

Dynamique cellulaire : Partie TD/TP

Temps conseillé : 1h

Consignes : Les réponses devront être portées sur le sujet d'examen. N'oubliez pas de reporter sur chaque feuille le n° d'anonymat de la copie sur laquelle vous inscrirez votre nom.

Attention ! A part les schémas demandés et les questions de cours, toute réponse doit être justifiée à partir des observations expérimentales ; sans justification elle sera considérée nulle.

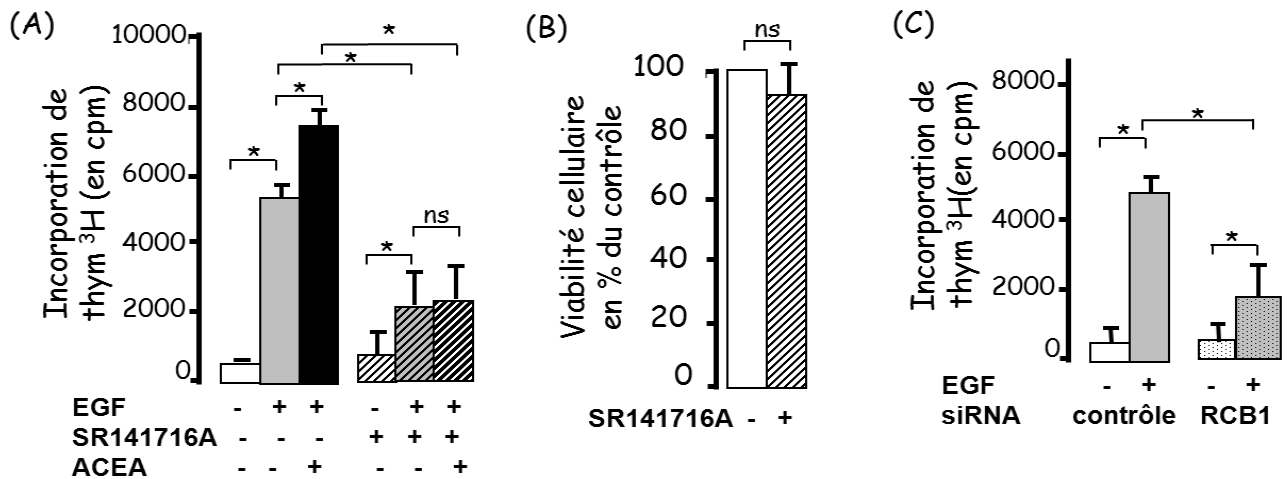
Dans une étude précédemment réalisée (cf TD apoptose) vous avez mis en évidence que le récepteur des cannabinoïdes CB2 induisait l'apoptose des cellules responsables du développement de la fibrose dans le foie : les myofibroblastes hépatiques (MFh). Si ce résultat suggérait que la stimulation du système endocannabinoïde par du cannabis pouvait ralentir le développement de la fibrose, l'étude clinique que vous avez réalisée ultérieurement a démontré le contraire (cf TD). Afin d'expliquer cette discordance vous vous intéressez au second récepteur stimulé par le cannabis, le récepteur CB1 (RCB1). C'est un récepteur à 7 domaines transmembranaires, couplé à la protéine Gi.

Pour étudier le rôle de RCB1 sur des cultures de MFh humains, vous disposez des outils suivants :

- un agoniste sélectif de RCB1 : l'ACEA
- un antagoniste sélectif de RCB1 : le SR141716A
- des siRNA dirigés contre RCB1

Vous décidez donc d'étudier une autre propriété fibrogénique de ces cellules, la prolifération, en utilisant comme approche expérimentale l'incorporation de thymidine ^3H .

Figure 1. (A) Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée (thym ^3H) dans des MFh quiescents traités 24h avec un milieu contrôle ou contenant de l'EGF 5ng/ml, du SR141716A 1 μM et/ou de l'ACEA 2 μM ; (B) Mesure de la viabilité des MFh traités 24h avec un milieu contrôle ou contenant 1 μM de SR141716A. (C) Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée dans des MFh quiescents transfectés avec des siRNA contrôle ou dirigés contre le récepteur CB1 (RCB1) puis traités 24h avec un milieu contrôle ou contenant de l'EGF 5ng/ml. * $p \leq 0.05$



Q1. Quel est l'effet de l'ACEA sur la prolifération des MFh ? Quel récepteur est impliqué ? (1pt)

Dans la figure 1 A nous observons que l'incorporation de thymidine tritiée est significativement plus importante en présence d'EGF et d'ACEA qu'en présence d'EGF seul. L'incorporation de thymidine tritiée ne se faisant que lors de la phase S, ce test permet de suivre la progression du cycle et par extension la prolifération. Ainsi ces résultats suggèrent que l'ACEA a un effet comitogénique avec l'EGF sur les MFH.

Nous observons qu'en présence de SR141716A il n'y a plus de différence entre les conditions EGF seul et EGF+ ACEA. Or le SR est un antagoniste sélectif de RCB1. De plus l'ACEA est un agoniste sélectif de ce même récepteur. Ces observations combinées à ces deux arguments suggèrent fortement que l'effet de l'ACEA sur la prolifération des MFH passe par RCB1.

Q2. Décrivez brièvement le principe du test de viabilité utilisé en travaux pratiques de dynamique cellulaire. Pourquoi était-il nécessaire de tester la viabilité cellulaire avec ce traitement (Fig 1B) ? (1pt)

Mesure activité enzyme mitochondriale en ajoutant le un substrat d'une des enzymes de la mitochondrie qui change de couleur lorsqu'il est métabolisé. Comme on considère que cette activité mitochondriale est constante dans une cellule (ce qui n'est pas toujours le cas), on considère qu'il y a proportionnalité entre nombre de cellules vivante et l'activité mitochondriale.
Besoin de tester viabilité car il faut vérifier que la baisse d'incorporation de thym n'est pas due à la mort cellulaire mais bien à une diminution de la prolifération.

Q3. Décrivez brièvement le fonctionnement des siRNA. (0.5pt)

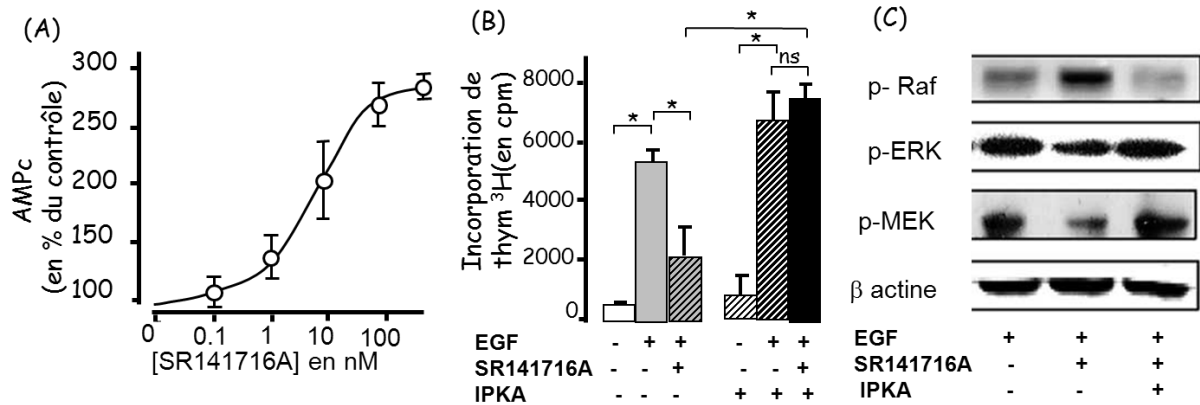
Petit RNA complémentaire d'un ARNm cible.
L'hybridation va provoquer la dégradation de l'ARN cible ou empêcher la traduction et normalement la diminution de l'expression de la protéine qu'ils codent.

Q4. Quels sont les effets de l'invalidation pharmacologique (Fig 1A) ou génétique (Fig 1C) de RCB1? Proposez une hypothèse expliquant comment l'invalidation d'un récepteur puisse avoir des effets en l'absence d'agoniste exogène? (1pt)

Nous n'observons que l'antagoniste de RCB1 (figure 1A) ainsi que l'inhibition de l'expression de RCB1 par des siRNA (fig 1C) inhibe de manière significative l'augmentation de l'incorporation de thymidine tritiée induite par l'EGF. Donc l'inhibition de l'activité basale de ce récepteur bloque les voies de signalisation mitogéniques du récepteur à l'EGF.
Cette inhibition se fait en l'absence d'agoniste exogène. Cela suggère donc que le récepteur est activé de manière basale dans nos cultures : voici deux possibilités pouvant l'expliquer : soit le récepteur est constitutivement actif soit les cellules produisent le ligand endogène de manière constitutive.

Après ces premières observations vous décidez de vous concentrer sur l'étude des mécanismes expliquant l'impact du SR141716A sur l'effet mitogénique de l'EGF sur les MFh.

Figure 3. (A) Mesure de la production d'AMPc 5 minutes après traitement avec le SR141716A. (B) Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée dans des MFh quiescents traités 24h avec un milieu contrôle ou contenant 5ng/ml d'EGF, 1µM de SR141716A et/ou 1µM d'inhibiteur de la PKA (IPKA); (C) Etude par western blot de la phosphorylation (p-) de la MAPK ERK, de la MAPKK MEK et de la MAPKKK Raf après 10 minutes de traitement par 5ng/ml d'EGF, 1µM de SR141716A et/ou 1µM IPKA * p≤ 0.05



Q5. Rappelez le mode de régulation de la PKA ? (0.5pt)

La PKA est activé par l'augmentation des concentrations intracellulaire d'AMPc. (réponse nécessaire et suffisante mais vous pouviez parler également des adénylate cyclases, de leur régulation par les protéines G hétérotrimérique ainsi que que des interactions entre les sous unités régulatrices et catalytiques de la PKA qui sont levées en présence d'AMPc)

Q6. Proposez une explication de la stimulation de la production d'AMPc par le SR141716A ? (1pts)

Dans la figure 1 nous avons mis en évidence que le SR141716A réduisait l'activité constitutive (ou la liaison d'une production constitutive de ligand) du récepteur. Or ce récepteur est couplé à la protéine Gi qui est inhibe les adénylate cyclase et donc la synthèse d'AMPc. Ainsi en inhibant l'activité du récepteur, le SR inhibe l'activité de protéine Gi, ce qui a pour conséquence la levée d'inhibition de l'activité des adénylate cyclases et donc l'augmentation de la synthèse d'AMPC que nous observons dans la figure 2A.

Q7. D'après vos connaissances, schématisez la cascade d'évènements reliant la stimulation de EGFR jusqu'à la stimulation de la transcription de facteurs contrôlant la progression du cycle cellulaire ? (1,5 pts)

Peuvent donner des noms spécifiques n mais termes généraux OK aussi. Ci-dessous le minimum pour avoir tous les points

- l'EGF se lie à un RTk qui se dimérisent
- transphosphorylation des s.u. du récepteur sur des tyrosines et recrutement de protéines adaptatrice et d'une GEF
- petit protéine G-GDP devient petit G-GTP
- recrutement d'une MAPKKK qui phosphoryle une MAPKK qui phosphoryle une MAPK
- phosphorylation et activation de facteur de transcription
- transcription de facteur mitogénique comme la cycline D

Q8. D'après les figure 2B et C, quel est l'effet de l'inhibiteur de PKA sur les cellules stimulées avec l'EGF et traitées par l'antagoniste du récepteur RCB1 ? D'après ces résultats, comment la PKA interfèrerait avec la signalisation via le récepteur à l'EGF ? (1,5pts)

Nous avons vu précédemment que le SR inhibait l'effet de l'EGF sur la prolifération. Dans la figure 2B nous observons qu'en présence d'IPKA qu'il n'y a plus de différences significatives d'incorporation de thym tritiée entre des cellules traitées avec de l'EGF et des cellules traitées avec de l'EGF+SR, donc l'IPKA inhibe l'effet du SR sur l'effet mitogénique de l'EGF.

De même dans la figure 2C nous observons que le SR favorise la phosphorylation de raf et la déphosphorylation de ERK et MEK. Or en présence d'IPKA cet effet d'un traitement au SR sur l'état de phosphorylation des MAPK est totalement inhibé.

Ces observation suggèrent donc que l'inhibition de l'effet mitogénique de l'EGF par le SR et la modification de l'état de phosphorylation des MAPK par le le SR passeraient par la PKA.

Nous avons vu que l'effet du SR sur l'état de phosphorylation des MAPK dépend de l'activité de la PKA. Plus précisément le SR induit une phosphorylation de raf PKA dépendante. Or la PKA est une kinase, nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la PKA phosphorylerait raf et régulerait ainsi son activité.

Enfin nous savons que l'effet de l'EGF sur la prolifération est relayé par la voie des MAPK. Donc en modifiant la phosphorylation des MAPK, probablement via une phosphorylation inhibitrice de raf, la PKA pourrait interférer avec l'effet de l'EGF.

Q9. Proposez un schéma récapitulatif de l'effet de l'inactivation pharmacologique de RCB1 depuis le traitement avec le SR141716A jusqu'à l'inhibition de la prolifération induite par l'EGF. (2 pts)

D'un côté refaire la voie décrite dans la question 7

- l'EGF se lie à un RTK qui se dimérise
- transphosphorylation des s.u. du récepteur sur des tyrosines et recrutement de protéines adaptatrices et d'une GEF
- petite protéine G-GDP devient petite G-GTP
- recrutement d'une MAP3K qui phosphoryle une MAP2K qui phosphoryle une MAPK
- phosphorylation et activation de facteur de transcription
- transcription de facteur mitogénique comme la cycline D

DE l'autre la voie de RCB1 avec la jonction entre les deux voies sur la phosphorylation de raf :

- Traitement avec le SR et liaison sur RCB (R à 7 domaines transmb)
- Diminution soit de la liaison d'un agoniste endogène soit de l'activité du récepteur
- Diminution de l'activité de la protéine G alpha i
- Augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase
- Augmentation de la concentration en AMPc
- Augmentation de l'activité de la PKA
- Phosphorylation inhibitrice de raf