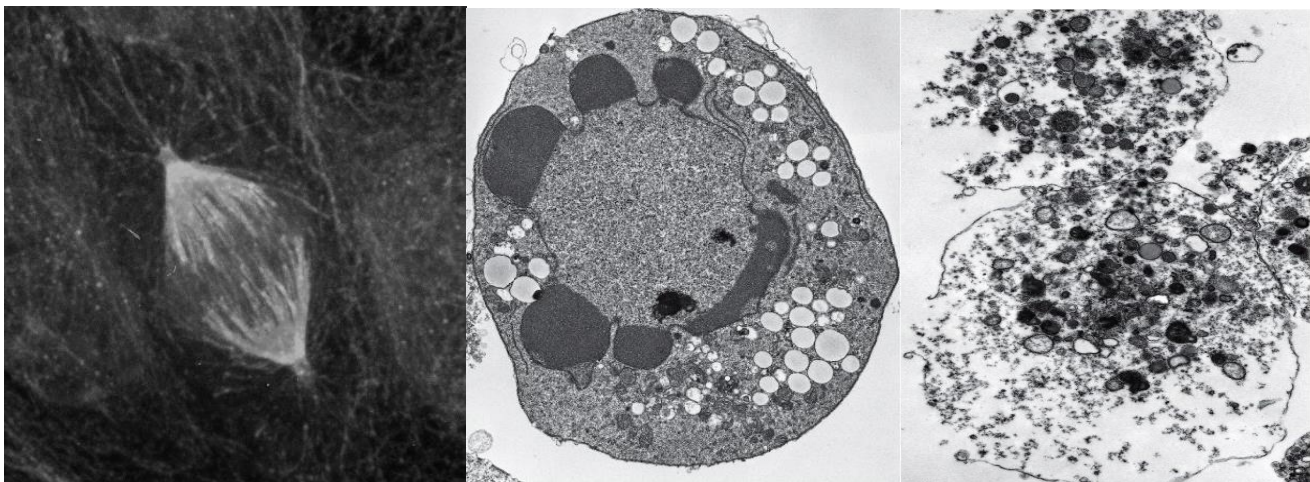


L3S5 DYNAMIQUE CELLULAIRE

2024-2025

TD



SOMMAIRE

COMPARTIMENTATION, TRAFIC ET ADRESSAGE CELLULAIRE	3
CYTOSQUELETTE	9
SIGNALISATION 1 ET 2	13
CYCLE CELLULAIRE	22
SENESCENCE	26
APOPTOSE	32

TD compartimentation, trafic et adressage cellulaire

Exercice 1 : Synthèse de la chaîne légère des immunoglobulines

Les cellules de myélome (tumeur issue de la transformation maligne d'un lymphocyte B) de souris fabriquent en très grande quantité les chaînes légères des immunoglobulines (masse moléculaire de 17 kDa). Il est possible, à partir de ces cellules, de purifier l'ARN messager codant cette chaîne légère. Cet ARNm peut être traduit *in vitro* dans un système acellulaire de synthèse des protéines, contenant tous les éléments nécessaires à la traduction :

- les 20 acides aminés dont l'un, au moins, est radioactif, afin de détecter la chaîne polypeptidique synthétisée ;
- des ribosomes ;
- tous les ARNt et leurs enzymes d'activation ;
- des facteurs protéiques d'initiation, d'élongation et de terminaison ;
- des sources d'énergie : ATP et GTP.

Dans certaines expériences, on ajoute à ce mélange des microsomes rugueux extraits de pancréas de chien ; ces microsomes ont été traités par une ARNase très diluée avant usage. L'ARNm est ajouté au temps 0 de l'expérience et l'incubation dure 20 min à 25°C. Les différents échantillons peuvent aussi subir un traitement à la trypsine, en fin d'expérience, en présence ou en l'absence d'un détergent léger : le Triton X100. Après incubation, les échantillons sont analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, puis soumis à l'autoradiographie.

Dans des expériences d'immunoprécipitation des produits de traduction obtenus *in vitro*, avec des anticorps anti-chaîne légère d'immunoglobuline, on observe que les polypeptides de 21 kDa et de 17 kDa sont reconnus par cet anticorps.

Si, dans le cas de l'expérience 4, on réalise le traitement tryptique en présence de détergent, on ne détecte pas de produit de traduction (nd, idem 3). Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau suivant :

Expérience	1	2	3	4
Microsomes traités à l'ARNase	-	+	-	+
Trypsine en fin d'expérience	-	-	+	+
Masse moléculaire du produit (kDa)	21	17	nd	17

(nd = non détecté)

Si, dans le cas des expériences 2 et 4, on ajoute les microsomes à la fin de l'incubation, et non pas au début, on a les mêmes résultats que dans les expériences 1 et 3.

Q1 : Qu'appelle-t-on microsomes ; pourquoi les traite-t-on à l'ARNase diluée ?

Q2 : Quel est l'intérêt des expériences d'immunoprécipitation ?

Q3 : Interpréter les résultats obtenus *in vitro* et les transposer à la situation *in vivo*, sachant que les lymphocytes B fabriquent des anticorps circulants.

Q4 : L'insertion de la chaîne polypeptidique dans les microsomes est-elle co-ou post-traductionnelle ?

Des microsomes rugueux sont traités avec du KCl 1M, puis centrifugés pendant 1 heure à 100 000 g, à 4°C On obtient un culot de microsomes (culot- KCl) et un surnageant, qui est dialysé afin d'éliminer l'excès de sel (surn-K Cl). La traduction *in vitro* de l'ARNm codant la chaîne légère est étudiée dans de nouvelles expériences où ces deux fractions sont ajoutées seules ou combinées à différents systèmes acellulaires de synthèse semblables à ceux utilisés précédemment. De plus, on utilise des microsomes lisses, qui sont mis ou non en présence de ces fractions. Les résultats de ces expériences sont portés dans le tableau suivant :

Exp	Eléments ajoutés au système de traduction	Produits de traduction MM (kDa)	Sensibilité à la trypsine
1	microsomes rugueux non traités	17	non
2	culot-KCl	21	oui
3	culot-KCl + surn-KCl	17	non
4	culot-KCl + surn-KCl traité à la trypsine	21	oui
5	culot-KCl traité à la trypsine + surn-KCl	7	oui
6	microsomes lisses	21	oui
7	microsomes lisses + surn-KCl	7	oui

Q5 : Quel est l'effet du KCl sur les protéines en général et sur les microsomes en particulier ?

Q6 : Quel est l'effet de la trypsine sur les microsomes ?

Q7 : Comment interpréter l'effet du KCl sur les microsomes (exp. 2, 3 et 4) ?

Q8 : Quelle est l'origine cellulaire des microsomes lisses ; comment interpréter l'effet de la trypsine sur les microsomes rugueux ou l'utilisation de microsomes lisses (exp. 5, 6 et 7) ?

Q9 : Proposer un schéma général du phénomène de translocation de la chaîne légère.

Exercice 2 : LES SYNDROMES DE HURLER ET DE HUNTER

Les mucopolysaccharides (MPS) sont des enchaînements de glucides pouvant être sulfatés, synthétisés par les fibroblastes au niveau de l'appareil de Golgi ils sont ensuite sécrétés. A l'extérieur de la cellule ils s'associent à des protéines et constituent une partie de la matrice extracellulaire. La grande majorité d'entre eux restent associés à la membrane plasmique. Ces MPS sont en **renouvellement constant**, c'est à dire qu'ils sont dégradés relativement rapidement après leur synthèse et leur organisation en matrice extracellulaire.

Les **mucopolysaccharidoses** sont des maladies génétiques responsable de l'accumulation de mucopolysaccharides dans différents tissus. Elles sont chacune déterminées par un gène récessif. A l'état homozygote, elles se manifestent par un retard mental, des malformations du squelette et peuvent entraîner une mort précoce.

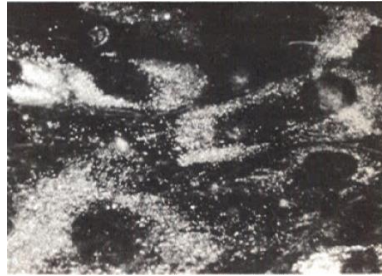
Nous nous proposons d'étudier les mécanismes d'action de deux de ces maladies les syndromes de Hunter et de Hurler. Les expériences décrites ici ont été réalisées avec des cultures de fibroblastes établies à partir de biopsies de peau d'individus normaux ou atteints (homozygotes).

I - ÉTUDE CYTOLOGIQUE

Les méthodes cytologiques permettent de colorer spécifiquement les MPS cellulaires. Les cellules de Hunter ou de Hurler (B) présentent une matrice extracellulaire normale, mais se distinguent des cellules témoins (A) par de nombreux lysosomes devenus plus ou moins énormes par suite d'une accumulation très importante de MPS.



A Témoin



B Patient Syndrome de Hurler

Q 1 - Cette observation vous permet-elle de proposer un mécanisme sur l'origine de la maladie et sur l'accumulation des MPS dans les cellules de Hurler et de Hunter sachant qu'elle ne résulte pas d'une erreur d'orientation au niveau de l'appareil de Golgi ?

II - ANALYSES CINÉTIQUES

1 - Analyse des cellules normales

On rappelle que la majorité des MPS synthétisés par ces cellules restent associés à la matrice extracellulaire mais qu'une partie d'entre eux sont libérés à l'état soluble dans le milieu de culture.

Des cellules normales sont cultivées dans une série de boîtes de Pétri dans un milieu de culture contenant du sulfate radioactif ($^{35}\text{SO}_4^{--}$) (**pulse**) qui, dans ce type de cellule, ne marquera essentiellement que les mucopolysaccharides. Après **deux jours de marquage**, une **chasse** est réalisée en remplaçant le milieu contenant le ^{35}S sulfate par du milieu non radioactif.

Les ^{35}S -MPS associés aux cellules, ainsi que la radioactivité apparaissant dans le milieu de culture sont analysés en fonction du temps de chasse. Il apparaît que cette radioactivité libérée dans le milieu de culture correspond à des MPS de grande taille puisque non dialysables, mais aussi à des MPS dégradés, puisque dialysables et donc de petite taille (Tableau 1).

Tableau 1 :

Temps de chasse (heures)	Cellules normales		
	Cellulaire MPS (cpm)	Matériel radioactif	
		Dans le milieu de culture MPS (cpm)	dialysable (cpm)
0	36500	0	0
2	30500	2800	4700
9	14200	3800	17200
24	5400	2900	29200

Q 2 - Que représente le matériel radioactif cellulaire et quelle serait sa localisation ?

Q 3 - En fonction des réponses aux questions précédentes, expliquez :

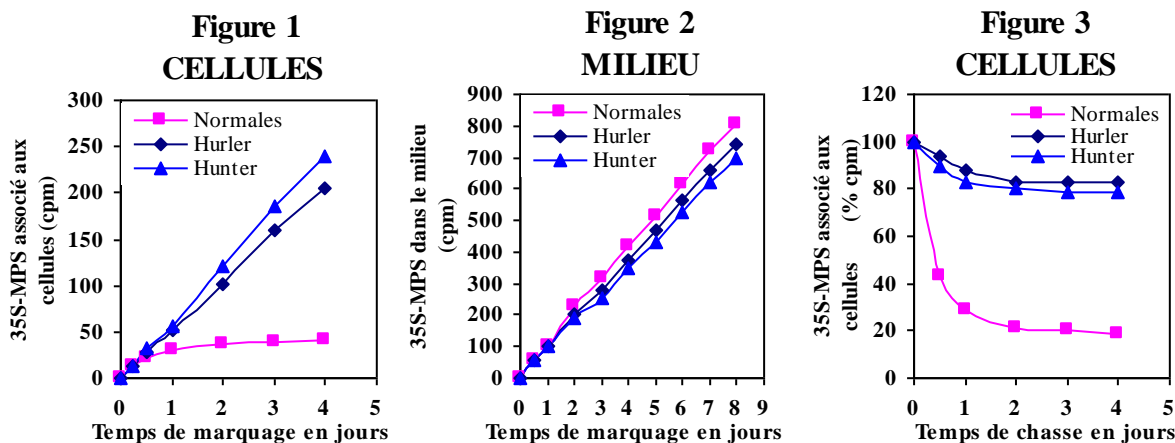
- 1) la décroissance, au cours de la chasse, de la teneur en MPS radioactif associé aux cellules.
- 2) l'origine et l'augmentation du matériel dialysable dans le milieu de culture, sachant qu'aucune dégradation des MPS n'a pas pu être détectée dans le milieu de culture.

Q 4 - Faites un schéma du cheminement des MPS à partir de leur synthèse.

2 - Analyse du défaut des cellules Hunter et Hurler

La même expérience de marquage des MPS suivi d'une chasse est effectuée avec des cellules provenant d'individus normaux ou atteints des syndromes de Hunter ou de Hurler cultivées dans deux lots A et B de boîtes de Pétri :

- **Le lot A** est utilisé pour déterminer l'évolution en fonction du temps de **marquage** du ^{35}S -MPS associé aux cellules (Fig. 1) et libéré dans le milieu de culture (Fig. 2).
- **Le lot B** est utilisé pour déterminer l'évolution en fonction du temps de **chasse** du contenu en ^{35}S -MPS associé aux cellules (Fig. 3).



Q 5 - En fonction de vos réponses précédentes, où serait localisée dans les cellules normales, de Hurler ou de Hunter la radioactivité apparaissant au cours de la première heure suivant le marquage (figure 1) ?

Q 6 - Qu'exprime la pente initiale des trois courbes de la figure 1 ? Le fait qu'elle soit identique apporte-t-il des informations sur les capacités de synthèse des MPS par les trois types de cellules ?

Q 7 - Les trois courbes de la figure 2 apportent-elles des informations sur les capacités de sécrétion des MPS synthétisés par les trois types de cellules étudiées ?

Q 8 - Dès lors, et tenant compte de vos réponses précédentes et des observations cytologiques, dans quel organe devrait être localisé l'excès de radioactivité associée aux cellules de Hunter et de Hurler après le premier jour de marquage (figure 1) ?

Q 9 - Pourquoi la radioactivité restant associée aux cellules de Hunter et de Hurler ne décroît-elle que peu au cours de la chasse (figure 3) ?

Q 10 - Quelle serait l'origine du défaut des cellules Hunter et Hurler ?

III- ANALYSE DES ENZYMES LYSOSOMALES

A - Quelques enzymes lysosomales susceptibles d'intervenir dans la dégradation des MPS ont été dosées dans les cellules normales ou de type Hurler. Les résultats figurent au tableau 2.

Cellules	Activité enzymatique			
	Iduronidase	Galactosidase	Glucuronidase	Acétyl hexosaminidase
Normales	$0,87 \pm 0,3$	$0,35 \pm 0,1$	$0,19 \pm 0,1$	$3,6 \pm 1,5$
Hurler	0	$0,37 \pm 0,1$	$0,20 \pm 0,1$	$4,9 \pm 1,5$

Q 11 - Ces résultats confirment-ils l'hypothèse faite à la question précédente en ce qui concerne les cellules de type Hurler ?

Q 12 - Dans les cellules de Hunter, l'activité de l'iduronidase est normale. Quelle pourrait être l'origine du défaut de ces cellules?

B - D'après vos connaissances,

Q 13 - Comment les enzymes lysosomales sont-elles adressées aux lysosomes ?

Q 14 - Une faible fraction des enzymes lysosomales échappent à cet adressage et se retrouvent dans le milieu extracellulaire. Pourquoi ne peuvent-elles y exercer leur activité hydrolytique ?

C - Il a été observé que lorsque des cellules de Hurler sont cultivées en présence de cellules normales, elles retrouvent en quelques jours un phénotype normal.

Q 15 - Pouvez-vous proposer une hypothèse pour expliquer cette observation ?

Des quantités croissantes d'iduronidase purifiée sont ajoutées dans une série de boîtes de Pétri maintenues à 37°C et contenant le même nombre de cellules de type Hurler. Deux heures plus tard, la quantité d'iduronidase intracellulaire est mesurée. Les résultats sont portés sur la figure 4.

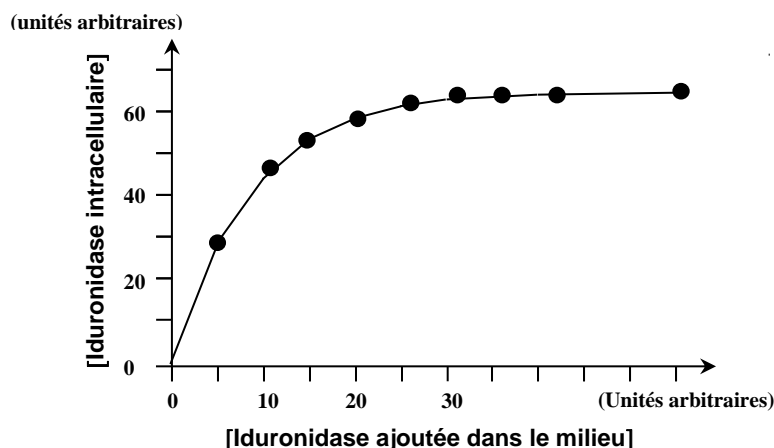


Figure 4

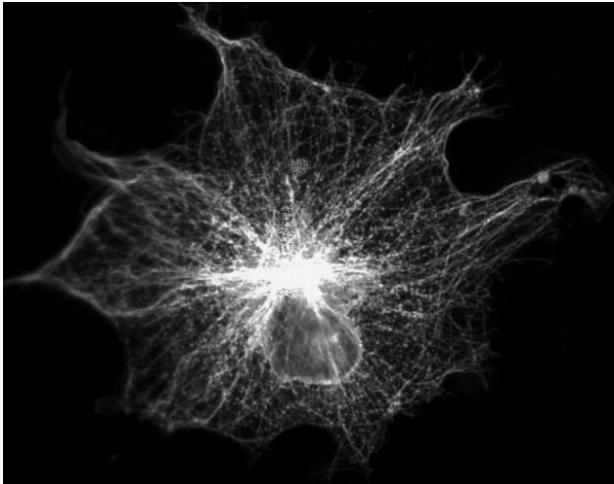
Q 16 - Quelle précision apporte la figure 4 ?

Par ailleurs, on a constaté qu'en ajoutant du mannose-6-phosphate dans le milieu de culture, les quantités d'iduronidase cellulaire restaient très faibles, quelle que soit la concentration de l'enzyme ajoutée au milieu. Cet effet est spécifique du mannose-6-phosphate et ne s'observe pas en présence de mannose.

Q 17 - Interprétez les résultats obtenus avec le mannose-6-phosphate.

Q 18 - En vous aidant de vos connaissances, proposez un schéma décrivant le cheminement de l'iduronidase depuis ses lieux de synthèse jusqu'aux lysosomes dont le pH acide permet à cette enzyme d'exercer son activité mucopolysaccharidasique.

TD Cytosquelette



Organisation du réseau de microtubule au sein d'une cellule de type 3T3 est facilement visualisable par la technique d'immunodétection avec fluorochromes

Exercice I : Etude expérimentale du cytosquelette microtubulaire

Il est possible d'introduire de la tubuline radiomarquée dans des cellules animales en culture par fusion membranaire avec des liposomes préalablement chargés avec cette protéine. Deux et trente minutes après cette introduction (fig. 1 et fig. 2), le réseau de microtubules de ces cellules est analysé successivement par deux méthodes :

- traitement pour une immunodétection avec fluorochromes
- traitement pour l'autoradiographie

Les résultats obtenus sont représentés par les deux dessins suivants, où les traits continus résultent de l'observation après application de la première méthode, et où les pointillés résultent de la deuxième méthode

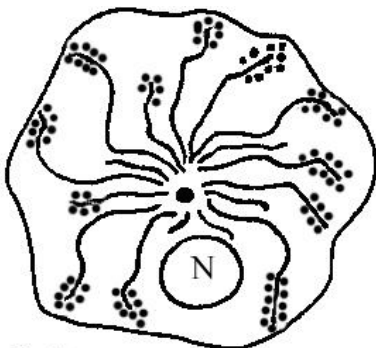


Fig 1

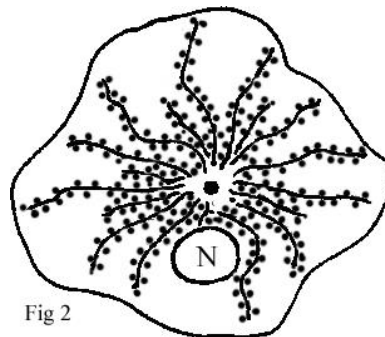


Fig 2

Q1 : Nommer le point de convergence des traits sinueux observés dans les deux cas et décrire son organisation précise.

Q2 : Interpréter ce résultat expérimental. Quelles hypothèses peut-on formuler, concernant les divers aspects des microtubules ?

Lorsque ces cellules sont incubées en présence de colchicine pendant 30 minutes, on obtient la Fig. 3 en immunofluorescence (une fluorescence "de fond" assez importante, difficile à représenter sur le schéma, est néanmoins visible).

Après lavage des cellules pendant 15 minutes pour éliminer la colchicine, celles-ci sont injectées avec de la tubuline radiomarquée et traitées comme précédemment 5 minutes après l'injection; le résultat est donné dans la Fig. 4

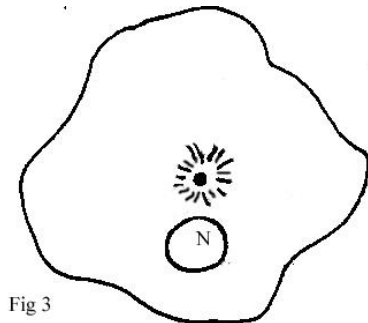


Fig 3

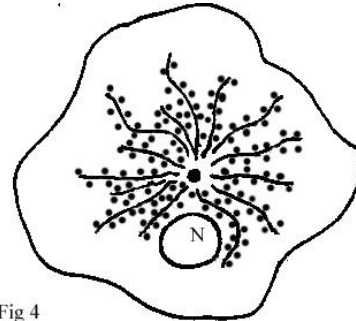


Fig 4

Q3 : Pourquoi le point de convergence des microtubules est-il toujours fortement marqué avec la fluorescence

Q4 : Quel est l'effet de la colchicine (au plan cellulaire et moléculaire), et comment interprétez-vous la Fig. 4 ? (Comparez les Fig. 1 et 4)

Exercice 2 : Analyse de la polymérisation « in vitro » des microtubules et mise en évidence de leur polarité

Lorsque des dimères de tubuline en solution sont incubés à 37°C en présence de GTP, on peut observer un phénomène spontané d'assemblage de microtubules qui présente une cinétique en trois phases (Fig.1) ; la présence des microtubules est détectée grâce à une méthode utilisant la diffusion de la lumière. La phase de plateau est atteinte plus ou moins tôt, en fonction de la concentration initiale en tubuline libre (il existe toujours de la tubuline libre quand le plateau est atteint),

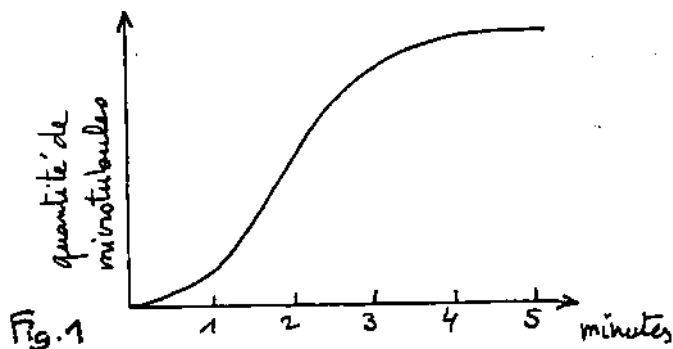


Fig.1

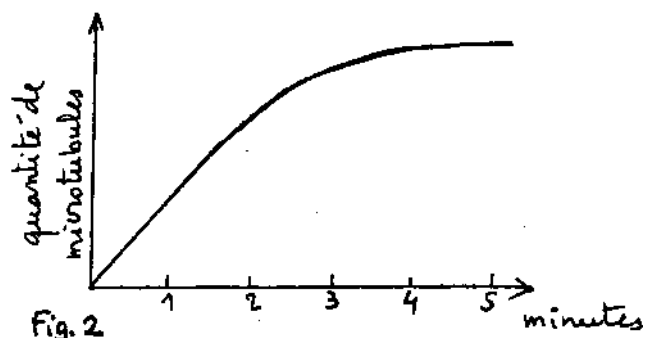


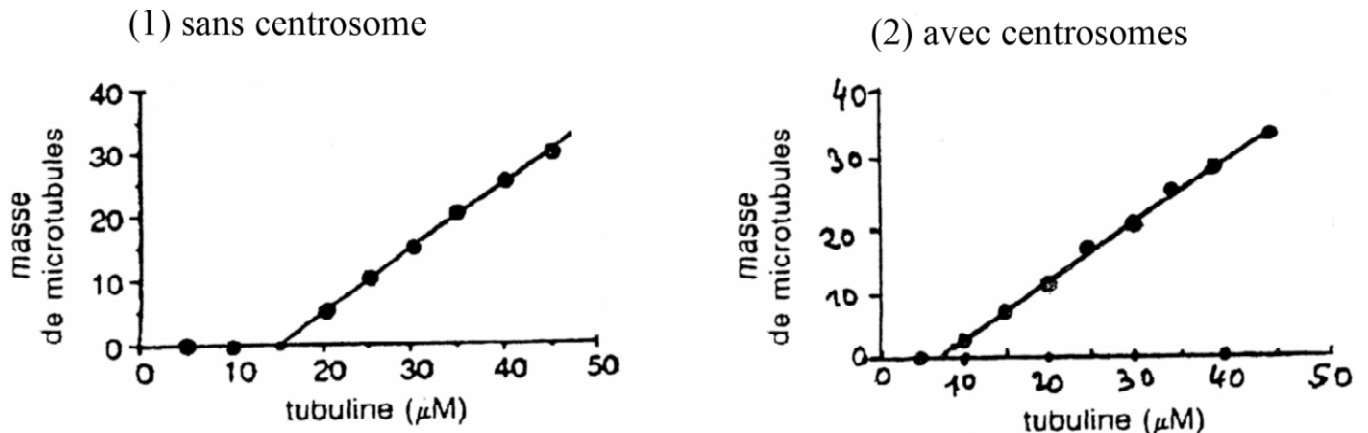
Fig.2

Q1 : Comment peut-on expliquer la présence de ces trois phases ?

Lorsque la solution de dimères est "ensemencée" avec des amorces constituées de courts fragments de microtubules ou même avec de courts fragments d'axonèmes de cils, on obtient la cinétique présentée dans la figure 2.

Q2 : Comparer les deux courbes et proposer une interprétation.

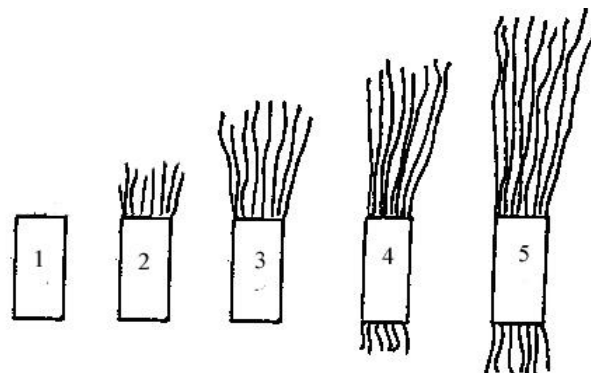
Dans des solutions où la tubuline a une concentration inférieure à 15 μM des microtubules ne se forment jamais ; ils apparaissent seulement lorsque celle-ci dépasse ce seuil, selon la courbe n°1. Lorsque les solutions de tubuline sont "ensemencées" avec des centrosomes, les microtubules se forment à une concentration voisine de 8 μM (courbe n°2).

**Q3 : Interpréter ces deux courbes et rappeler comment se forment les microtubules, in vivo, au niveau des centrosomes.**

Dans une cellule typique, on calcule que la concentration en tubuline libre est de 1 mg/ml environ ; la masse moléculaire d'un dimère de tubuline est de 110 kDa.

Q4 : Calculer la concentration molaire en tubuline dans le cytosol et comparer cette valeur aux concentrations-seuil de deux premières expériences in vitro précédentes : que peut-on conclure ?

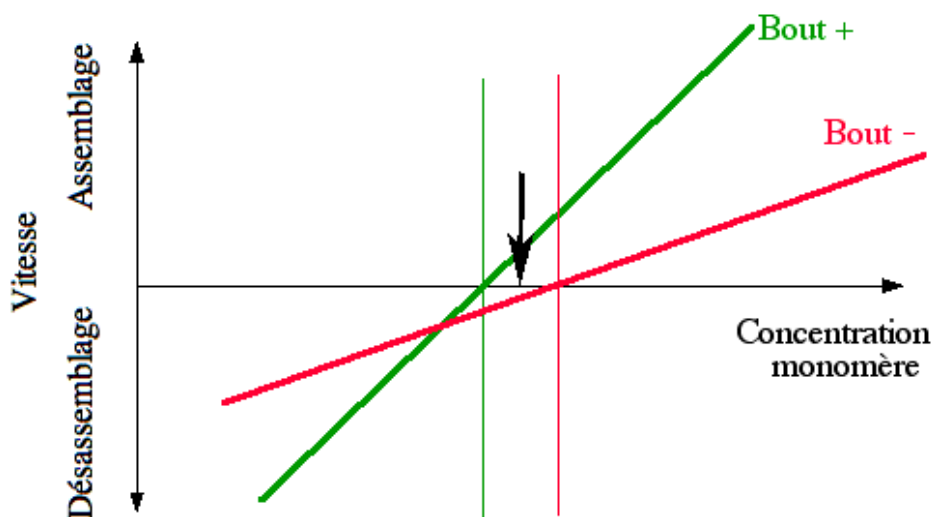
Afin de mieux comprendre ce processus de polymérisation, des microtubules sont polymérisés in vitro en présence de fragments d'axonèmes de cils (ou de flagelles). L'apparition des microtubules est suivie en microscopie électronique. À mesure que l'on augmente la concentration initiale de la tubuline libre, on observe, après un même temps d'incubation, les figures suivantes (où le rectangle représente le fragment d'axonème et les filaments représentent les microtubules néoformés).



Q5 : Quelle(s) conclusion(s) tirez-vous en ce qui concerne les propriétés des deux extrémités des axonèmes et des microtubules qui les constituent ?

En diluant brutalement la concentration des solutions de tubuline dans lesquelles on a réalisé les expériences de polymérisation précédentes, on peut obtenir, soit le ralentissement de la croissance des microtubules, soit le raccourcissement ou même la disparition complète des microtubules formés au cours de la première étape. Même en concentration très faible de tubuline après dilution, on n'obtient jamais la disparition des fragments d'axonèmes

Avec cette technique, on peut donc mesurer aussi bien une vitesse d'allongement des microtubules qu'une vitesse de raccourcissement, pour une concentration initiale de tubuline donnée. L'ensemble des résultats est résumé dans le graphe suivant, dans lequel on distingue les microtubules des deux extrémités des fragments d'axonèmes (notées + et -).



Q6 : Localiser sur ce graphe les différentes situations représentées par les 5 schémas précédents.

Q7 : Pourquoi les amorces axonémales initiales ne peuvent-elles pas disparaître, même à des concentrations très faibles de tubuline libre ?

Q8 : Si l'on envisage maintenant le cas de microtubules individuels obtenus dans une expérience d'autoassemblage in vitro, que se passe-t-il à leur niveau pour la concentration remarquable de tubuline libre indiquée par la flèche ?

Q9 : Comment appelle-t-on ce phénomène ?

TD Signalisation 1 et 2

EXERCICE 1

L'EGF (epidermal growth factor) est un facteur de croissance qui stimule la prolifération de très nombreuses cellules normales ou tumorales, en se fixant sur un récepteur à activité tyrosine kinase présent à leur surface. La liaison de l'EGF à son récepteur provoque la dimérisation et la phosphorylation de ce dernier.

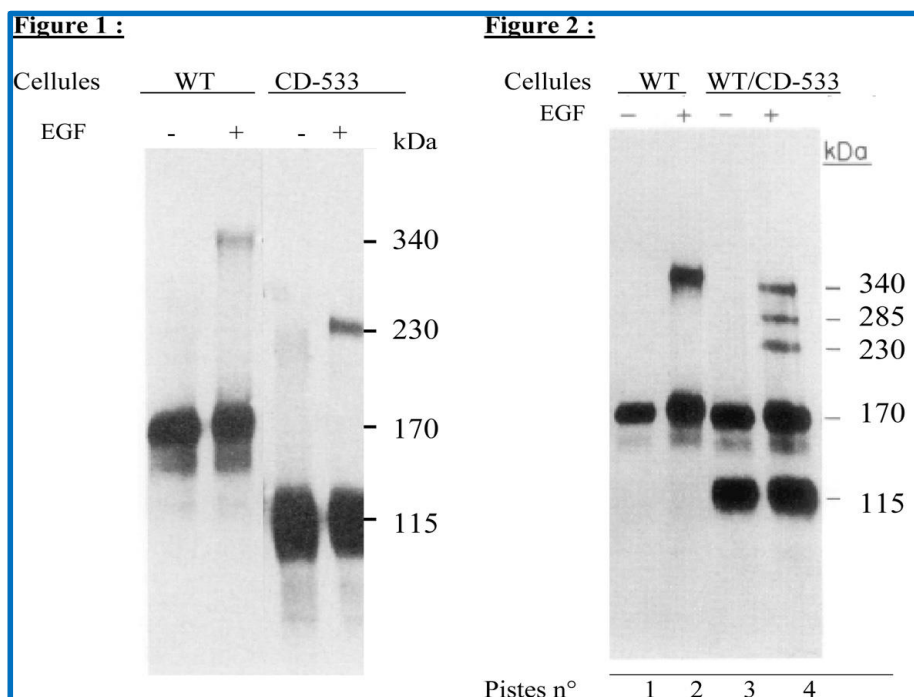
On a délété, par génie génétique, la partie du gène qui code le domaine cytoplasmique du récepteur à l'EGF (EGFR). Des cellules (fibroblastes), qui n'expriment pas le récepteur endogène, ont été transfectées par des plasmides qui dirigent l'expression de :

- l'EGFR normal, seul : **cellules WT**
- ou l'EGFR dans lequel tout le domaine cytoplasmique a été délété : **cellules CD-533**
- ou des deux protéines ci-dessus simultanément dans un rapport 1:1 : **cellules WT/CD-533**.

Les **cellules WT** et les **cellules CD-533** sont incubées en présence de ^{35}S -méthionine pendant 16 heures. Elles sont ensuite activées par l'EGF puis traitées avec un réactif (EDAC) qui permet de lier de façon stable (liaison covalente) deux protéines qui entrent en contact étroit. Les protéines membranaires sont ensuite préparées, puis on effectue une immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps anti-EGFR. Les protéines ainsi purifiées sont soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Une autoradiographie du gel est ensuite effectuée (figure 1).

Q1 - Que représentent les bandes de 340 et 230 kDa au niveau du gel ?

Q2 - Dans quelle condition expérimentale peut-on les observer ? Pourquoi ?



Une expérience similaire est effectuée avec des **cellules WT** et des **cellules WT/CD-533**. L'autoradiographie obtenue est présentée sur la figure 2.

Q3 - Que représente la bande de 285 kDa présente dans la dernière piste du gel (piste n°4)?

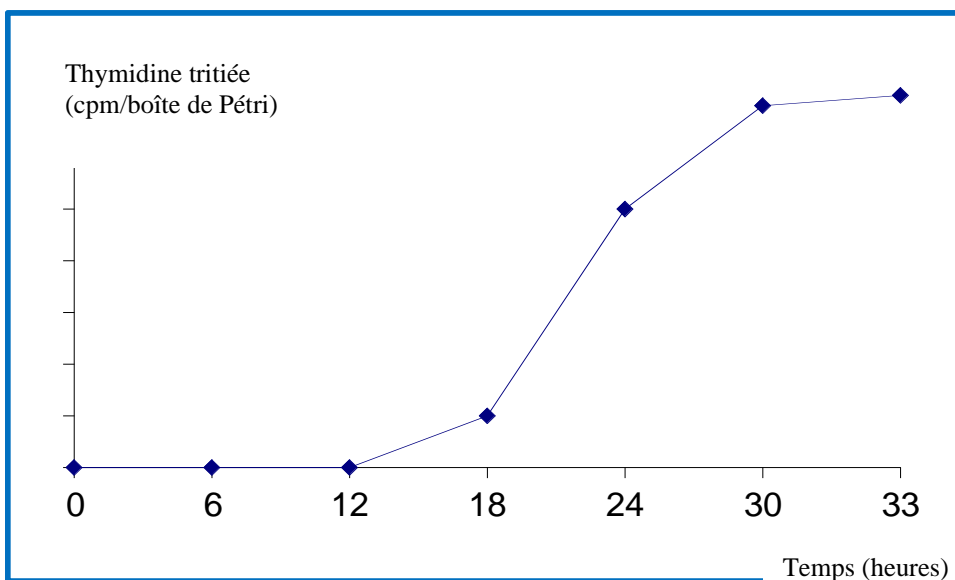
Les **cellules WT** ensemencées dans des boîtes de Pétri, sont cultivées en présence de sérum de veau (S.V.F.) jusqu'à ce qu'elles atteignent 50% de confluence. Elles sont ensuite privées de S.V.F. pendant 6 heures puis incubées en présence d'EGF et de thymidine tritiée pendant 30 heures. Après différents temps d'incubation, les cellules sont lysées et les macromolécules précipitées par l'acide trichloracétique. La radioactivité associée à ces macromolécules est alors mesurée. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 3.

Q4 - Quelle est la fonction évaluée par l'incorporation de thymidine radioactive ?

Q5 - Commentez la figure 3.

Q6 - Pourquoi a-t-on privé les cellules de S.V.F. avant de les incuber avec l'EGF ?

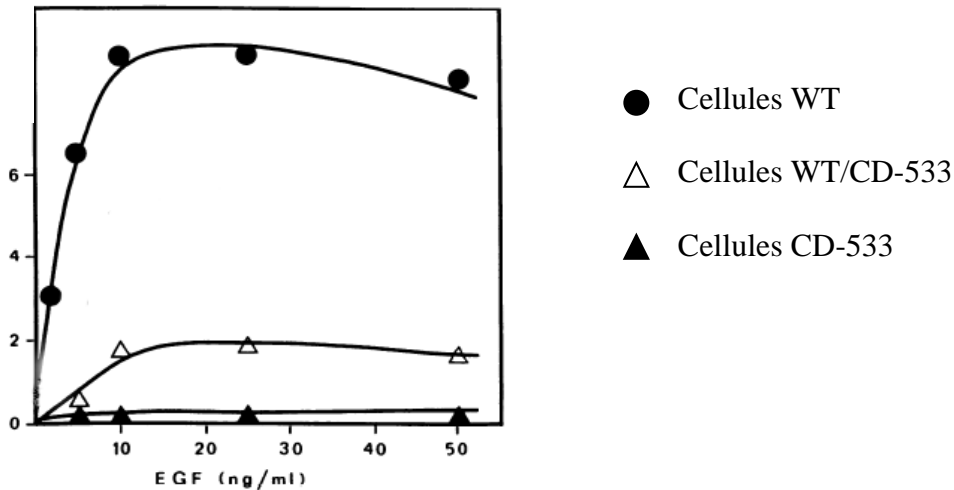
Figure 3:



Les **cellules WT, CD-533 et WT/CD533** ont été incubées pendant 30 heures en présence de différentes concentrations d'EGF et de thymidine tritiée. Les cellules sont ensuite lysées puis les macromolécules précipitées par l'acide trichloracétique. La radioactivité des molécules précipitées est alors mesurée. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 4.

Figure 4 :

Incorporation de thymidine tritiée (Unité arbitraire)



Q7 - Commentez la figure 4.

Q8 - Proposez une hypothèse pour expliquer l'effet du récepteur délété de son domaine cytoplasmique.

Q9 - Détaillez une des voies de signalisation mises en jeu par le récepteur activé, et dont une conséquence est la fonction cellulaire mise en évidence par l'incorporation de thymidine radioactive.

EXERCICE 2

Les récepteurs β -adrénergiques, sont des récepteurs à sept segments transmembranaires, qui se trouvent au niveau du foie, du cœur, des muscles lisses, des globules rouges.... Un de leur ligand est l'adrénaline. Cette hormone a différents effets : stimulation de la dégradation du glycogène en glucose au niveau du foie, augmentation de la contraction des cellules musculaires cardiaques....

Afin d'obtenir des informations sur les domaines du récepteur impliqués dans la transduction du signal, on a construit des récepteurs chimériques entre 2 types de récepteurs : le récepteur β -adrénergique et le récepteur α -adrénergique. Les deux types de récepteurs peuvent être stimulés par l'adrénaline mais le récepteur β -adrénergique stimule l'adénylate cyclase, alors que le récepteur α -adrénergique l'inhibe. Des cellules de mammifères ont été transfectées de façon stable avec l'une des constructions ci-dessous. Des expériences préalables ont montré que tous les récepteurs chimériques pouvaient lier l'adrénaline. La capacité de chacun des récepteurs à stimuler l'adénylate cyclase, après stimulation par l'adrénaline, a alors été mesurée (figure A ci-dessous).

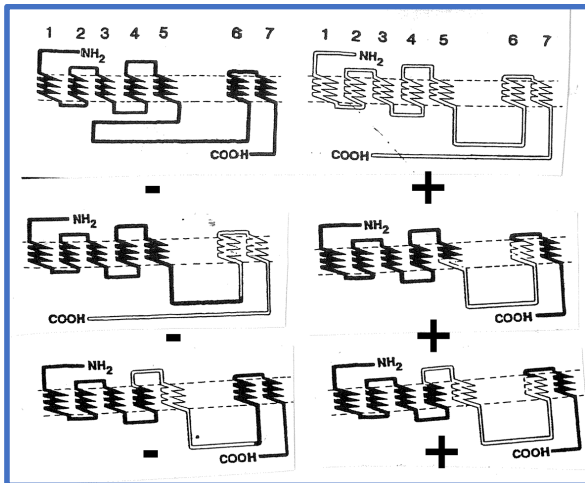


FIGURE A

En noir : partie appartenant au récepteur β -adrénergique
 En blanc : partie appartenant au récepteur β -adrénergique
 + : stimule l'adénylate cyclase
 _ : pas de stimulation de l'adénylate cyclase

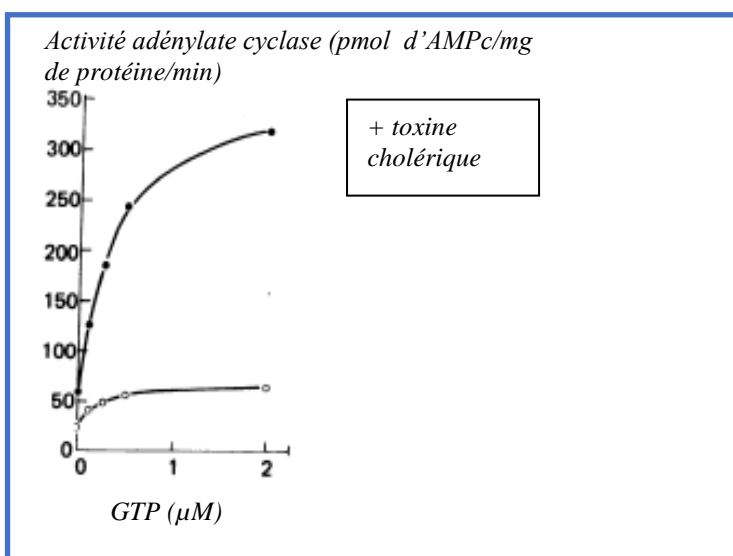
Q1-Quelle est l'action de l'adénylate cyclase ? Que déduisez-vous de ces résultats?

Q2-Quelle protéine peut se lier au récepteur β -adrénergique et aller stimuler l'adénylate cyclase ?

Il a été montré que cette protéine pouvait être modifiée par la toxine cholérique (toxine sécrétée par l'agent du choléra *Vibrio Cholerae*). Afin de savoir comment agit cette toxine, on effectue les expériences suivantes sur des membranes d'érythrocytes, traitées par un agoniste des récepteurs β -adrénergiques, en présence d'extraits cytosoliques et des constituants nécessaires aux expériences.

Dans une première expérience, la production d'AMP_c par l'adénylate cyclase au niveau des membranes d'érythrocytes est mesurée en fonction de la concentration en GTP et en présence ou en absence de toxine cholérique. Les résultats sont présentés dans la figure ci-dessous (figure B).

FIGURE B :



Q3. Commentez ces résultats.

On mesure ensuite l'hydrolyse du GTP au niveau des membranes d'érythrocytes, suite à la stimulation des récepteurs β -adrénergiques en fonction de la concentration en GTP et en présence ou en absence de toxine cholérique (figure C ci-dessous).

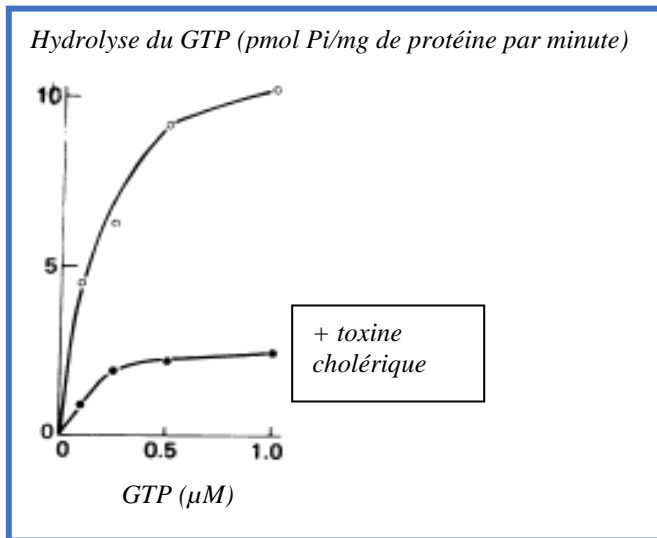


FIGURE C

Q4. Dans quel but mesure-t-on l'hydrolyse du GTP ? Quel est l'effet de la toxine cholérique sur cette hydrolyse ?

Q5. D'après vos connaissances et ces résultats, proposez une hypothèse pour expliquer l'action de la toxine cholérique.

Q6. Connaissez-vous une protéine dont l'activation dépend de la concentration en AMP_c ?

EXERCICE 3

La stimulation par l'EGF de cellules épithéliales rénales d'origine canine, les cellules COS-7, induit l'acquisition par ces dernières d'un phénotype mésenchymateux (augmentation de la prolifération et acquisition d'un phénotype migratoire). Parmi les enzymes intracellulaires activées suite à la fixation de l'EGF sur son récepteur, figure la Phospholipase C β (PLC β). L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de la PLC β ou la déplétion des cellules COS-7 en PLC β à l'aide de petits ARNs interférents (siRNAs) bloque la migration et la prolifération cellulaires normalement induite par l'EGF.

On souhaite déterminer si l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'EGF est nécessaire à l'activation de la PLC β . Dans ce but, une mutation est introduite, par mutagenèse dirigée, dans l'ADNc qui code pour le récepteur de l'EGF. Cette mutation conduit au remplacement d'un résidu lysine, situé dans le site de liaison de l'ATP, par un résidu alanine ($^{721}K \rightarrow ^{721}A$). Le récepteur mutant ainsi obtenu ne peut plus fixer l'ATP. Son activité kinase est donc abolie.

Des fibroblastes ne possédant pas de récepteurs de l'EGF endogènes, sont transfectés de façon

stable avec un plasmide qui permet soit l'expression de l'ADNc muté, soit l'expression de l'ADNc normal (dit « sauvage »). Deux clones de cellules appelés « K721A » et « WT » et exprimant respectivement le récepteur muté et le récepteur normal sont ainsi isolés.

Dans un premier temps, des membranes plasmiques préparées à partir de fibroblastes non transfectés (NT), de cellules WT et de cellules K721A sont incubées en présence (+) ou en absence (-) d'EGF. De l'ATP radioactif, marqué au ^{32}P , est ensuite ajouté au milieu réactionnel. Après 30 minutes d'incubation, les récepteurs de l'EGF sont immunoprécipités à l'aide d'un anticorps qui reconnaît aussi bien la forme WT que la forme K721A. Ils sont ensuite soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. Cette dernière est :

- soit soumise à une autoradiographie (pour détecter les protéines radioactives),
 - soit incubée successivement avec un anticorps anti-EGFR et un anticorps secondaire couplé à la peroxydase du raifort. Les complexes « récepteur de l'EGF/Anticorps anti-EGFR/Anticorps secondaire » formés sont ensuite détectés par chimioluminescence (Western blot).
- Les résultats obtenus sont présentés dans la figure ci-dessous.

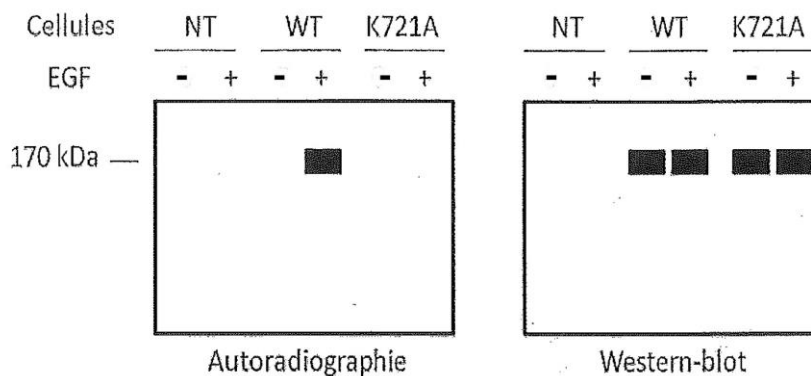


Figure 1

Q1. Décrivez et expliquez les résultats obtenus. A quoi correspondent les bandes figurant sur l'autoradiographie (à gauche) et l'immunoblot (à droite). Que devient l'ATP radioactif ajouté au milieu de culture ? A quoi sert la condition NT? De quelle manière la liaison de l'EGF affecte-t-elle les propriétés du récepteur ?

2) Des cellules WT et K721A ont été incubées avec (+) ou sans (-) EGF avant d'être lysées dans des conditions **non dénaturantes**. On a ensuite immunoprécipité la PLC γ ou les récepteurs de l'EGF présents dans les lysats obtenus à l'aide d'anticorps spécifiques (anti-PLC γ ou anti-EGFR) liés à des billes de sépharose.

Les protéines immunoprécipitées ont été séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Finalement, la membrane a été incubée avec les anticorps indiqués (anti-phosphotyrosines, anti-PLC γ ou anti-EGFR), **préalablement marqués avec de l'iode radioactif**.

Après élimination, par des lavages successifs, des anticorps radioactifs non liés à la membrane, celle-ci a été soumise à une autoradiographie dont le résultat est présenté dans la figure ci-dessous. Les anticorps anti-phosphotyrosines (anti-Ptyr) reconnaissent tous les résidus phosphotyrosines, quelle que soit la séquence de la protéine qui les contient.

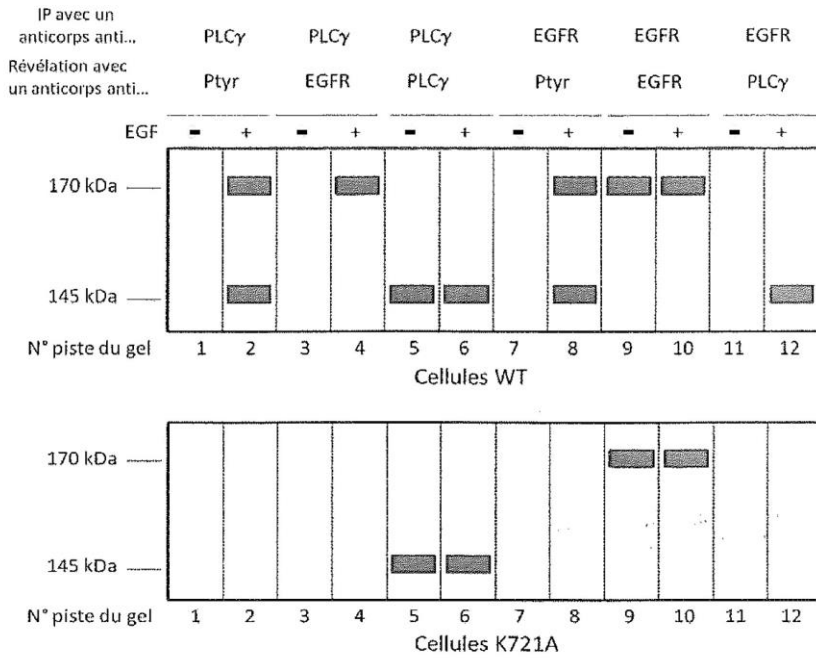


Figure 2

Q2. Pourquoi est-il important de préciser que la lyse des cellules a été réalisée dans des conditions non dénaturantes ?

Q3. Décrivez et expliquez les résultats obtenus (pensez à indiquer, pour chaque condition, quelle est la protéine précipitée, quelle est ou quelles sont la(les) protéine(s) détectée(s), dans quelles conditions les complexes protéiques identifiés se forment).

Q4. Que déduisez-vous des résultats présentés dans la figure 2 ?

3) Dans un troisième temps, on utilise une méthode qui permet de mesurer en continu la concentration des ions Ca^{2+} libres dans le cytosol de cellules vivantes exprimant la forme sauvage (WT) ou la forme mutée (K721A) du récepteur de l'EGF. L'EGF a été ajouté dans les milieux de culture à $t=1$ min. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure ci-dessous (figure 3).

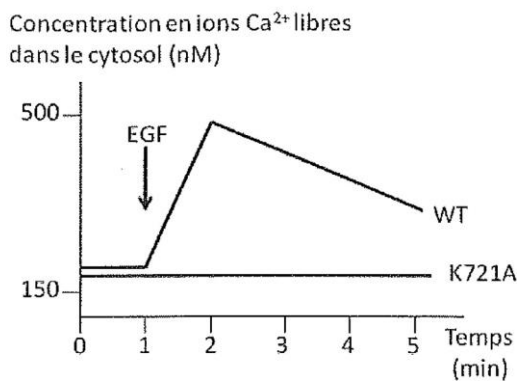


Figure 3

Q5. Pourquoi s'intéresse-t-on à la mesure de la concentration des ions Ca^{2+} libres dans le cytosol ? Décrivez les résultats obtenus ? Qu'en déduisez-vous ?

4) La structure de la PLC β est présentée dans la figure 4 ci-dessous.



Figure 4

Q6. En vous aidant des informations supplémentaires fournies dans la figure 4, récapitulez les différentes étapes qui conduisent à l'activation de la PLC β par l'EGF.

5) On a construit, par génie génétique, un ADNc codant seulement pour les domaines SH2 et SH3 de la PLC β (figure 5).

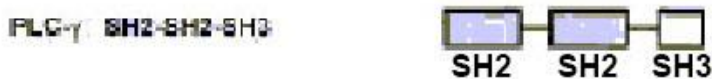


Figure 5

On a produit et purifié cette protéine puis on l'a microinjectée dans des cellules MDCK (de rein de chien) sensibles à l'EGF. On a ensuite cultivé les cellules pendant 24h dans un milieu contenant de la bromodésoxyuridine (BrdU), un analogue de la thymidine, et de l'EGF et en présence ou en absence d'analogues de l' IP_3 et du DAG capables de diffuser à travers les membranes biologiques. Après 24h, on a fixé les cellules et on a procédé à une double immunofluorescence permettant de révéler en rouge le BrdU et en vert la protéine micro-injectée (figure 6). Pour chaque condition, on a compté le nombre de cellules vertes et non vertes (c'est à dire contenant ou non la protéine PLC β -SH2-SH2-SH3) ayant incorporé du BrDU (figure 6).

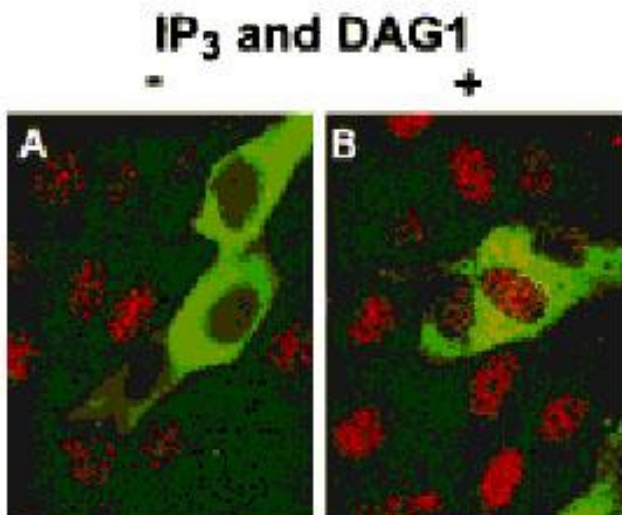


Figure 6 : incorporation de la BrDU, stimulée par l'EGF, dans les cellules microinjectées ou non avec la protéine PLC β -SH2-SH2-SH3 en absence (panel A) ou en présence (panel B) d'analogues membrane-perméants de l' IP_3 et du DAG.

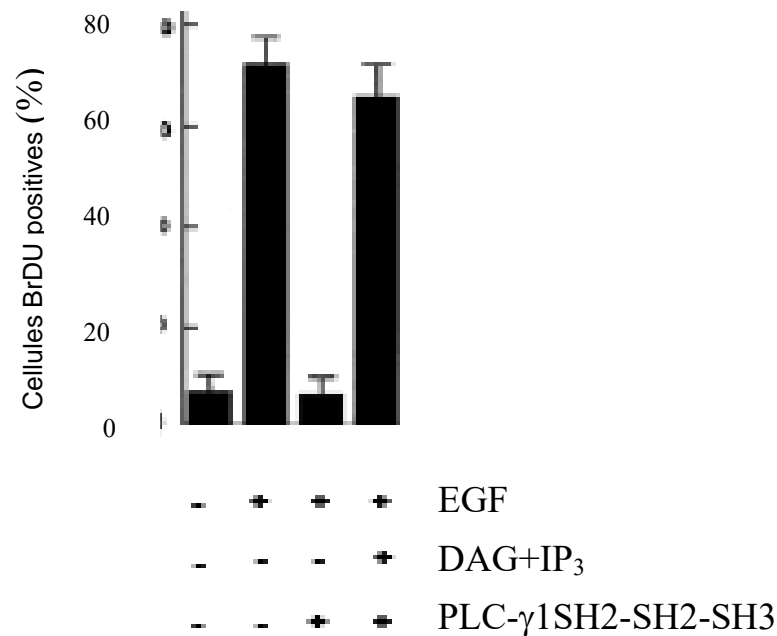


Figure 6: Dénombrement des cellules BrDU positives, après stimulation ou non par l'EGF.

Q7. Quels sont les compartiments cellulaires « colorés » en rouge et en vert ? Ces localisations subcellulaires étaient-elles prévisibles ? Justifiez votre réponse. Pourquoi toutes les cellules n'apparaissent-elles pas vertes ?

Q8. La production de DAG et d'IP₃ sont-elles nécessaires pour que l'incorporation de la BrDU ait lieu?

Q9. Pourquoi l'expression de la PLC- γ tronquée permet-elle de neutraliser l'activité de la PLC γ endogène?

Q10. Quelle est la fonction évaluée par l'incorporation de BrDU ?

Q11. Quelle est l'autre voie de signalisation qui, lorsqu'elle est activée, stimule l'incorporation de BrDU?

TD Cycle Cellulaire

Dans le but d'améliorer les traitements de cancers actuellement résistants, on recherche de nouvelles molécules capables d'arrêter la croissance des cellules tumorales. L'une des molécules actuellement testées est le 1R,2R-diaminocyclohexane (trans-diacetato) (dichloro)platine(IV) ou DAP, dérivé du cisplatine (qui est lui déjà utilisé en traitement clinique). Le DAP et le cisplatine forment des complexes avec l'ADN et provoquent des coupures dans l'ADN. Il a été démontré précédemment que le DAP est efficace contre une grande variété de tumeurs résistantes à l'action du cisplatine. Il est donc intéressant de comprendre les mécanismes d'action spécifiques du DAP vis-à-vis des cellules tumorales.

EXPERIENCE 1- Des cellules de la lignée de carcinome ovarien humain A2780 sont cultivées *in vitro* dans du milieu RPMI-1640 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal. A t=0, le milieu de culture est éliminé et remplacé par du milieu frais additionné de 0,6 μM de DAP. Après différents temps d'incubation, des cellules sont prélevées, et le contenu en ADN de chacune d'elles est déterminé par la technique de cytométrie en flux (Figure 1).

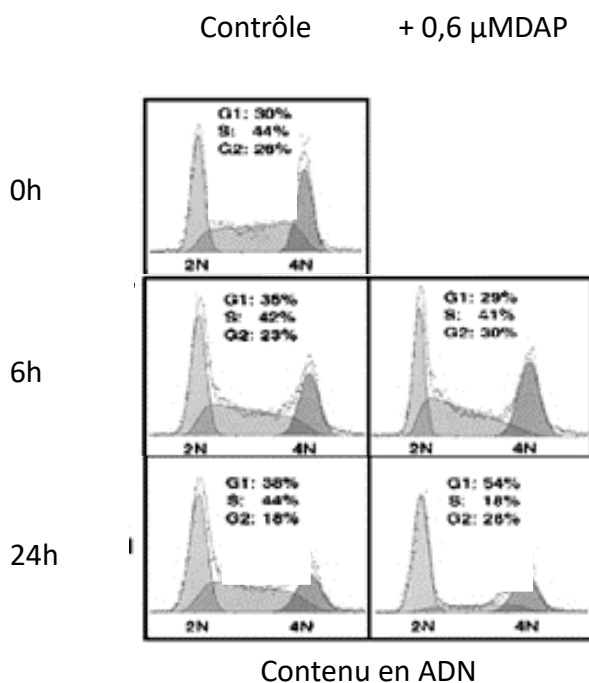


Figure 1 : après récolte, les cellules A2780 sont lavées au PBS puis incubées dans du PBS contenant 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'iodure de propidium et 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNase A pendant 15 minutes, puis le contenu en ADN des cellules est analysé dans un cytomètre en flux.

Question 1 : Quel est l'effet du DAP sur les cellules de la lignée A2780 ?

Question 2 : Dans ces expériences, les cellules sont cultivées à une confluence inférieure à 10%. En présence d'un colorant, le bleu trypan, seules 1 à 2% des cellules incorporent celui-ci. De plus, des contrôles réalisés sur les mêmes échantillons ont montré que l'ADN des cellules n'est pas fragmenté, et que la composition en phosphatidylsérine de leur membrane externe n'est pas modifiée. Que pouvez-vous en conclure ?

EXPERIENCE 2- Pour préciser le mode d'action du DAP, des cellules A2780 sont traitées par 0,6 μM de DAP selon le protocole précédent, puis les cellules sont récoltées après différents temps d'incubation. Les cellules sont lysées, puis on réalise une immunoprécipitation en présence d'un anticorps spécifique anti-cdk2 (masse moléculaire de cdk2 : 34 kDa). L'immunoprécipité est ensuite

incubé *in vitro* en présence de protéine pRB purifiée (105 kDa), et de 0,5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ dans un tampon approprié. Après 30 minutes d'incubation à 30°C, ce mélange est déposé sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE, et le gel est autoradiographié (Figure 2).

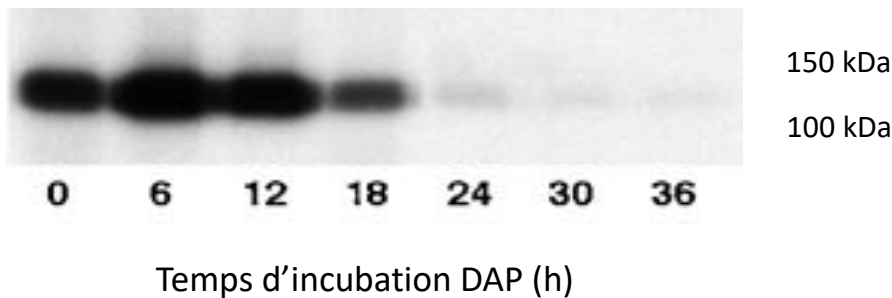
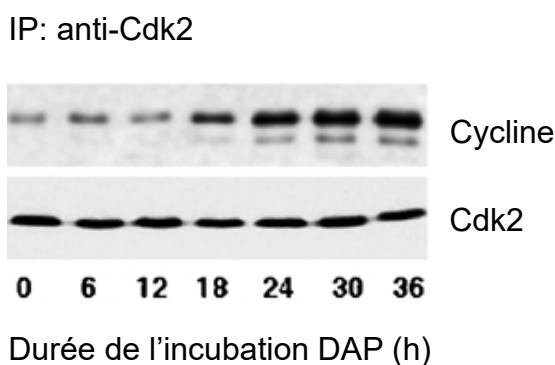


Figure 2 : Analyse de l'incorporation de ^{32}P par autoradiographie après SDS-PAGE

Question 3 : Quelles informations apporte ce résultat sur le mode d'action du DAP ?

EXPERIENCE 3- Les immunoprécipités réalisés avec un anticorps spécifique anti-cdk2 obtenus dans l'expérience précédente sont déposés sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE, et analysés en Western-blot à l'aide d'anticorps anti-cdk2 et anti-cycline E (figure 3)

Figure 3



Question 4 : Analyser ces résultats : pourquoi la cycline E peut-elle être détectée dans cette expérience, et quelle hypothèse peut-on formuler en rapportant ces résultats à ceux de l'expérience 2 ?

EXPERIENCE 4- Des cellules A2780 ont à nouveau été incubées dans les mêmes conditions expérimentales en présence de DAP, puis lysées après différents temps; les lysats ont été immunoprécipités soit par un anticorps anti-cdk2 (figure 4A), ou anti-cycline E (fig. 4B), puis analysées par western-blot avec les anticorps indiqués.

A : IP anti-cdk2

B : IP anti-cyclin E

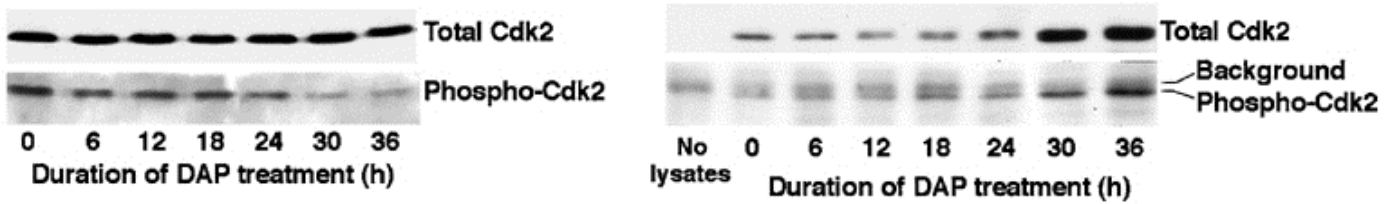


Figure 4 : (A) lysats *immunoprécipités* par anti-cdk2, western-blot réalisé avec des anticorps anti-cdk2 et anti-phosphotyrosine. (B) ; Immunoprécipitation anti-cycline E, Western blot : anti-cdk2, anti phospho-cdk2 (Thr160).

Question 5 : D'après vos connaissances, quel est l'impact des phosphorylations détectées sur l'activité de cdk2 ?

Question 6 : Analyser et interpréter ces résultats.

EXPERIENCE 5- De nouvelles cellules A2780 sont traitées par 0,6 μ M de DAP; à partir de ces cellules on prépare soit des lysats qui sont analysés par western-blot (figure 5A), soit l'ARN total des cellules est extrait et analysé par Northern-blot (fig. 5B), soit les cellules sont incubées en présence de DAP et/ou cycloheximide, puis un lysat protéique est immunoprécipité par un anti-cdk2 (fig.5C)

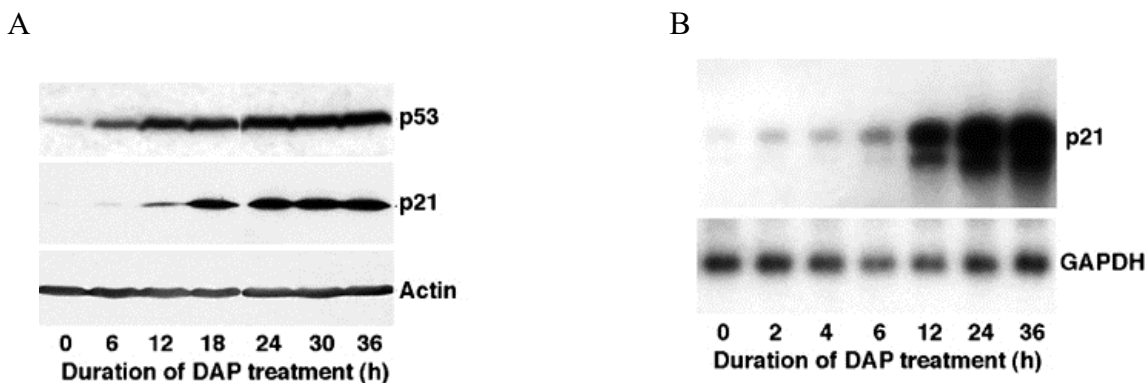


Figure 5 : (A) Lysats protéiques préparés après différents temps d'incubation de cellules A2780 analysés par western-blot avec des anticorps anti-p53, anti-p21, et anti-actine. (B) les ARN extraits des cellules A2780 ont été analysés par Northern-blot en utilisant des sondes d'ADNc marquées radioactivement 32 P-p21 et 32 P-GAPDH, suivi d'une autoradiographie. (C) Les lysats de cellules A2780 immunoprécipités par un anticorps anti-cdk2 puis analysés par western-blot anti-cdk2, anti-Cycline E et anti-p21. Les immunoprécipités ont parallèlement été incubés en présence d'histone H1 recombinante et de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, incubés dans les conditions appropriées, déposés sur SDS-PAGE avant autoradiographie.

Question 7 : Quelle est l'influence du DAP sur les protéines p53 et p21 ? D'après vos connaissances, reconstituez la séquence des événements qui se déroulent.

Question 8 : Quelle information supplémentaire apporte le traitement par la cycloheximide des cellules concernant la régulation de l'activité du complexe cdk2-cycline E ?

EXPERIENCE 6- Afin de préciser le rôle de la protéine p21, des lysats protéiques de cellules A2780 incubées en présence de 0,6 μ M de DAP sont immunoprécipités par des anticorps anti-cdk2 ou anti-cycline E puis analysés par western-blot avec un anticorps spécifique anti-p21.

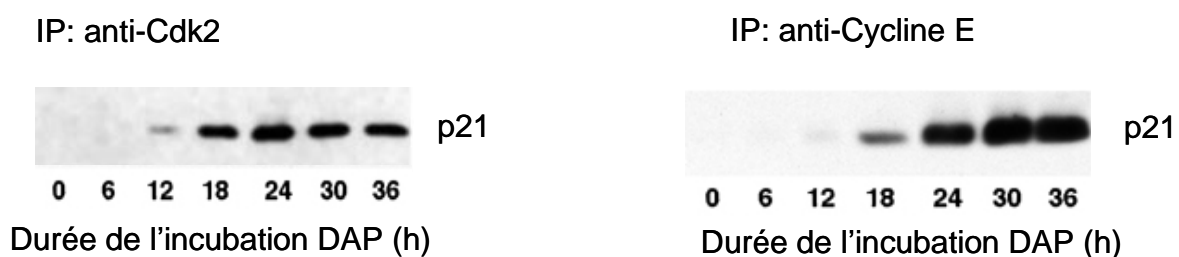


Figure 6: Analyse par western-blot d'immunoprécipités anti-cdk2 (panel de gauche) ou anti-cycline E (droite)

Question 9 : pouvez-vous préciser le mode d'action de p21 sur le complexe cycline-cdk ?

Question 10 : En vous appuyant sur les résultats de ces expériences, récapitulez dans un schéma le mécanisme d'action du DAP sur le cycle cellulaire.

TD sénescence

Expérience 1 :

Au cours des années 60, au moment du développement des premières cultures cellulaires *in vitro*, les chercheurs s'attendaient à obtenir une croissance illimitée des cellules. Les résultats qui ont été obtenus sont rappelés dans les figures ci-dessous :

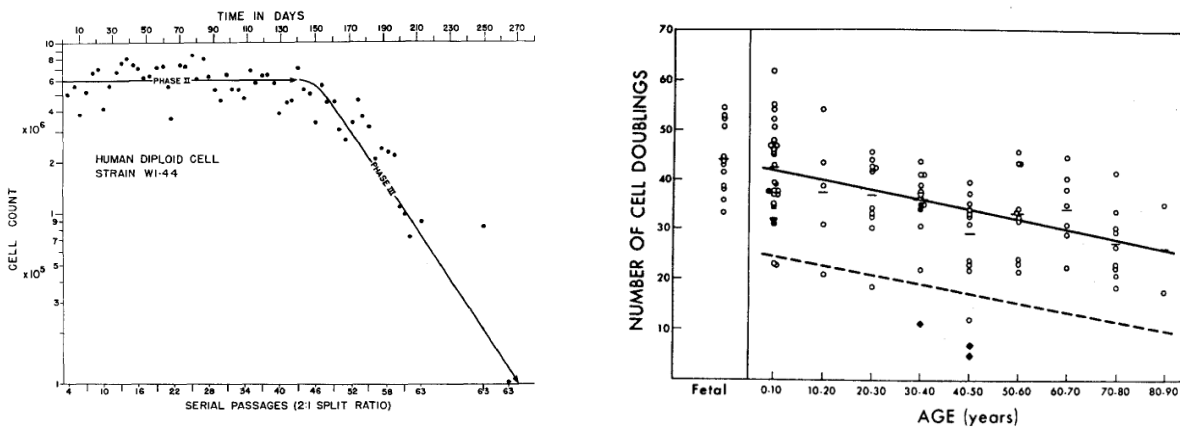


Figure 1 : A/ Cell counts determined at each passage of human foetal fibroblast every four days for split ratios 1: 2. Total cell counts are plotted as a function of time in days and actual passages. B/ Cumulative number of cell doublings achieved by human skin fibroblast cultures plotted as a function of the age of the donor.

Q1 Les résultats de la figure 1A confirment-ils cette hypothèse ?

Q2 Les résultats de la figure 1B sont-ils concordants avec ceux des cultures de cellules fœtales ?
Quelle explication pouvez-vous donner à ces observations

Q3 : comment nomme-t-on le phénomène observé ici ?

Expérience 2 :

Plus récemment, des chercheurs ont observé que des cellules tumorales sont capables d'échapper au phénomène observé ci-dessus. Des fibroblastes issus d'une tumeur mammaire ont été mis en culture, puis séparés en 4 sous-cultures distinctes après 40 cycles de doublement.

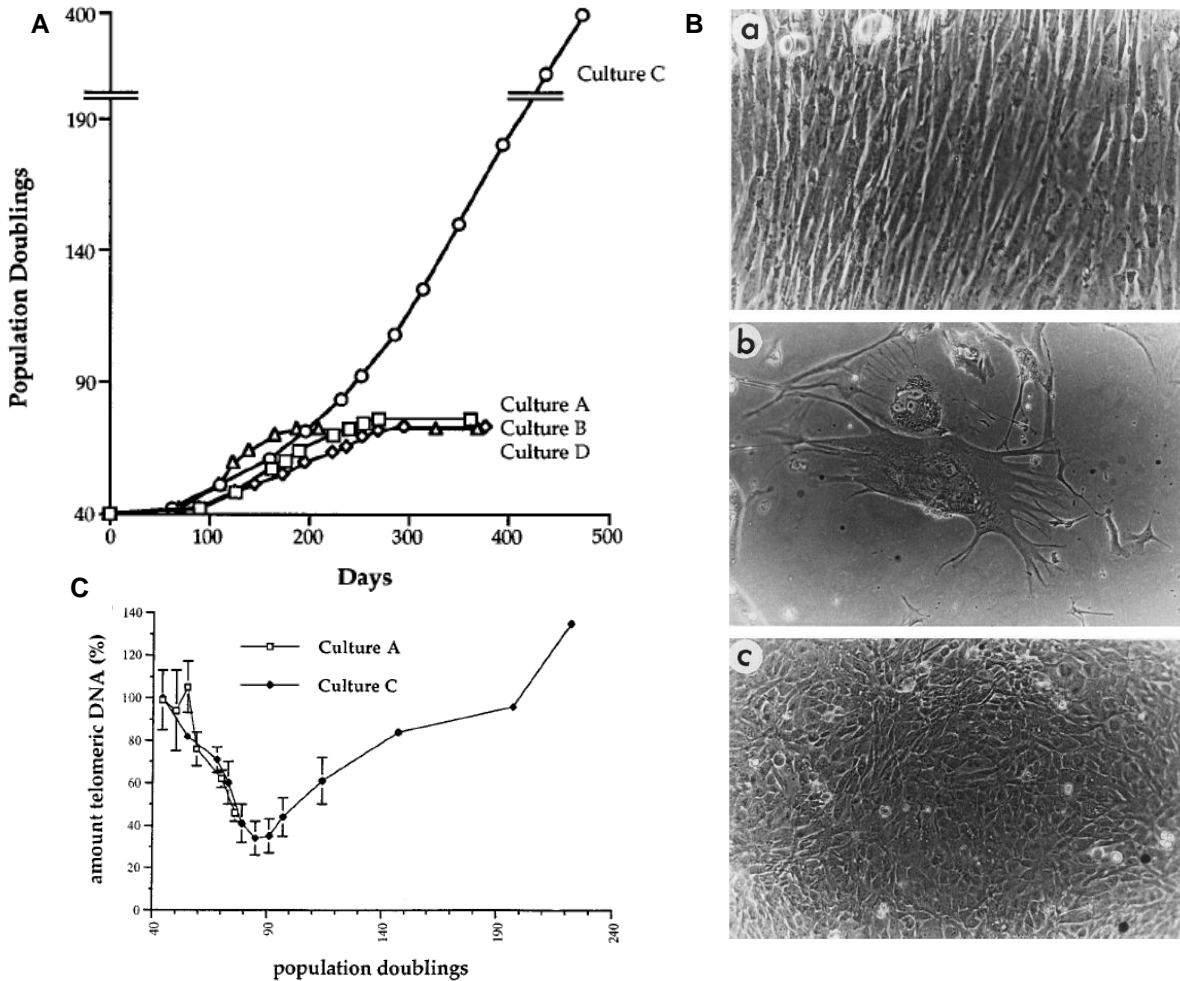


Figure 2 : **A/** Growth kinetics of breast cancer isolated fibroblast; Four Cell (A, B, C, and D) lines were subcultured separately and continuously in vitro commencing at PD 40. **B/** Morphology of i) Presenescent cells (PD 4); cells within the crisis cultures (b; culture A, PD 74) and ii) Immortalized culture C cells (c; PD 145). Magnifications: (a and b) x140; (c) x70. **C/** Mean amount of telomeric DNA culture A and C during continuous passaging in vitro. DNA was extracted at the PD indicated and digested with restriction enzymes *HinfI* and *RsaI*. One microgram of DNA was separated by electrophoresis on a 0.8% agarose gel and hybridized to a telomeric oligonucleotide probe [g32P(TTAGGG)₃]. Autoradiographs from three independent gels for PD were scanned. The amount of telomeric DNA was quantified by densitometry and expressed as a percentage of control culture C PD 44. Bars indicate standard errors of the means.

Q4 : Décrivez les différentes phases de croissance observées pour les 4 cultures et proposez des hypothèses les expliquant.

Q5 : Analysez les différences morphologiques observées sur la figure 2B.

Q6 : D'après la figure 2C, suggérez une explication des différences relevées entre la culture C et les autres cultures.

Les cellules sénescents subissent une forme irréversible d'arrêt du cycle cellulaire. Néanmoins elles restent viables et métaboliquement actives. Des travaux récents suggèrent que les cellules sénescents possèdent des fonctions physiologiques et physiopathologiques. CCN1 est une protéine associée à la matrice extracellulaire. Elle participe à la régulation de nombreuses fonctions cellulaires (adhésion et migration des cellules, différenciation et survie).

CCN1 semble jouer un rôle important dans la cicatrisation des blessures, selon un mécanisme encore inconnu. Celle-ci se décompose en plusieurs phases : une phase inflammatoire précoce, qui stimule l'accumulation de fibroblastes produisant massivement de la matrice extracellulaire. Dans une phase plus tardive, on observe au contraire une dégradation de la matrice, nécessaire à la régénération du tissu.

Expérience 3 :

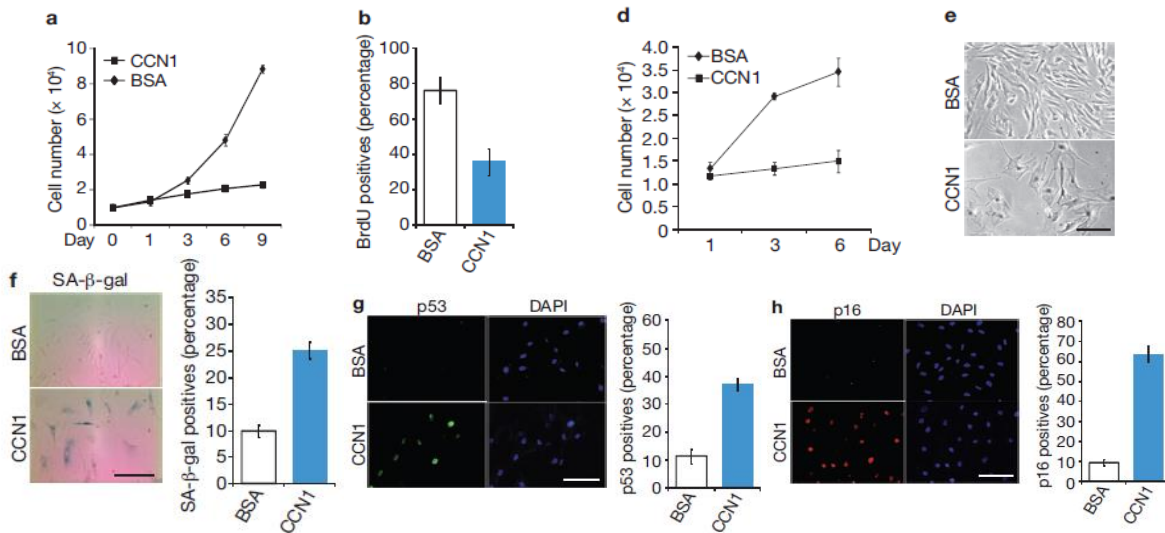


Figure 3 : Young human BJ fibroblasts were treated with purified recombinant CCN1 protein ($2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$). (a) Cells grown in the presence of BSA or CCN1 for the indicated days were counted using a haemocytometer. (b) After indicated treatments for 3 days, cells were subjected to BrdU incorporation assay: BrdU-positive cells were counted and expressed as percentages of total cell number in ten randomly selected fields. (d) Cells were treated with CCN1 or BSA for 6 days, harvested by trypsinization and re-plated in full growth media. Cell proliferation was monitored by counting cell numbers on indicated days after re-plating. (e) Morphology of cells treated with CCN1. (f) SA-β-gal assay was performed and representative photomicrograph (left) and quantification (right) are shown. (g, h) Cells were subjected to immunofluorescence microscopy staining for p53 (g) or p16INK4a (h); DAPI was used for counterstaining. Quantifications are shown on the right panels. Data represent mean \pm s.d. of triplicate experiments. Scale bars, 100 μm .

Q7 : D'après la figure 3a) Quel est l'effet du CCN1 sur les fibroblastes humains.

Q8 : Quelle information nous apporte la figure 1b? Quelle(s) expérience(s) complémentaire(s) faudrait-il faire pour confirmer cette observation.

Q9 : Que nous apportent les résultats les figures 1d et 1e ?

Q10 : Que sont la SA-beta galactosidase, p53 et p16? Que nous indique leur surexpression ?

Expérience 4

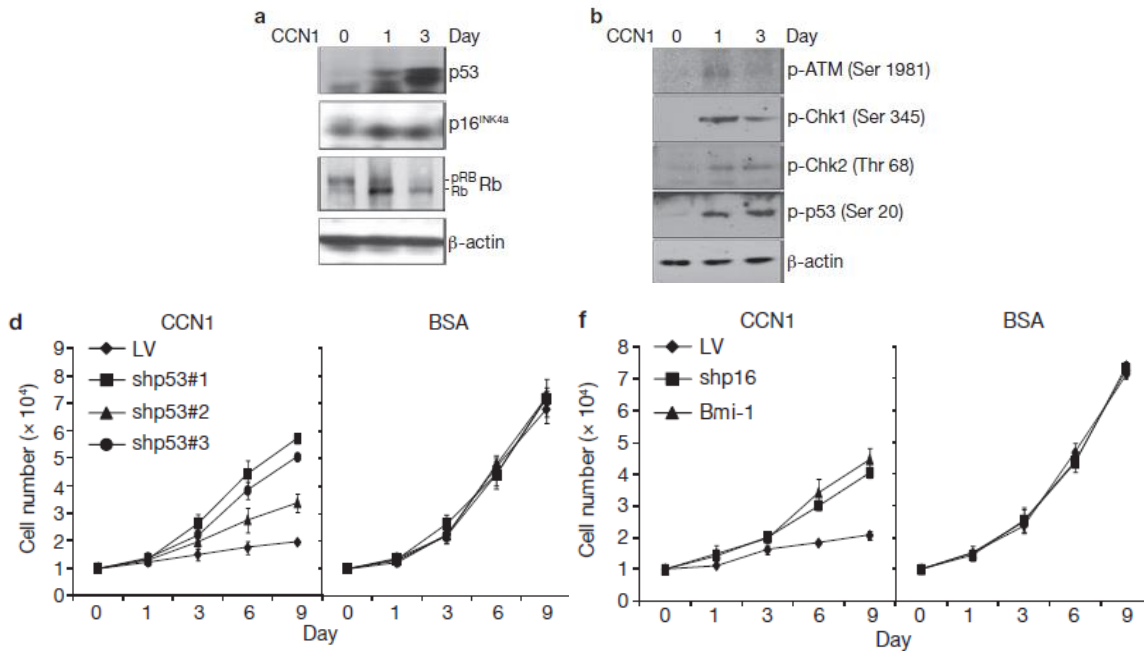


Figure 4 (a, b) BJ cells were treated with CCN1 for the indicated times. Expression of p53, p16INK4a, pRb and β-actin (a) and proteins involved in DNA damage response pathways (b), including phosphorylated forms of ATM (Ser 1981), Chk1 (Ser 345), Chk2 (Thr 68) and p53 (Ser 20), were detected by immunoblotting. (d) Cells were infected with three independent lentiviruses driving shRNAs against p53 (shp53#1, #2 and #3). Cells infected with empty lentivirus (LV) were used as controls. (d) Cells infected were treated with either CCN1 or BSA and cell numbers counted at indicated days. (f) Cells were infected with lentivirus expressing Bmi-1 or shRNA against p16INK4a, treated with either CCN1 or BSA and cell numbers counted. Experiments were done in triplicates and data presented as means ± s.d.

Q11 D'après vos connaissances, rappelez le rôle des différentes protéines étudiées en 4a et 4b. Interprétez ces figures.

Q12 : Décrire la technique utilisée en 4d et 4f.

Q13 : Proposez une hypothèse permettant d'expliquer l'effet de CCN1 sur la division des fibroblastes.

Expérience 5

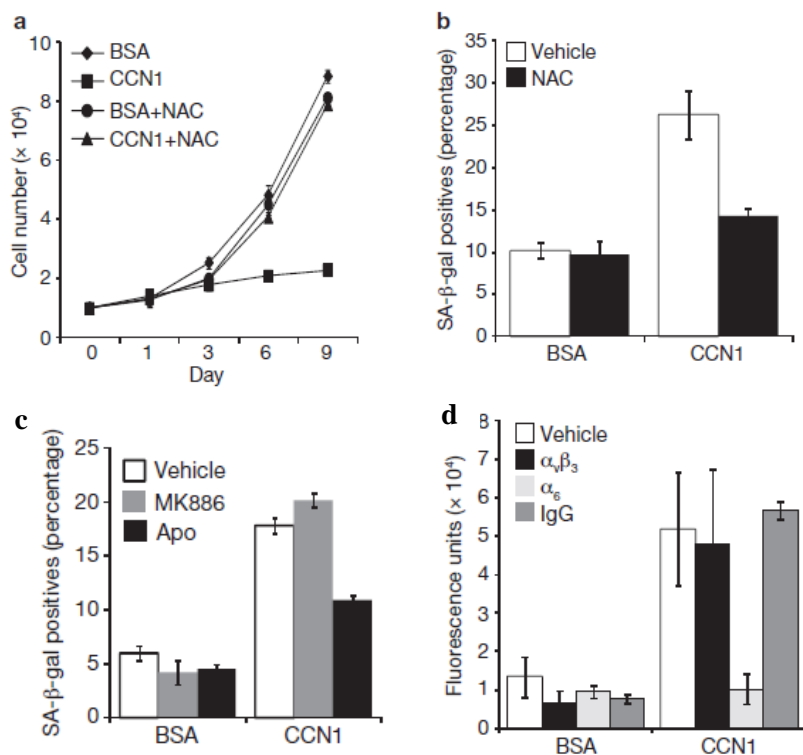


Figure 5 (a, b) BJ cells were pretreated with NAC (2.5 mM) for 1 h followed by the addition of CCN1. NAC was replenished daily and cell numbers were counted, and (b) SA-β-gal expression was evaluated after 3 days. Vehicle control; PBS. (c) BJ cells were preincubated for 1 h with inhibitors of 5-LOX (MK886, 5 μM), NADPH oxidase (apocynin; Apo, 10 μM) or vehicle control (0.1% DMSO), followed by CCN1 treatment (BSA used as a control) for 3 days and quantification of SA-β-gal-positive cells. Chemical inhibitors were replenished daily. (d) Cells were pretreated with function-blocking antibodies against α_vβ₃ integrin or α₆ (50 μg ml⁻¹ each) for 1 h, followed by CCN1 treatment for an additional 1 h and then stained with H2DCF-DA (10 μM). ROS was quantified by fluorescence measurements.

Q14 : Quelle est la fonction de la N-acétyl-Cystéine (NAC)?

Q15 : Sachant que 2 sources importantes de stress oxydant sont les lipoxgénases (LOX) et les NADPH oxydases, que nous apprend la figure 5 sur les signaux induit par un traitement au CCN1 ?

Q16 : d'après l'ensemble des figures, reconstituez la/les voie(s) de signalisation activée(s) après traitement au CCN1.

Expérience 6: Des données supplémentaires (figure 6B) ont été obtenues *in vivo* dans un modèle de souris où la protéine CCN1 est mutée et inactive (souris *Ccn1dm/dm*); Ces données sont mises en parallèle de résultats *in vitro* (figure 6A).

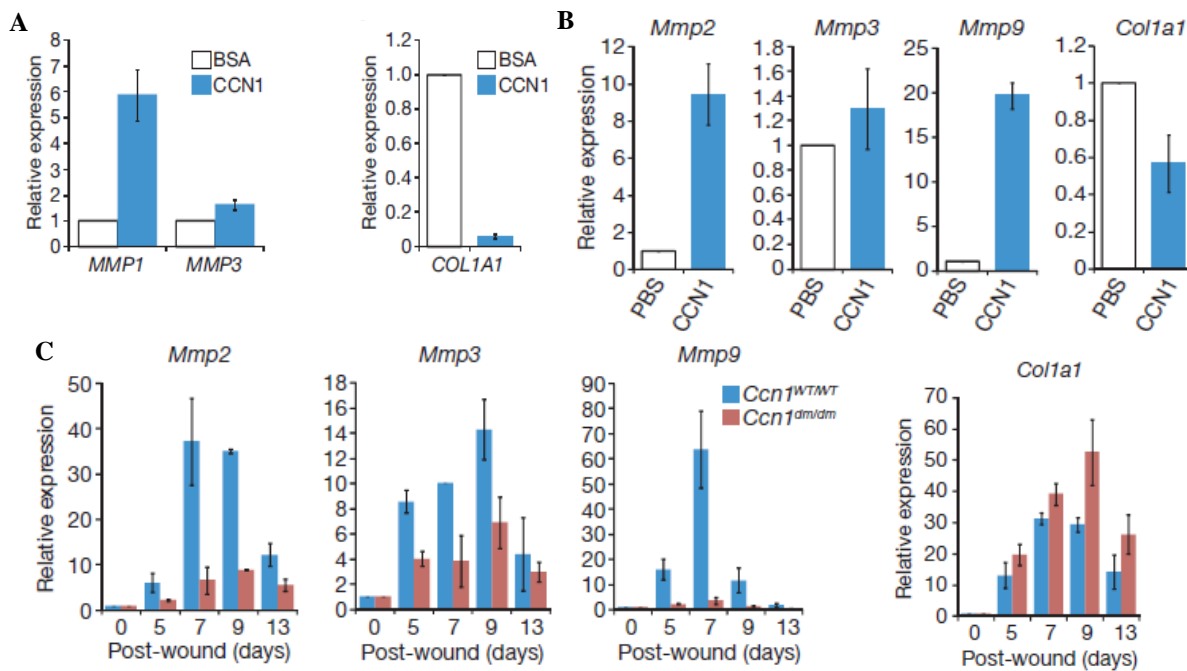


Figure 6: **A/** Cells were treated with CCN1 for 6 days and qRT-PCR was used to quantify the expression of matrix degrading enzymes (MMP1 and MMP3) and collagen 1 (COL1A1)

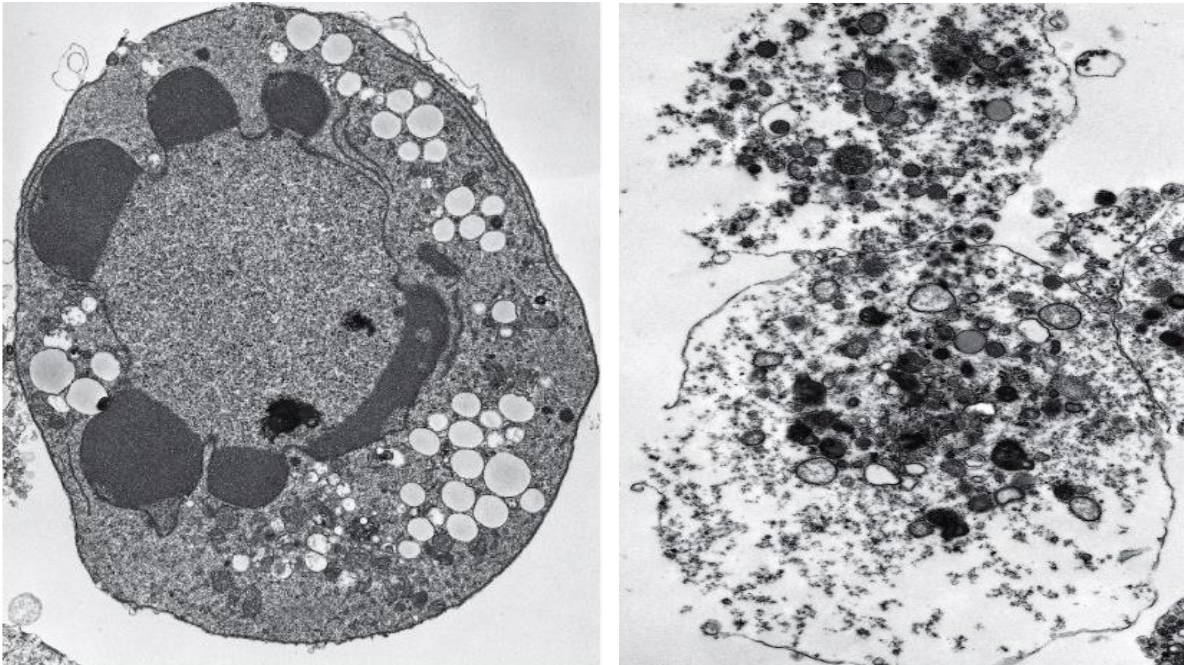
B/ Purified recombinant CCN1 protein (0.1 mg ml⁻¹; 50 µl per dose) in PBS (or PBS alone as a control) was topically applied to excisional wounds of *Ccn1dm/dm* mice daily, and wound granulation tissue was harvested 9 days postwounding. Relative expression of *Mmp2*, *Mmp3* and *Mmp9* and *Col1a1* was analysed by qRT-PCR (n = 5). **C/** Relative expression of *Mmp2*, *Mmp3* and *Mmp9* and *Col1a1* in granulation tissues from wild-type and *Ccn1dm/dm* mice 5–13 days postwounding was analysed by qRT-PCR.

Q17: Sachant que le collagène de type 1 (*col1a1*) est le constituant principal de la matrice extracellulaire fibrosante des cicatrices et que les MMP sont des métalloprotéases permettant de dégrader cette matrice, que pouvez-vous déduire de ces expériences et conclure sur le rôle de CCN1 *in vivo* ?

TD Apoptose

A/ Questions de cours

Question 1 : Observez attentivement les deux micrographies électroniques présentées ci-dessous. Quelle cellule meurt par apoptose ? Laquelle meurt par nécrose ? Décrivez les différences existant entre la cellule qui meurt par nécrose et celle qui meurt par apoptose.



Question 2 : Schématisez les deux voies classiques d'apoptose.

B/ Exercice

Dans cet exercice vous étudierez le rôle des récepteurs CB1 et CB2 sur les cellules responsables du développement de la fibrose hépatique.

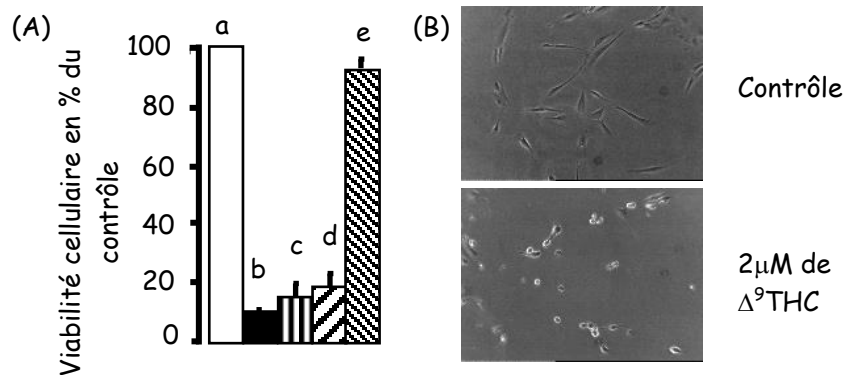
La fibrose, caractérisée par une accumulation excessive de matrice extracellulaire (MEC) dans les tissus, est la complication commune de toutes les maladies chroniques du foie, qu'elles soient d'origine virale (hépatite C ou B), toxique (alcool, médicaments) ou métabolique (obésité). Au cours de ces pathologies chroniques, plusieurs types cellulaires hépatiques (= cellules du foie) vont se différencier en myofibroblastes qui vont alors proliférer et synthétiser en grande quantité de la MEC fibrosante. Cette MEC va s'accumuler et altérer les fonctions du foie, mettant ainsi en place la fibrose dont le stade ultime est la cirrhose. Une des stratégies thérapeutiques envisageables serait de stimuler spécifiquement la mort ou d'inhiber la prolifération de ces cellules fibrogéniques.

Les récepteurs CB1 (RCB1) et CB2 (RCB2) sont deux récepteurs couplés aux protéines G. Ces deux récepteurs lient des ligands endogènes mais également des ligands exogènes comme le THC, principal composé actif du cannabis qui se lie avec la même affinité à ces deux récepteurs. Il existe des antagonistes (molécules inhibant l'activation d'un récepteur) spécifiques de chacun de ces récepteurs.

Au début de cette étude vous avez mis en évidence l'expression de RCB1 et RCB2 dans les

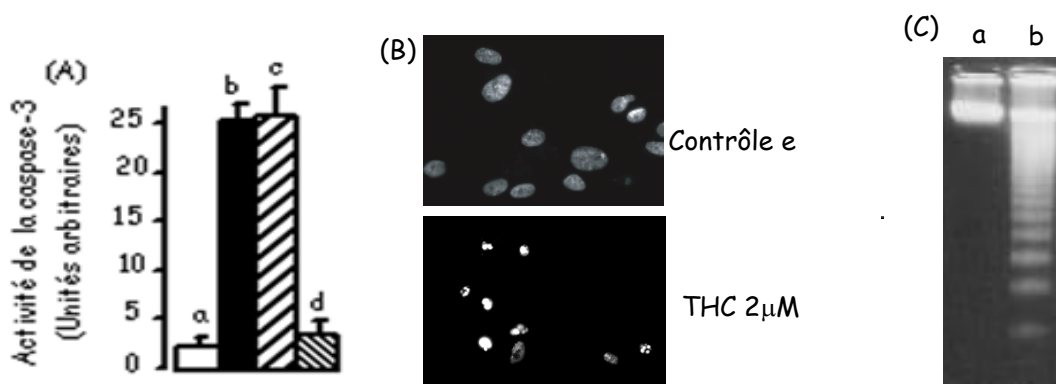
myofibroblastes hépatiques de patients atteints d'une fibrose. Sachant que ces deux récepteurs peuvent être impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire, vous décidez d'étudier l'effet du THC sur des myofibroblastes hépatiques (MFh) humains isolés et mis en culture.

Figure 1 : A) Viabilité des MFh exposés 16 heures à un milieu contrôle (a), à du THC 2 μ M (b), à 2 μ M de THC+ de la toxine pertussique (empêche l'activation des protéines Gi) (c), à du THC 2 μ M + un antagoniste de RCB1 (d) ou à du THC 2 μ M + un antagoniste de RCB2 (e) ; B) Micrographie de MFh exposés au milieu contrôle ou 2 μ M de Δ^9 THC pendant 16h.



Q1. Quelles informations nous apportent ces expériences sur l'effet de 2 μ M de THC sur les MFh et sur le(s) récepteur(s) impliqué(s)?

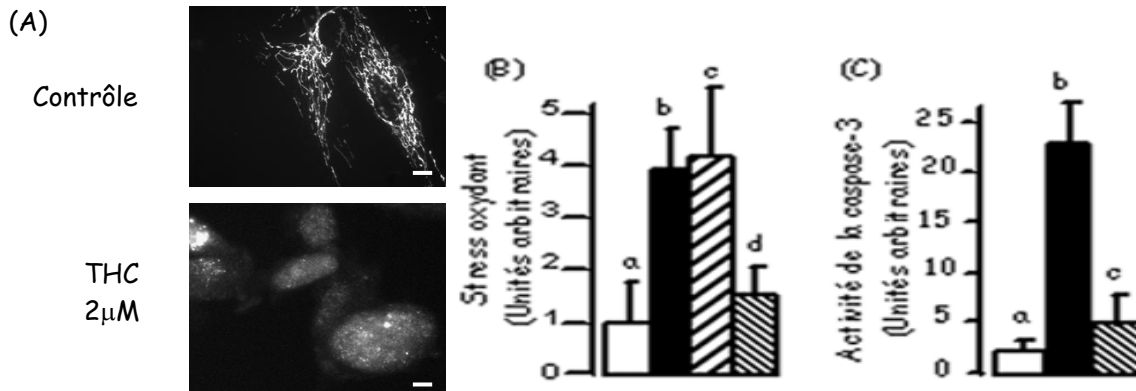
Figure 2. (A) Mesure de l'activité de la caspase 3 dans les MFh traités pendant 4h avec un milieu contrôle (a), du THC 2 μ M (b), du THC 2 μ M + un antagoniste de RCB1 (c), ou du THC 2 μ M + un antagoniste de RCB2 (d). Des MFh traités 10h avec un milieu contrôle ou par 2 μ M de THC sont soit **(B)** marqués avec du DAPI puis observés au microscope à fluorescence soit **(C)** lysés, l'ADN en est extrait et déposé sur un gel d'agarose contenant du BET qui, après migration est observé aux UV (a : contrôle ; b : THC).



Q2. Que sont le DAPI et le BET ?

Q3. Décrivez brièvement les phénomènes que mettent en évidence chacune de ces expériences A, B et C ? Quelles informations nous apportent ces expériences sur la nature de l'effet de 2 μ M THC sur les MFh et le(s) récepteur(s) impliqué(s) ?

Figure 3. (A) Photos en microscopie à fluorescence de MFh traités pendant 1h avec un milieu contrôle ou avec 2 μ M de THC, puis marqués par un anticorps dirigé contre le cytochrome C. **(B)** Mesure du stress oxydant (considérez le stress oxydant comme un élément d'une voie de transduction) dans des MFh traités 20 minutes avec un milieu contrôle (a), du THC 2 μ M (b), du THC 2 μ M + l'antagoniste de RCB1 (c) ou du THC 2 μ M + l'antagoniste de RCB2 (d); **(C)** Mesure de l'activité caspase 3, dans les MFH traités pendant 4h avec un milieu contrôle (a), du THC 2 μ M (b), THC 2 μ M + un antioxydant (inhibiteur du stress oxydant) (c)



Q4. Dans les cellules contrôles quelle est la localisation et la fonction du cytochrome C. Que nous apprend l'expérience A ? En utilisant vos connaissances, comment explique-t-on le phénomène observé?

Q5. Que nous apprennent les expériences B et C ?

Q6. En vous aidant des figures 1, 2, 3 faites un schéma représentant l'enchaînement d'événements cellulaires décrit dans ces expériences depuis le début du traitement avec le THC jusqu'aux effets observés sur les MFh.

Après ces études en culture, vous voulez confirmer le rôle des récepteurs CB1 et CB2 au cours de la fibrogenèse in vivo. Vous comparez des souris sauvages avec des souris invalidées pour le récepteur CB1 (KO_{CB1}) d'une part et CB2 (KO_{CB2}) d'autre part dans un modèle expérimental de fibrose : l'intoxication chronique au tétrachlorure de carbone (métabolisation par le foie générant des métabolites toxiques provoquant des lésions dans le foie).

Q7. Quel phénotype fibrogénique attendez chez les souris KO_{CB1} et KO_{CB2} par rapport au sauvage ? Argumentez votre hypothèse.

En parallèle de ces études chez la souris vous collaborez avec un service hospitalier d'hépatologie afin de mener une étude de l'effet de la consommation de cannabis sur le développement de la fibrose en questionnant les patients sur leur consommation. Vous comparez ensuite la vitesse de progression de la fibrose entre deux groupes de patients atteints d'hépatite C : fumeur quotidien de cannabis versus non fumeur de cannabis.

Q8. Quel résultat attendez-vous ? Argumentez.