

Université Paris Saclay - Faculté des Sciences

Date: 7.1.2021	Unité d'enseignement EN188: Dynamique cellulaire (L3S5)
Année: 2020/2021	Durée: 2h

Article tiré de la revue Cancer Res, 70(9) 2010, 3813-3822.

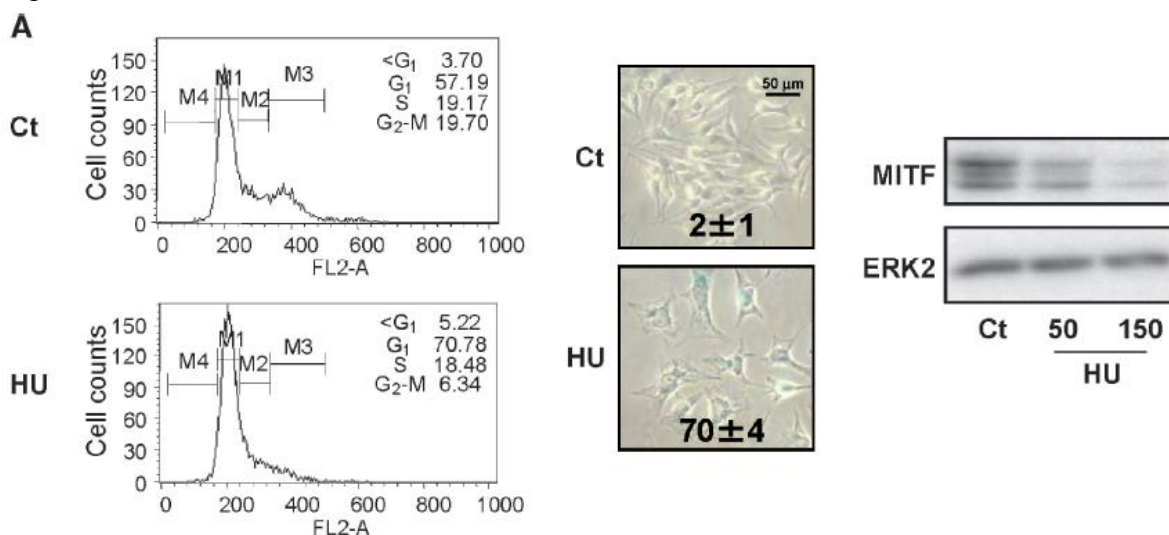
Le gène *Mitf* (microphthalmia transcription factor) code une protéine MITF apparentée à l'oncogène *Myc* qui se lie à l'ADN sous forme d'homodimères, reconnaissant dans la région promotrice des gènes régulés une boîte M de séquence TCACGTG.

La protéine codée par *Mitf* est un facteur essentiel au développement, à la différenciation et à la survie des mélanocytes issus de la crête neurale et par voie de conséquence des mélanomes issus de la transformation de ces cellules. Les gènes cibles de MITF codent des enzymes responsables de la synthèse de la mélanine (Tyrosinase, TRP1 et 2), les protéines du mélanosome dans lequel se déroule cette synthèse, des protéines remodelant le cytosquelette, la protéine *BCL2*, différents récepteurs de facteurs de croissance, des activateurs du cycle (*CDK2*) et des inhibiteurs du cycle comme *p21* (*CDKN1a*).

Le traitement de cellules de mélanome cutanée (lignée 501MEL) pendant 96h avec 150 μ M d'hydroxyurée, un composé qui inhibe la synthèse de novo des dNTPs, conduit :

- 1) à une modification de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (Fig. 1A panel de gauche: détermination du % de cellules dans les différentes phases du cycle par cytométrie de flux, après marquage des cellules avec un composé dont la fluorescence augmente lorsqu'il est intercalé dans l'ADN) ;
- 2) à l'acquisition par les cellules d'un phénotype sénescents (Fig. 1Amilieu : détermination du % de cellules dans lesquelles la bêta-galactosidase acide est détectable à l'aide d'un microscope optique) ;
- 3) à la disparition de la protéine MITF (Fig 1A panel de droite : détection de la protéine MITF par Western blot).

Afin de déterminer si la disparition de la protéine MITF induite par HU pouvait être responsable de l'induction de la sénescence, l'extinction spécifique de *Mitf* est réalisée à l'aide de l'ARN interférent *siMi*, et les effets comparés à ceux de l'ARN interférent contrôle *siC* (Figure 1B). L'induction de la sénescence est mesurée comme en A après 2 (D2) 3 (D3) et 4 (D4) jours. L'effet de l'extinction de *Mitf* sur la prolifération est mesuré en Figure 1C. L'effet des ARNs interférents sur la présence dans les cellules de la protéine codée par *Mitf* est présenté dans un western blot (Figure1C)



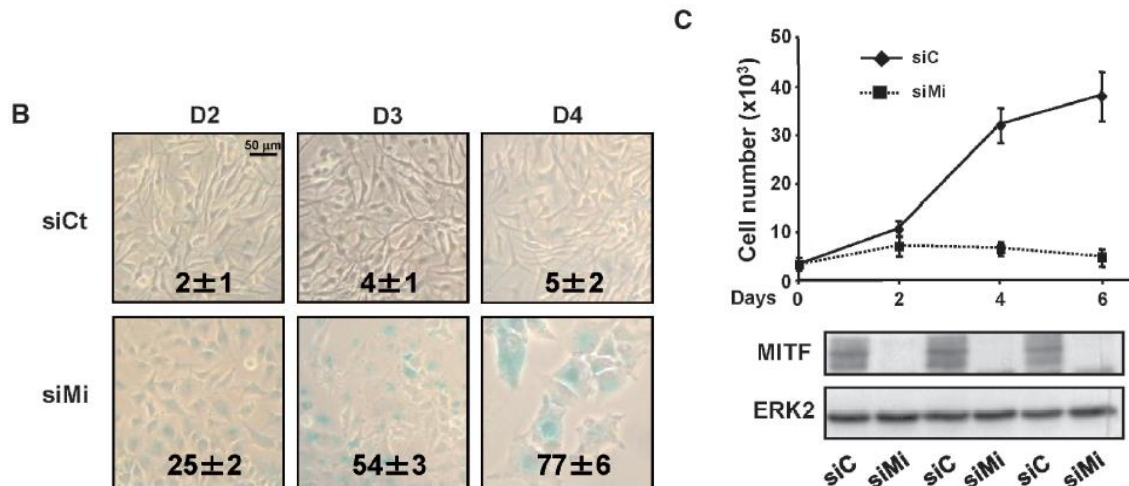


Figure 1

1A, panel de gauche : Evaluation du pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle par cytométrie en flux (FL2 : fluorescence de l'intercalant de l'ADN).

1A, panel du milieu : Mise en évidence de l'expression de beta-galactosidase acide dans les cellules, le % des cellules positives pour la bêta-galactosidase acide est indiqué.

1A, panel de droite : Western Blot suivi d'une immunodétection de MITF et ERK2 en présence ou en absence d'hydroxyurée (HU).

1B: Mise en évidence en microscopie de l'expression de la bêta-galactosidase acide dans les cellules, le % des cellules positives est indiqué dans des cellules transfectées par des siMi ou siC.

1C, panel du haut : Evolution du nombre de cellules transfectées avec les ARNs interférents siMi ou siC au cours du temps (en jours).

1C : panel du bas : Western Blot suivi d'une immunodétection pour MITF et ERK2 2, 4 et 6 jours après transfections des siMi ou siC.

Q1 : HU induit-il l'apoptose ? dans la figure 1A, que représentent les cellules en M4 ?

Les cellules en M4 représentent la population sub-G1 c'est à dire apoptotique. Faible augmentation (de 3,7 à 5,2%), et forte augmentation des cellules en sénescence exprimant la bêta-galactosidase acide (de 2 à 70%)

Q2 : quel est l'effet de Mitf sur la prolifération des cellules de mélanome ? Sur l'induction de la sénescence ? Justifiez votre réponse.

L'extinction de Mitf, vérifiée par western blot, conduit à une diminution du nombre de cellules en fonction du temps et à une augmentation du nombre de cellules en sénescence (de 5 à 77% 4 jours après extinction de Mitf. Donc Mitf permet la prolifération et empêche la sénescence.

Afin d'étudier la structure des noyaux des cellules dans lesquelles l'expression de Mitf a été invalidée, une observation de la chromatine (noyaux marqués au DAPI, coloré en vert par souci de netteté) montre des pontages internucléaires, qui peuvent être expliqués par l'induction de cassures doubles brin (Figure 2A). Pour étudier les mécanismes de réparation de l'ADN activés dans ces noyaux, une détection de l'histone γ H2AX ainsi que de la protéine MITF est réalisée par immunomarquage (Figure 2B). La quantité d'histone γ H2AX dans ces cellules est mesurée à l'aide d'un western blot (Figure 2B).

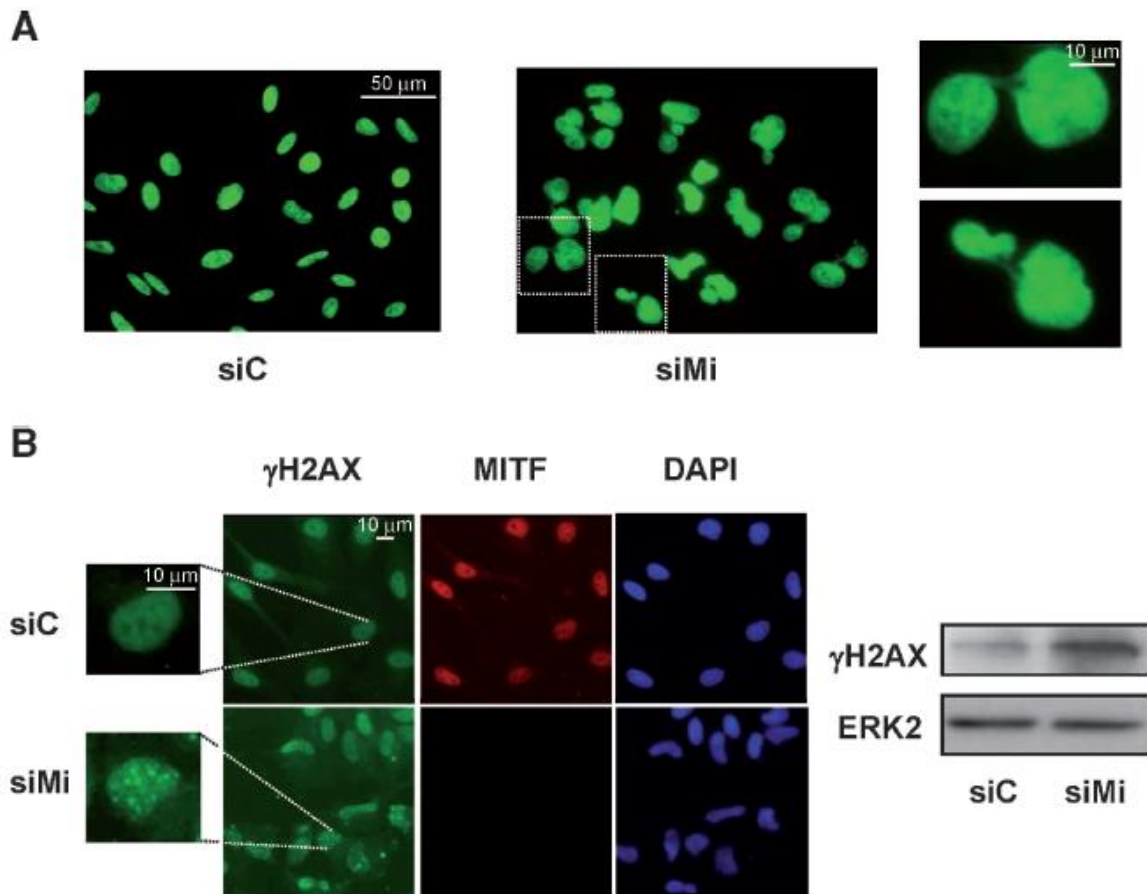


Figure 2

2A : Images des noyaux marqués au DAPI et observés au microscope confocal dans des cellules transfectées avec les ARNs interférents siC et siMi (agrandissement à droite).

2B, panel de gauche : Immunofluorescence réalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre MITF et γ H2AX dans des cellules transfectées avec les ARNs interférents siC et siMi.

2B, panel de droite : Immunodétection après Western Blot d'ERK2 et de γ H2AX dans des cellules transfectées avec les ARNs interférents siC et siMi.

Q3 *Que signifie la présence de foyers γ H2AX apparus dans le noyau des cellules invalidées pour Mitf ? Quel est le rôle de ce variant des histones ?*

γ H2AX, forme phosphorylée de l'histone H2AX par les kinases activées par la détection de lésions de l'ADN (ATM, ATR et DNA-PK). Les foyers représentent l'agrégation des protéines sur les lésions pour permettre la mise en route et la réalisation de la réparation des cassures double brins de l'ADN.

Q4 *Expliquez brièvement quels sont les types de réparation des cassures double brin de l'ADN.*

La recombinaison homologue en fin de S et G2 (besoin d'une matrice guide) et le NHEJ (non homologous end joinig) à tous les stades du cycle.

Afin de caractériser la réponse DDR (DNA damage response) dans ces cellules, la détection de la forme phosphorylée sur la thréonine 68 (T68) de la protéine Chk2 est entreprise. T68 est en effet le premier site phosphorylé sur Chk2. La phosphorylation de T68 permet à Chk2 de s'homodimériser et de s'activer par auto-phosphorylation sur la thréonine 387. La détection de MITF dans ces cellules est également entreprise par immunofluorescence, ou après un western blot (Figure 3A).

Afin de savoir si l'activation de Chk2 est nécessaire pour induire la sénescence dans ces cellules, un traitement pharmacologique de ces cultures avec un inhibiteur (inhChk2) est réalisé (Figure 3B).

Chk2 étant activé par des kinases amont, des inhibiteurs d'ATM (KU55933) ou de DNAPK (Nu7076) sont utilisés sur les cellules de mélanomes transfectées avec les ARNs interférents siMi ou siC, et l'activation de Chk2 mesurée à l'aide de l'anticorps reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée sur T68 (Figure 3C). L'incidence de ces inhibiteurs sur l'induction de la sénescence est également mesurée.

Enfin, l'activation d'ATM est mesurée dans ces cellules à l'aide de l'anticorps reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée d'ATM sur la S1981 (Figure 3D).

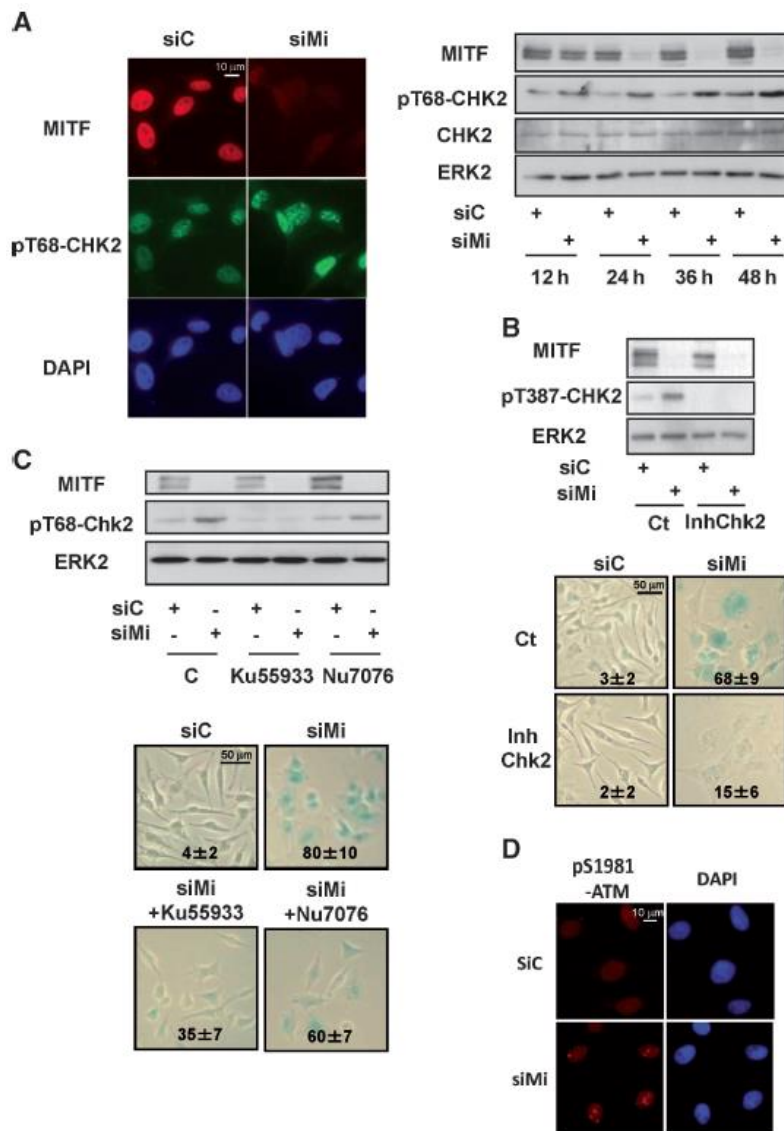


Figure 3

3A, panel de gauche : Immunofluorescence réalisée à l'aide d'anticorps anti-MITF et anti-p68T-CHK2 dans des cellules transfectées avec les ARNs interférents siC et siMi.

3A, panel de droite : Western Blot et immunodétection de MITF, de CHK2, de la forme phosphorylée sur la thréonine 68 de la protéine Chk2 et d'ERK2 au cours du temps après transfection des cellules avec les ARNs interférents siC et siMi.

3B, panel du haut : Immunodétection de MITF, de CHK2, de la forme phosphorylée sur la thréonine 387 de la protéine Chk2 et d'ERK2 36h après transfection des cellules avec les ARNs interférents siC et siMi et en présence ou absence de l'inhibiteur de CHK2.

3B, panel du bas : Mise en évidence de l'expression de bêta-galactosidase acide dans les cellules, le % des cellules positives est indiqué 36h après transfection des cellules par des siMi ou siC et en présence ou absence de l'inhibiteur de CHK2.

3C idem 3B mais en présence des inhibiteurs d'ATM (KU55933) ou de DNAPK (Nu7076)
 3D : Immunofluorescence réalisée à l'aide d'anticorps anti-pS1981-ATM 36h après transfection des cellules avec les siMi ou siC.

Q5 : Quelle est la cinétique d'induction de pT68-Chk2 en réponse à l'extinction de Mitf ?

Forme activée de Chk2 en réponse à l'induction du point de contrôle G2/M. D'après le WBlot fig.2A, on peut voir que la phosphorylation de Chk2 apparaît dès 12h dans les cellules transfectées avec l'ARN interférent siMi et augmente à 24h due à l'absence complète de Mitf. Dans les cellules transfectées avec le siControl, cette phosphorylation est beaucoup plus faible et n'augmente que très peu et seulement après 48h.

Q6 : Quel est le rôle de Chk2 dans l'induction de la sénescence ? Justifiez votre réponse.

La figure 3b nous montre que la bêta-galactosidase est exprimée dans les cellules transfectées avec l'ARN interférent siMi et que cette expression est fortement diminuée en présence de l'inhibiteur de Chk2. Donc, l'inhibition pharmacologique de Chk2 bloque le déclenchement de la sénescence. Chk2 va permettre de stabiliser p53 par phosphorylation, blocage des CDK, déclenchement de la sénescence

Q7 : Quelle est la kinase située en amont de Chk2 dans la voie de réparation des cassures de l'ADN suite à l'extinction de Mitf ? Justifiez votre réponse.

D'après la figure 3C, on peut constater que la forme phosphorylée de Chk2 disparaît en présence de KU55933 l'inhibiteur d'ATM. L'inhibiteur de la kinase DNAPK entraîne seulement une faible diminution de cette phosphorylation. L'inhibiteur d'ATM diminue l'expression de la bêta-galactosidase induite par l'expression de Mitf comme l'inhibiteur de Chk2. ATM est donc situé en amont de Chk2

Afin d'apprécier le rôle de p53 dans l'induction de la réponse DDR induite par l'extinction de Mitf, la Figure 4A montre l'effet du siMi et du siC sur l'immunolocalisation de p53 dans les cellules. La Figure 4B montre l'effet de l'extinction de Mitf sur l'accumulation de p53 et sa phosphorylation sur la serine 15, mesurée 36 heures après l'ajout de siMi ou de siC. Cette phosphorylation est requise pour la stabilisation de p53. L'activité d'un promoteur cible de p53 (pG13) lié à la luciférase est mesurée dans les cellules traitées avec le siMi ou le siC.

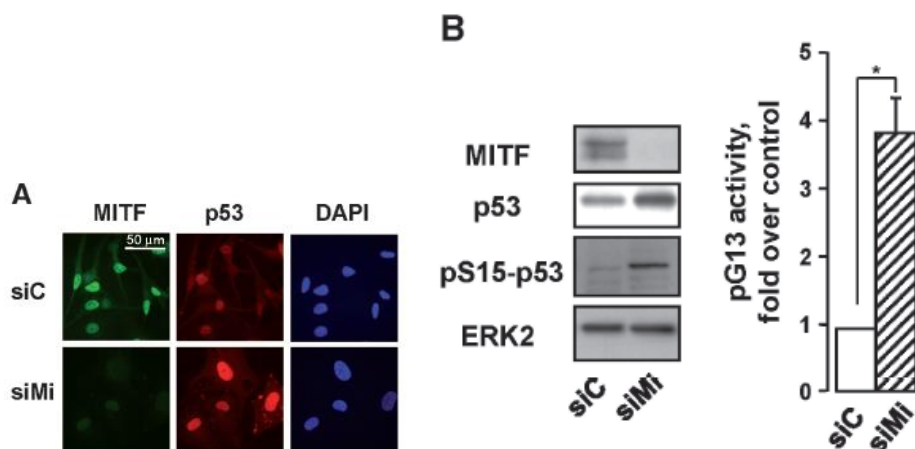


Figure 4

4A : Immunofluorescence réalisée à l'aide d'anticorps anti-MITF et anti-p53 36h après transfection des cellules par des siMi ou siC.

4B : Panel de gauche : Western Blot et immunodétection de MITF, de p53, de la forme phosphorylée sur la sérine 15 de p53 et d'ERK2, 36h après transfection des cellules par des siMi ou siC.

4B : Panel de droite : Mesure de l'activité luciférase dans des cellules possédant le gène codant cette dernière sous contrôle du promoteur pG13. Ces cellules ont été transfectées par les siMi ou siC.

Q8 : Quel est l'effet de l'extinction de Mitf sur p53 ? Justifiez votre réponse.

L'immunofluorescence et le WB fig 4A montre une augmentation de p53 dans les cellules transfectées avec le siMi par rapport aux cellules transfectées avec le siC.

De plus, dans les cellules transfectées avec le siMi, la forme phosphorylée sur la serine 15 s'accumule.

Déclenchement du point de contrôle G2/M consécutif à la disparition de Mitf et l'apparition de lésions de l'ADN, phosphorylation et stabilisation de p53.

Q9 : Pourquoi l'activité du promoteur pG13 est-elle augmentée dans les cellules traitées avec siMi?

P53 facteur de transcription active le promoteur de pG13, donc augmentation de l'activité luciférase

Q10 : En vous basant sur le rôle de BCL2 que vous présenterez brièvement, expliquez en quoi la régulation de ce gène par MITF est importante pour la physiologie des cellules pigmentées.

BCL2, protéine anti-apoptotique se dimérise avec Bax et Bak, protéines pro-apoptotiques qui créent le pore de translocation dans la membrane mitochondriale, et empêche leur activité. Si Bax et Bak agissent, ouverture du pore, sortie de cytochrome C, activation de Apaf et formation de l'apoptosome (par les domaines CARD) clivage de la procaspase 9 pour donner la caspase 9 initiateur qui clivera la procaspase 3 en caspase 3 effectrice de la dégradation des cibles ; apoptose intrinsèque mitochondriale. Beaucoup de Mitf, activation transcriptionnelle de BCL2, inhibition de l'apoptose et survie des cellules pigmentées.