

Conséquences d'une rupture d'adhérence sur les lignées cellulaires CHO et 3T3

Résumé

Le but de cette étude est de mettre en évidence les conséquences d'une rupture d'adhérence sur le cytosquelette, le cycle cellulaire et l'expression de la cycline D1, ainsi que les mécanismes d'adaptation chez deux lignées cellulaires différentes : les CHO, des cellules épithéliales cancéreuses et les 3T3, des fibroblastes dont l'inhibition de contact est bien connue. Contrairement aux cellules CHO, dont la prolifération est lente, les cellules 3T3 sont bloquées en phase sub-G1 suite à une rupture d'adhérence. Le cytosquelette se réorganise plus rapidement chez les cellules CHO et elles expriment la cycline D1 quelque soit les conditions de culture. L'expression de la cycline D1 varie en revanche chez les cellules 3T3, diminuant lorsque les cultures approchent du seuil de confluence ou bien maintenue à un taux bas lorsque les cellules sont en rupture d'adhérence. L'organisation du cytosquelette des cellules CHO ne semble pas être affecté longuement et se réorganise progressivement. Celui des 3T3 ne semble pas parvenir à se réorganiser. Les conséquences induites par une rupture d'adhérence apparaît réversible chez les deux lignées cellulaires.

Mots-clefs : cycline D1, cycle cellulaire, perte d'adhérence, culture cellulaire

Résultats

Observation des cultures au microscope optique

Les cellules CHO et 3T3 ont été cultivées pendant 72 heures à une concentration initiale de 12 000 cellules/cm² dans 2 milieux différents: sur plastique et en suspension dans du méthocel. Les prélèvements cellulaires étudiés proviennent de cultures trypsinées dont le degré de confluence est évalué au microscope optique (figure 1 A et B).

La culture sur plastique P0 des cellules 3T3 apparait confluent. Les cellules 3T3 sont donc synchronisées en phase G0/G1 car elles sont inhibées par le contact cellulaire. Elles ont adhéré à la matrice extracellulaire.

Concernant les cultures sur plastique, la densité cellulaire semble proche de la confluence au bout de 72 heures.

La culture des cellules 3T3 en condition méthocel n'aboutit pas à la confluence des cellules. En effet, sur méthocel, la densité cellulaire reste à peu près identique pendant 72 heures. Les cellules ne semblent pas avoir proliférer. En retour-plastique, on observe des cultures similaires aux cultures sur plastique: elles sont presque confluent et les cellules ont adhérer à la matrice extracellulaire. On en déduit que les cellules ont également proliférer.

La culture primaire sur plastique des cellules CHO apparait confluent. Les cellules CHO cultivées sur plastique prolifèrent car la densité cellulaire augmente pour atteindre un état confluent au bout de 72 heures. Les cellules CHO cultivées sur méthocel n'atteignent pas la confluence au bout des 72 heures mais ne s'arrêtent pas de proliférer. Il semblerait que le cycle cellulaire de ces cellules fonctionne de manière plus lente. En condition retour-

plastique, les cultures cellulaires ressemblent à celle en condition plastique: les cultures sont confluentes au bout de 72 heures.

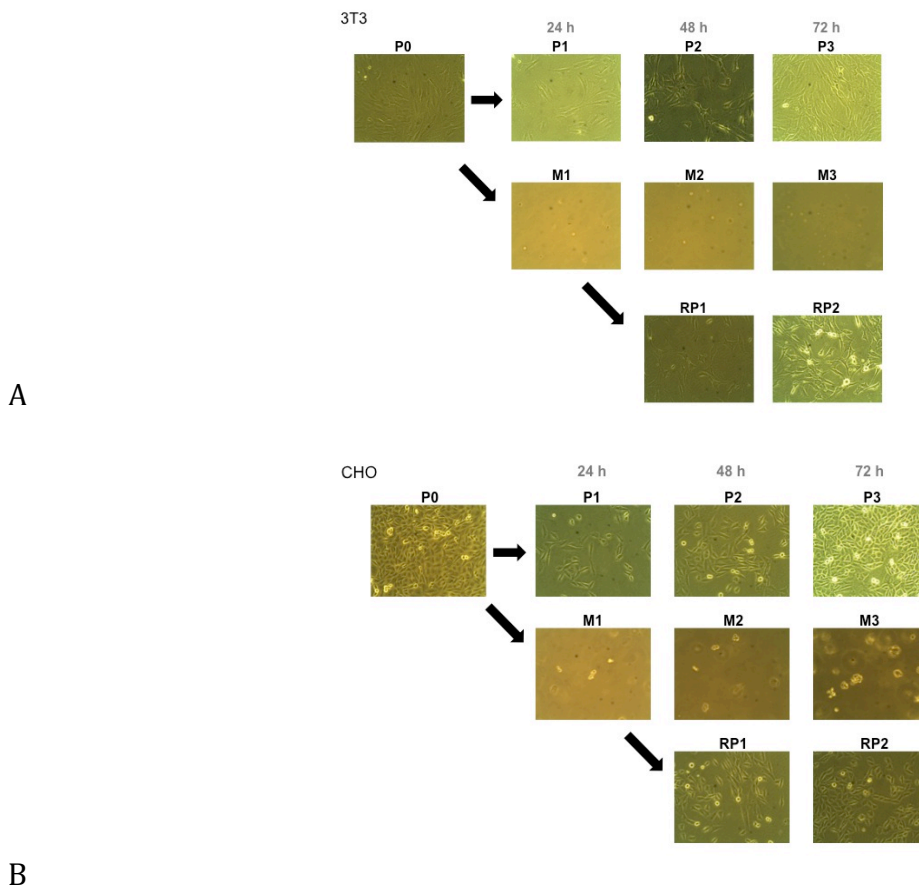


Figure 1 Les cultures cellulaires de 3T3 (A) arrêtent de proliférer en condition méthocel. Les cultures cellulaires de CHO (B) continuent de proliférer en condition méthocel mais moins rapidement.

Détermination et analyse des temps de génération

Pour évaluer la vitesse du cycle cellulaire, les cellules ont été comptées toutes les 24 heures et des temps de génération ont été déterminés (figure 2).

Le temps de génération moyen des cellules 3T3 cultivées en condition plastique n'est pas significativement différents du temps de génération moyen des mêmes cellules en condition retour-plastique. Cela indiquerait que les effets liés à la rupture d'adhérence sont réversibles. En revanche, le temps de génération des cellules 3T3 en condition méthocel est infini, ce qui indique que les cellules sont bloqué dans une phase du cycle cellulaire et qu'elles ne prolifèrent pas ou quasiment pas sur ce milieu.

Le temps de génération moyen des cellules CHO cultivées en condition plastique est inférieur à celui des mêmes cellules cultivées sur méthocel. Cela signifie que le cycle cellulaire des cellules CHO est ralenti dans des conditions de non-adhérence mais que les cellules continuent de proliférer. Le temps de génération moyen des cellules CHO cultivées en condition retour-plastique n'est pas significativement différent du temps de génération moyen des mêmes cellules cultivées sur plastique. Cela indiquerait également que les effets de la rupture d'adhérence sont réversibles.

Les cellules CHO présentent un temps de génération moyen supérieur à celui des cellules 3T3. Elles proliféreraient donc moins rapidement que les cellules 3T3 et seraient en mesure de proliférer en absence de contact avec la matrice extracellulaire contrairement aux cellules 3T3 dont le temps de génération est infini en condition méthocel. Néanmoins, les effets de la rupture d'adhérence cellulaire seraient réversibles après reprise de contact avec la matrice extracellulaire.

	P	M	RP
3T3	18,15 h	∞	17,6 h
CHO	24,6 h	27,1 h*	21,85 h

Figure 2: Le temps de génération moyens des cellules 3T3 est inférieur à celui des CHO et est infini en condition méthocel

Analyse des populations cellulaires (figure 3)

Afin d'étudier les proportions de cellules 3T3 (figure 3 A) et CHO (figure 3 B) se trouvant dans les différentes phases du cycle cellulaire en fonction du milieu et du temps culture, les échantillons cellulaires sont analysés par cytométrie en flux.

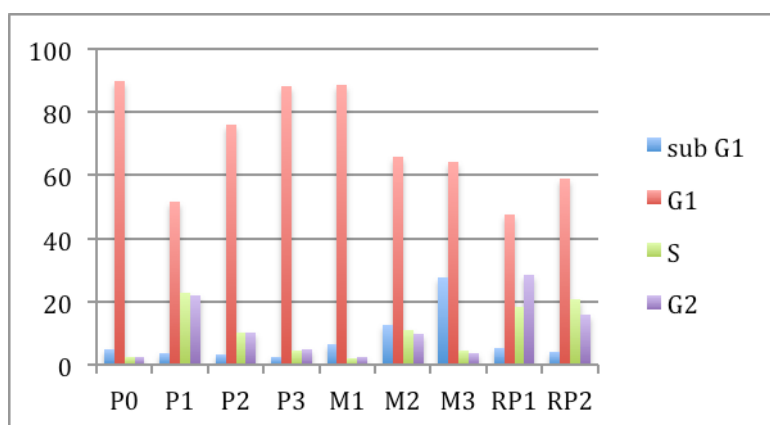


Figure 3 A: Le cycle cellulaire des cellules 3T3 est bloqué dans les cultures prolongées sur plastique et dans les conditions de culture sur méthocel

Les cellules 3T3 issues d'une culture confluente (P0) sont majoritairement en phase G1 (90%). Le cycle cellulaire apparaît donc bloqué en phase G1. Les cultures sous-confluentes de 3T3 en condition plastique (P1 et P2) présentent des populations égales minoritaires en phase S et G1 à des taux plus élevés que ceux observés pour la culture confluente d'origine. Plus la densité cellulaire d'une culture approche de la confluence, plus le taux de ces populations diminuent (P1>P2>P3). Cela traduit une baisse de l'activité du cycle cellulaire.

Les cultures sous-confluentes de 3T3 en condition méthocel présentent également une population majoritaire de cellules en phase G1 (89%). Cependant, ces cellules en rupture d'adhérence semblent arrêter de proliférer. En effet, le taux de cellules en phase G1 diminue d'environ 20%, au profit d'une augmentation des taux de cellules en phases sub-G1. On observe une légère augmentation provisoire des taux de cellules en phases S et G2 avant que ceux-ci ne reviennent à leur valeur d'origine.

Les cultures sous-confluentes de 3T3 en condition retour-plastique présentent des taux de cellules en phase S et G2 plus élevés mais qui diminuent avec le temps pour s'approcher des valeurs observées en condition plastique chez les cultures sous confluentes. Il semble que le cycle cellulaire est repris provisoirement.

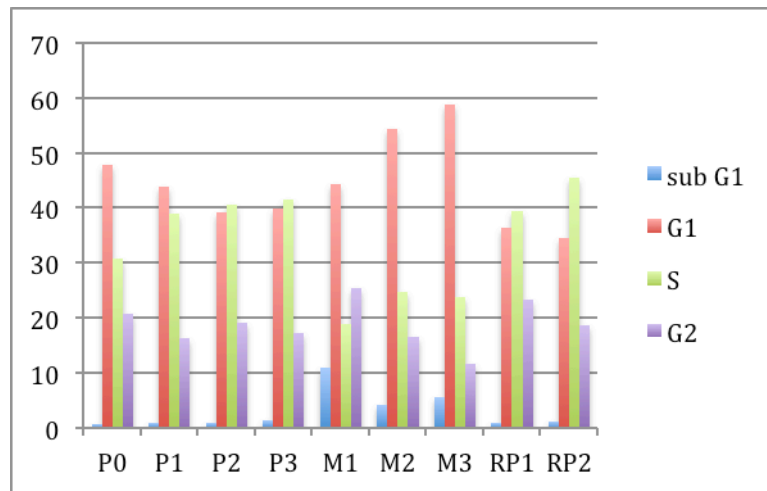


Figure 3 B: Le cycle cellulaire des cellules CHO se poursuit quelque soit les conditions de culture

Les cellules CHO issues de cultures confluentes, en condition plastique, sont pour 50% en phase G1, pour 30% en phase S et pour 20% en phase G2. Les cellules sont donc en division. Presque aucune cellule ne se trouve en phase sub G1. Cette même répartition des cellules dans les phases du cycle cellulaire est observée dans les échantillons cellulaires issus de cultures sous-confluentes en condition plastique et cela, il semble, indépendamment du temps de culture.

En condition méthocel, les cellules CHO se répartissent toujours majoritairement dans les phases G1, S et G2. Cependant, les cellules en phase G1 sont plus nombreuses, même si le nombre de cellules en phase S et G2 est toujours important. Il semblerait que la perte d'adhésion cellulaire ait ralenti le cycle cellulaire.

En condition retour-plastique, les cellules CHO sont majoritairement en phase S et ce taux est semblable à celui observé dans les échantillons cellulaires issus des cultures en condition plastique. Il semble donc que le cycle cellulaire se soit accéléré.

Analyse de l'expression de la cycline D1: western blot

On réalise un western blot (Figure 4) pour étudier les variations de l'expression de la cycline D1 chez les cellules CHO et 3T3 en conditions adhérente, sur plastique (P), non-adhérente, sur méthocel (M) et reprise d'adhérence, en retour-plastique (RP).

L'expression de la cycline D1 chez les CHO est constante, en effet ces cellules se divisent en permanence.

Chez les 3T3, la cycline D1 n'est pas exprimée lorsque les cultures plastiques sont confluentes et que les cellules sont synchronisées en G0/G1 (P0). L'expression de la cycline D1 augmente lorsque les cellules sont placées en condition plastique à une densité inférieure à la densité cellulaire de saturation (P1 et P2), c'est à dire en dessous de 40 000 cellules/cm² pour les 3T3. Cette expression diminue lorsque les cellules arrivent à confluence (P3). L'expression de la cycline D1 est constante et maintenue à niveau très bas dans les cultures en conditions non-adhérentes (M1/2/3).

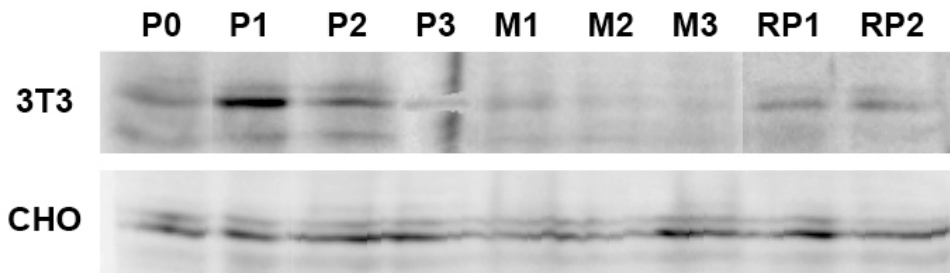


Figure 4 : la cycline est exprimée quelque soit les conditions de culture chez les cellules CHO.

Modifications du cytosquelette (figure 5 A)

Afin de mettre en évidence les modifications du cytosquelette que peut entraîner une perte d'adhérence, on a utilisé une technique de cytoimmunochimie indirecte pour marquer les microfilaments d'actine, les microtubules et l'ADN des cellules CHO et 3T3. Les cellules sont observées 48 heures après mise en culture sur plastique et sur méthocel ainsi que 24h après mise en culture en condition retour-plastique.

Les cellules 3T3 en condition plastique (P) ne sont pas confluentes et étalées sur le milieu. On observe la présence de câbles de stress d'actine, caractéristiques des cellules en culture in vitro. Les noyaux ne présentent pas de microtubules. Les cellules ont une forme étoilée et présentent une taille importante.

Les 3T3 suspendues dans du méthocel (M) montre une autre organisation: elles sont petites et rondes, ce qui indique leur perte de contact avec la matrice extracellulaire. Elles ont perdu leurs câbles de stress d'actine et le réseau de microtubules n'est pas organisé. La densité cellulaire observée est également plus faible que pour les cellules cultivées en condition plastique.

Un jour après mise en culture en condition retour-plastique, les cellules ont repris leurs forme étoilée et taille d'origine, observées précédemment en condition plastique. La densité cellulaire observée apparaît plus importante qu'en condition plastique. Les cellules ont repris contact avec la matrice extracellulaire et présentent un réseau de microtubules organisé.

Les cellules CHO en condition plastique (P) ne sont pas confluentes. Elles sont plus petites que les cellules 3T3 et plus rondes. Elles présentent moins de câbles de stress et moins d'actine corticale. Le réseau de microtubules est moins dense.

En condition méthocel (M), les cellules CHO sont moins denses mais, bien que plus petites, elles présentent une morphologie similaire à celle des cellules cultivées en condition plastique. Le cytosquelette se serait réorganisé rapidement, notamment le réseau de microtubules. En condition retour-plastique (RP), la densité cellulaire apparaît être presque à confluence. Les cellules présentent un cytosquelette organisé, de l'actine corticale et un réseau de microtubules assez dense.

La densité des cellules CHO est plus importante que celle des cellules 3T3 en condition plastique. Les cellules CHO semblent donc se diviser plus rapidement. Leur cytosquelette semble également se réorganiser plus rapidement que celui des cellules 3T3. Dans l'ensemble, les cellules CHO présentent moins de câbles de stress que les 3T3.

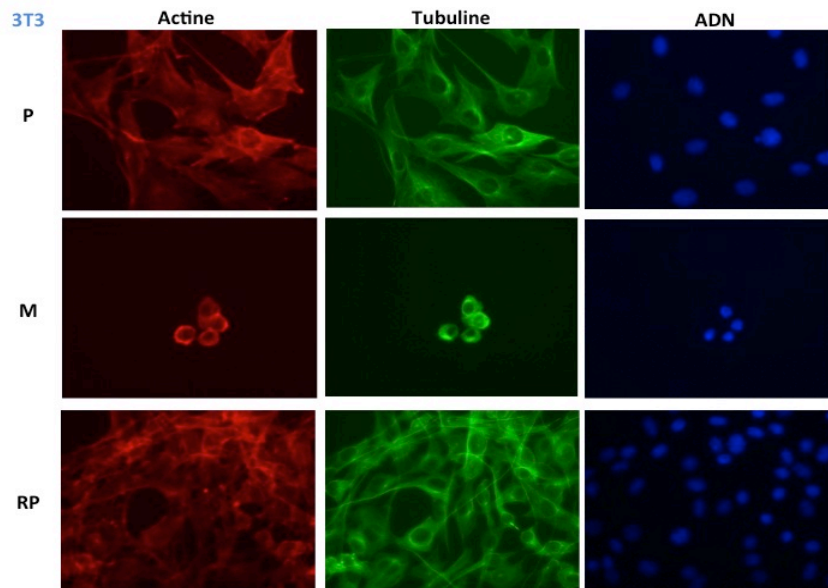


Figure 5 : Le cytosquelette des cellules 3T3 ne se réorganise pas en condition méthocel

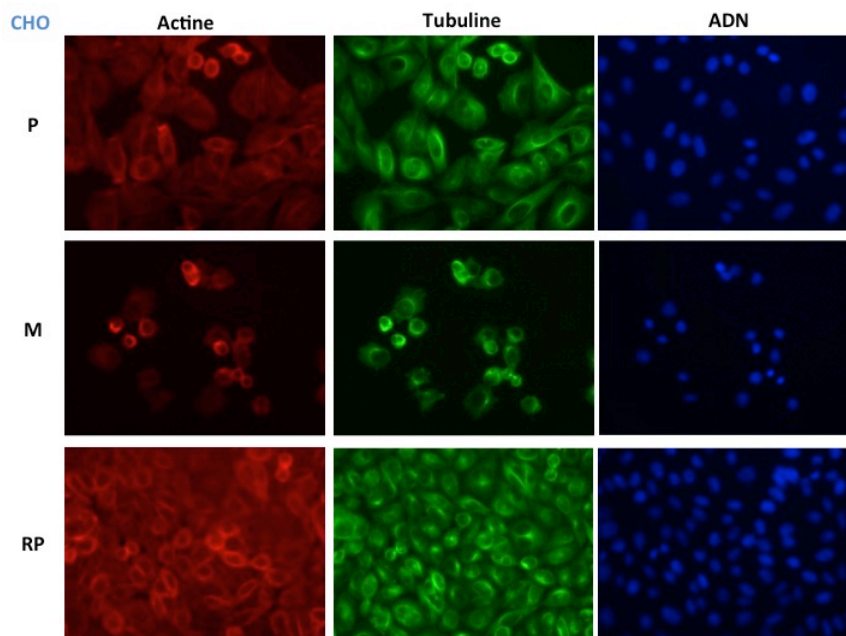


Figure 6 : Le cytosquelette des cellules CHO se réorganise plus rapidement en condition méthocel

Localisation de la cycline D1 (figure 5 B)

La localisation de la cycline D1 est mise en évidence par une technique de cytoimmunochimie indirecte. Les cellules sont observées 48 heures après mise en culture sur plastique et sur méthocel ainsi que 24h après mise en culture en condition retour-plastique. Cependant, l'analyse des résultats obtenus est approximative car les anticorps utilisés pour marqués la cycline D ont généré un bruit de fond important.

Chez les CHO en condition plastique, la cycline D1 n'est pas présente dans l'ensemble des cellules. Sur méthocel, 10% des cellules présentent une quantité importante de cycline D1

dans leurs noyaux, les autres cellules présentent de la cycline D1 majoritairement dans leurs cytoplasmes. En condition retour-plastique, la cycline D1 est marquée dans le noyau de 10% des cellules CHO.

Chez les 3T3 en condition plastique, on observe peu de cycline D1 dans le noyau. En condition non adhérente sur méthocel, les cellules présentent encore une fois peu de cycline D1. En condition retour-plastique, on observe une quantité de cyclines D1 plus importante dans certains noyaux.

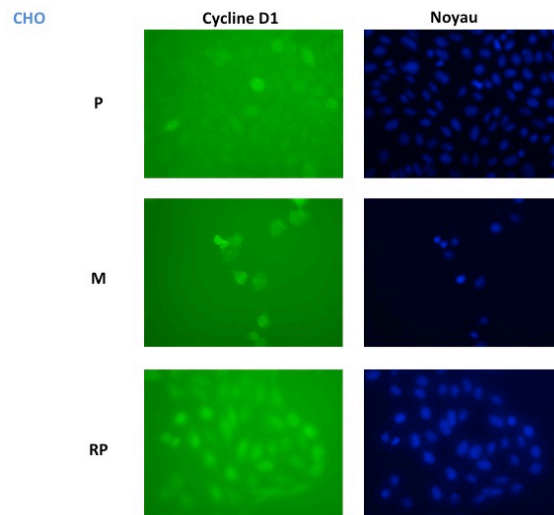


Figure : La cycline D1 est exprimée quelque soit le milieu de culture chez les CHO

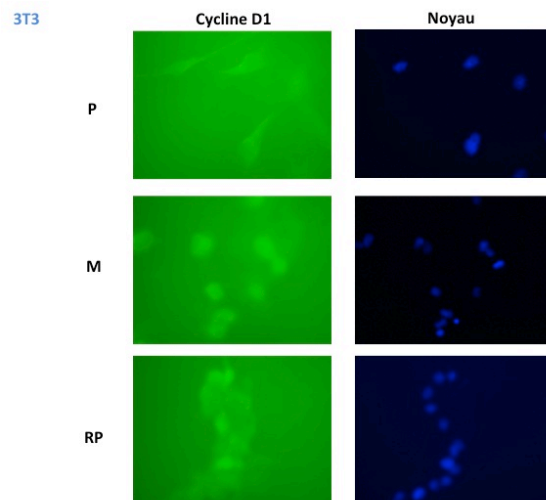


Figure 9 : La cycline D1 est exprimée en condition plastique et retour-plastique chez les 3T3

Discussion

Il est admis qu'il existe une relation entre prolifération cellulaire et adhésion cellulaire (MacPherson et Montagnier, 1964). De plus, une étude a montré que l'adhésion cellulaire joue un rôle important convergeant avec celui des facteurs de croissance dans la transition G1-S (3, 1) et que la signalisation induite coïnciderait avec l'hyperphosphorylation de la protéine Rb par les complexes cdk4-cycline D et cdk2-cycline E. L'adhésion cellulaire induit l'expression de la cycline D1. Néanmoins, les résultats obtenus ici indiqueraient que la prolifération des CHO pourrait en partie échapper à la régulation induite après contact avec la matrice extracellulaire. En effet, leur cycle cellulaire ralentit mais ne se bloque pas, comme pour les cellules 3T3 après rupture d'adhérence, et les cellules CHO expriment la cycline quelque soit les conditions de culture.

Dans une étude portant sur des fibroblastes 3T3 suspendus dans du méthocel, la distribution de l'ARNm est modifiée et la synthèse protéique est perturbée (4). Tous ces effets sont également réversibles. La rupture d'adhérence des cellules 3T3 entraînerait probablement les mêmes phénomènes, ce qui expliquerait le faible taux de cyclines D1 observé ainsi que la mauvaise réorganisation du cytosquelette car l'actine et la tubuline serait moins produite. Le turnover observé dans les cultures retour-plastique serait dû à la stabilisation des pré-ARN en réponse à la rupture d'adhérence, ce qui permettrait une mobilisation rapide de protéines nouvellement traduites en cas de rétablissement du contact à la matrice extracellulaire. Ces activités ne seraient pas perturbées chez les cellules CHO dont la cycline est exprimée invariablement et le cytosquelette est capable de se réorganiser rapidement après rupture d'adhérence. Une autre étude a montré que la dépolymérisation des filaments d'actine empêche l'induction de l'expression de la cycline D1 (2), ce qui rejoint l'observation que les cellules 3T3 présentent une désorganisation de leur cytosquelette accompagné d'un faible taux de cycline D1 en condition non-adhérente.

Une étude a montré que les interactions avec la matrice extracellulaire sont impliquées dans la formation de tumeurs et de métastases (5). La nature des sucres de surface des cellules CHO influencerait leur degré de tumorigénicité. On pourrait donc se demander ce qu'une perte d'adhérence des cellules avec la matrice extracellulaire aurait comme conséquence sur le développement d'une tumeur. D'après cette étude, une rupture d'adhérence ne ferait que ralentir provisoirement le cycle cellulaire de ces cellules, le temps que leur cytosquelette se réorganise. Dans une autre étude portant sur la transformation de cellules fibroblastiques embryonnaires, la modification des propriétés de prolifération, notamment de sa vitesse, est liée à des changements chromosomiques des cellules (6). Une accélération du cycle cellulaire serait caractéristique des cellules transformées. Le cycle cellulaire des cellules 3T3 étant bloqué après rupture d'adhérence, celle-ci pourrait donc empêcher ces cellules de se transformer.

Matériel et méthodes

Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires utilisées sont des CHO et des 3T3. Les 3T3 sont des cellules fibroblastiques polyploïdes issues d'embryons de souris Swiss de 17 à 19 jours. Les CHO sont des cellules épithéliales ovariennes transformées issues d'hamster chinois adulte.

Conditions de culture

Les cellules CHO et 3T3, issues de cultures primaires confluentes trypsinées, sont cultivées pendant 72 heures dans 2 milieux différents: sur plastique et en suspension dans du méthocel. La concentration cellulaire initiale est de 12 000 cellules/cm². Le milieu de culture utilisé contient des antibiotiques et du DMEM additionné de sérum de veau pour les 3T3 et de sérum de veau fœtal pour les CHO. Au bout de 24 heures, des cellules CHO cultivées en suspension sur méthocel sont transférées en condition retour sur plastique. Toutes les 24h, les cellules sont comptées. Certains prélèvements sont effectués à la suite de ce comptage pour la cytométrie en flux et le western blot, d'autres sont transférés dans des labteks pour des expériences d'immunofluorescence.

Western blot: expression de la cycline D1

Les échantillons cellulaires prélevés sont suspendus dans du tampon Laemmli à la concentration de 15 000 cellules/μL. Après migration sur gel de polyacrylamide (10%) et transfert sur membrane de nitrocellulose, celle-ci est incubée toute une nuit avec les anticorps primaires dilués puis le lendemain pendant 1 heure avec les anticorps secondaires dilués dans du lait (5%). Les anticorps primaires utilisés sont des IgG de souris anti-cycline D1 dilués au 1/200^{ème} et les anticorps secondaires non spécifiques sont des anticorps anti-IgG de souris FITC dilués au 1/32^{ème}.

Cytométrie en flux

Les échantillons issus des cultures sur plastique, sur méthocel et retour plastique sont fixés dans de l'éthanol à 70% et conservés à -20°C.

Avant la cytométrie, les cellules CHO sont suspendues dans du PBS additionné de Triton (0.1%) avec de la Rnase A pendant 5 minutes à température ambiante.

Les cellules 3T3 sont suspendues dans du PBS avec de la Rnase A pendant 5 minutes.

L'ADN des CHO et des 3T3 est coloré avec de l'iodure de propidium à 0.5mg/ml.

La fluorescence de l'iodure de propidium est mesurée dans chaque cellule avec un cytomètre en flux à l'aide d'un laser de à 488 nm.

Cytoimmunochimie indirecte

Les labteks sont rincées au PBS. Elles sont incubées avec les anticorps primaires dilués dans l'abdil pendant 45 minutes, puis incubées avec les anticorps secondaires avec ou sans phalloïdine TRITC diluée à 1/100 pendant 30 minutes. Les anticorps primaires utilisés sont des anticorps anti alpha tubuline dilués à 1/300, des anticorps anti-cycline D1 dilués à 1/100. Les anticorps secondaires utilisés sont des anticorps anti lapin FITC dilués à 1/80, des anticorps anti souris TRITC dilués à 1/64 ou des anticorps anti souris FITC dilués à 1/32.

L'ADN est coloré au Hoechst dilué à 1/5000. Les lamelles sont montées au moviol.

Références

1. Richard K Assoian and Martin A Schwartz, *Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression*, Current Opinion in Genetics & Development 2001, 11:48–53.
2. Coert Margadant, Angeliqve van Opstal and Johannes Boonstra, *Focal adhesion signaling and actin stress fibers are dispensable for progression through the ongoing cell cycle*, Cellular Architecture and Dynamics, Institute of Biomembranes, Utrecht University, October 2006.
3. Xiaoyun Zhu, Motoaki Ohtsubo, Ralph M. B6hmer, James M. Roberts, and Richard K. Assoian, *Adhesion-dependent Cell Cycle Progression Linked to the Expression of Cyclin D1, Activation of Cyclin E-cdk2, and Phosphorylation of the Retinoblastoma Protein*, Department of Cell Biology and Anatomy and Cancer Center, University of Miami School of Medicine, April 15, 1996.
4. B. J. Benecke, Avri Ben-Ze'ev and Sheldon Penman, *The control of mRNA Production, Translation and Turnover in Suspended and Reattached Anchorage-Dependent Fibroblasts*, Department of Biology Massachusetts Institute of Technology Cambridge, August 1978.
5. J. Ripka, S. Shin and P. Stanley, *Decreased Tumorigenicity correlates with expression of altered cell surface carbohydrates in Lec9 CHO cells*, Mol. Cell. Biol. 1986.
6. G. J. Todaro and H. Green, *Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines*, Department of Pathology, New York University School of Medicine, New York, 1963.