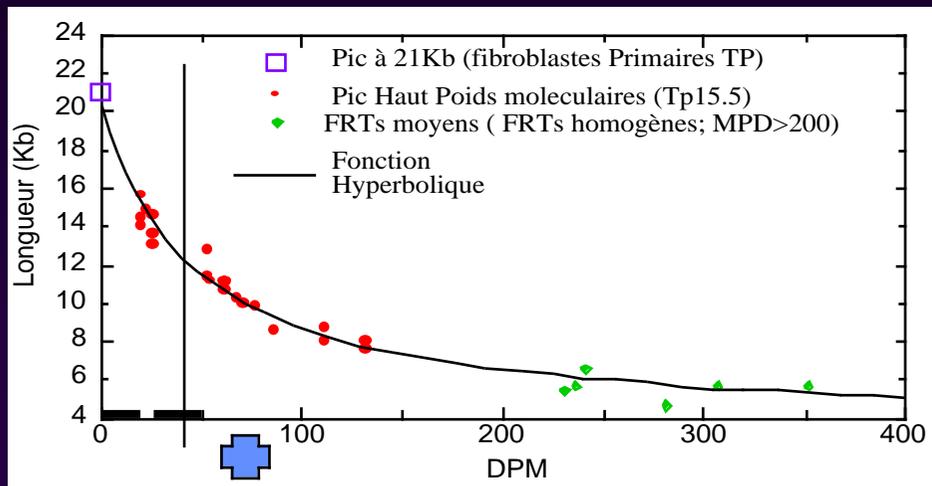
- allongement et dégradation en faveur d'un raccourcissement télomérique

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

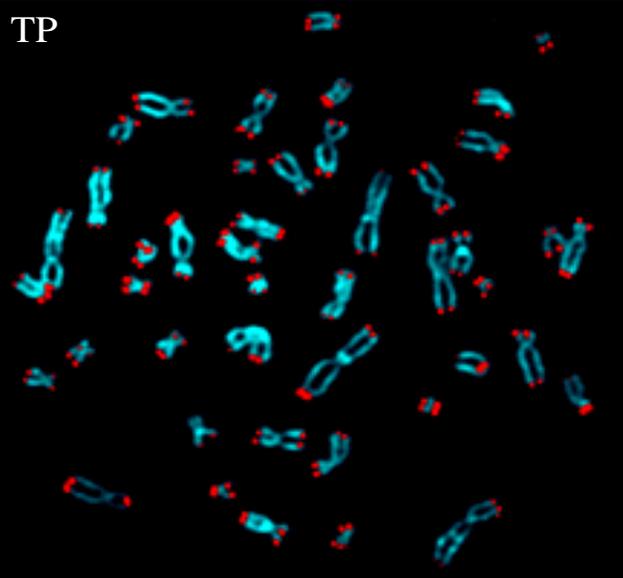
Le taux d'érosion : équilibre entre élongation et dégradation

la diminution des télomères n'est pas constante

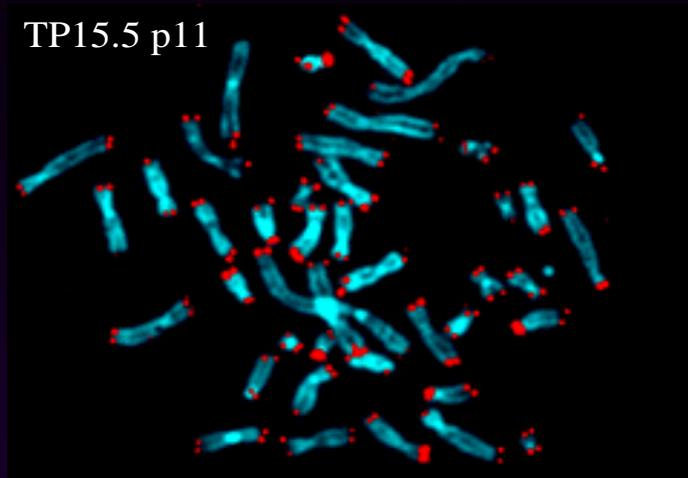
Le taux d'érosion varie en fonction de la longueur des télomères dans le clone
TP15.5



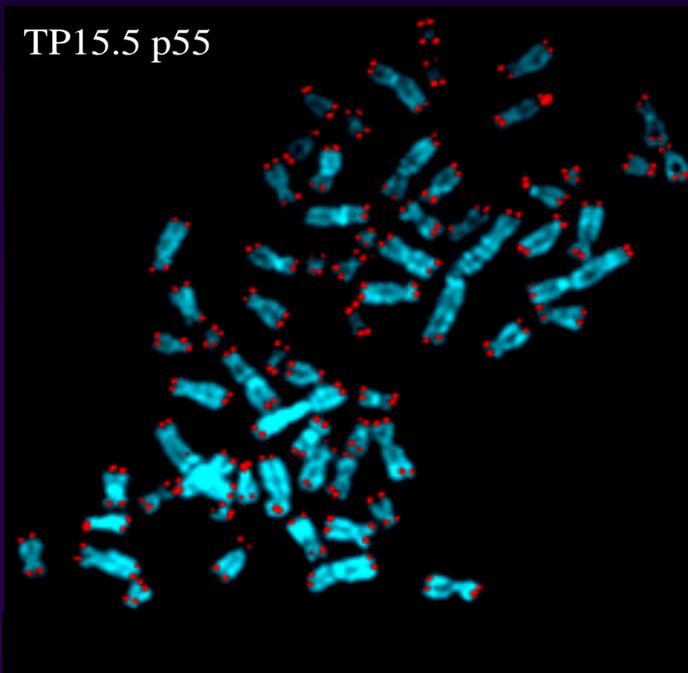
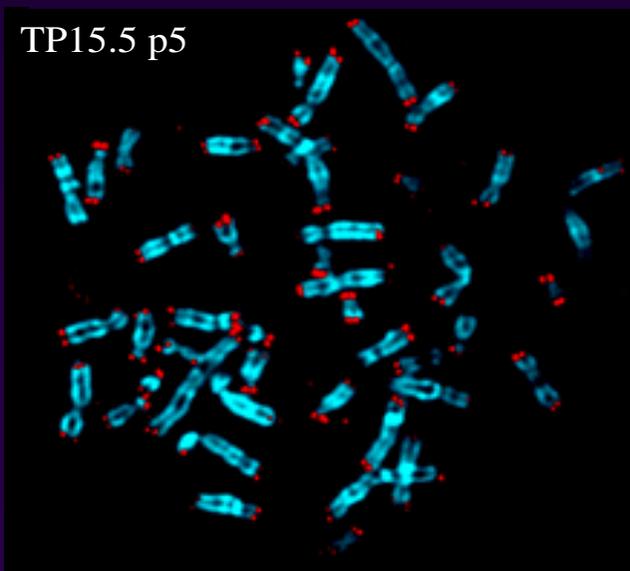
autres facteurs influençant la dynamique d'érosion?



Hétérogène

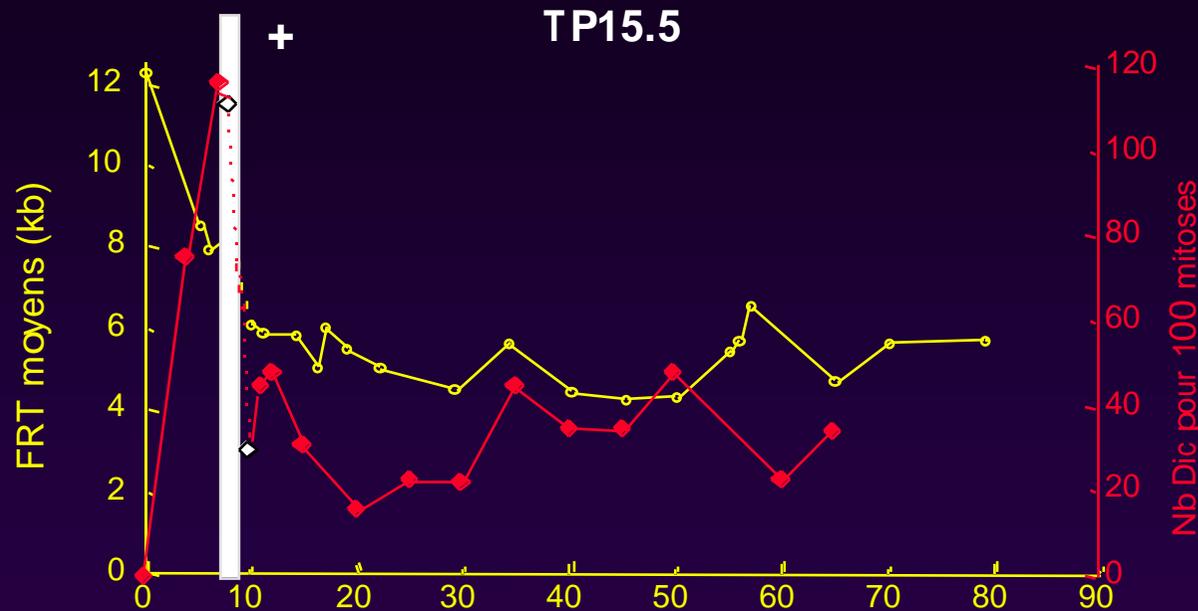


homogénéisation



Variation de l'hétérogénéité télomérique au cours des passages

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"

CONCLUSIONS

- Dans les fibroblastes, les télomères sont hétérogènes en longueur. Certains chromosomes homologues sont hétéromorphes. Origine de cette hétérogénéité et de cette différence ?
 - Recombinaison (méiose) ? Différence entre lignée masculine et féminine ?
- En absence de télomérase, la variation de longueur peut être différente d'un télomère à l'autre:
 - Erosion constante et élevée ou recombinaison mitotique?
- Le taux de variation de la longueur des grands télomères est d'autant plus fort que les télomères sont longs :
 - Mécanisme coopératif du blocage de l'amarrage de la télomérase aux télomères ? érosion différentielle ?
- Il y a stabilisation de la longueur des télomères autour d'une valeur \pm constante (homogénéisation)
 - Facteurs déterminant cette longueur : Contrôle de l'accessibilité des télomères? de l'efficacité de la télomérase ?
- Stabilité différentielle des chromosomes homologues selon leur télomère?

PERSPECTIVES (1)

- Augmenter le nombre de chromosomes homologues différenciables (autres sondes polymorphes).
 - Sondes alphas, minisatellites ... en multiFISH.
- Suivi de la longueur des télomères dans des contextes à réarrangement chromosomiques complexes, au cours de la prolifération cellulaire.
 - Sondes subtélomériques.
- Analyser la distribution de la longueur des télomères des cellules sénescentes (bloquées en G1/S).
 - PCC ?
- Mécanismes de réactivation de la télomérase ?
- Rôle de la structure des télomères (protéines spécifiques), absence de la télomérase/ dynamique des télomères (Taux d'érosion ?)
- Automatiser la segmentation des images de cytogénétiques.
 - *Smart Snakes* ?

PERSPECTIVES (2)

