

Introduction

Le cisplatine est une molécule actuellement utilisée dans le traitement de certains cancers, mais des tumeurs sont résistantes

Le DAP est dérivé du cisplatine:

- Même mode d'action: formation de complexes avec l'ADN, puis coupures de l'ADN
- Le DAP est efficace sur des tumeurs résistantes au cisplatine

Quel est le mode d'action spécifique du DAP sur les cellules tumorales?

Expérience 1:

- Traitement de cellules de carcinome ovarien humain A2780 par 0,6 μ M de DAP (24h)

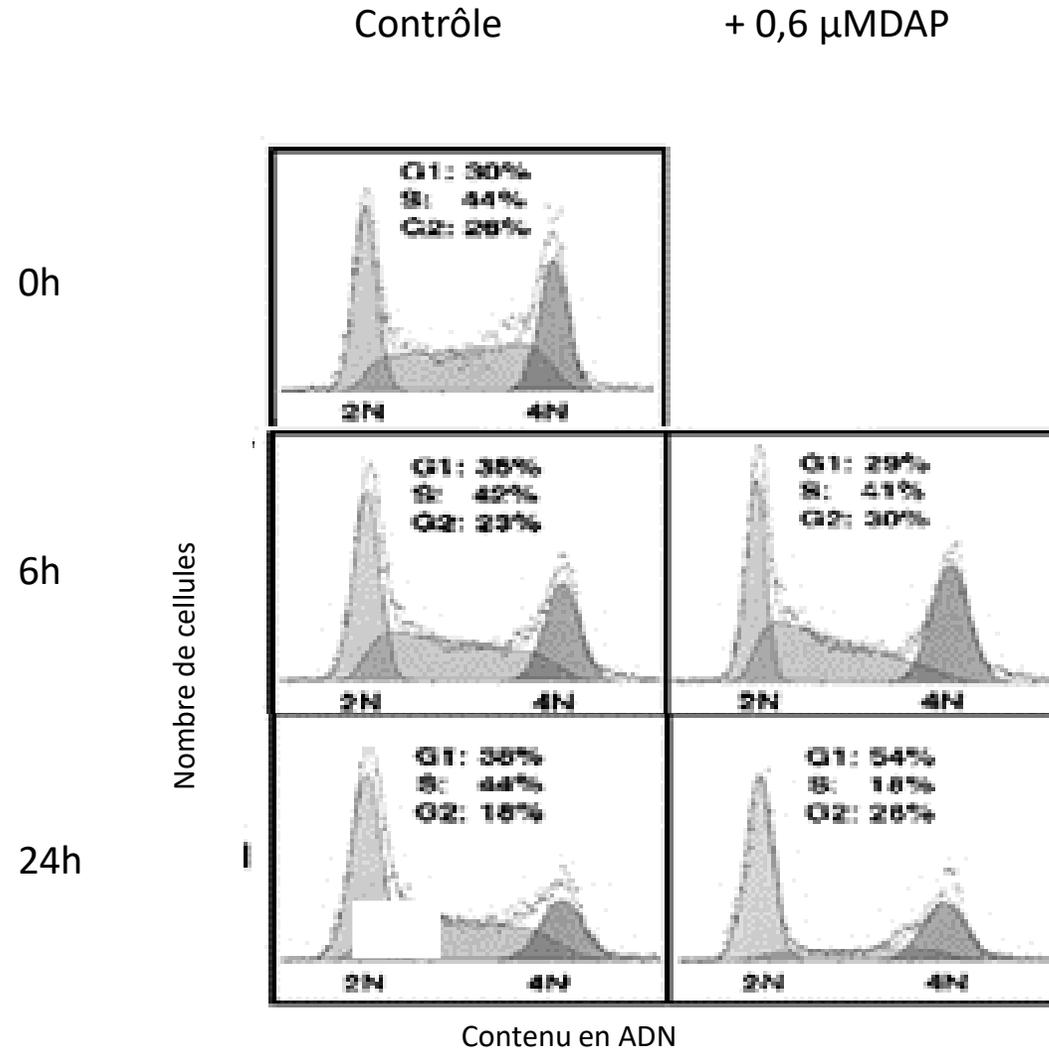


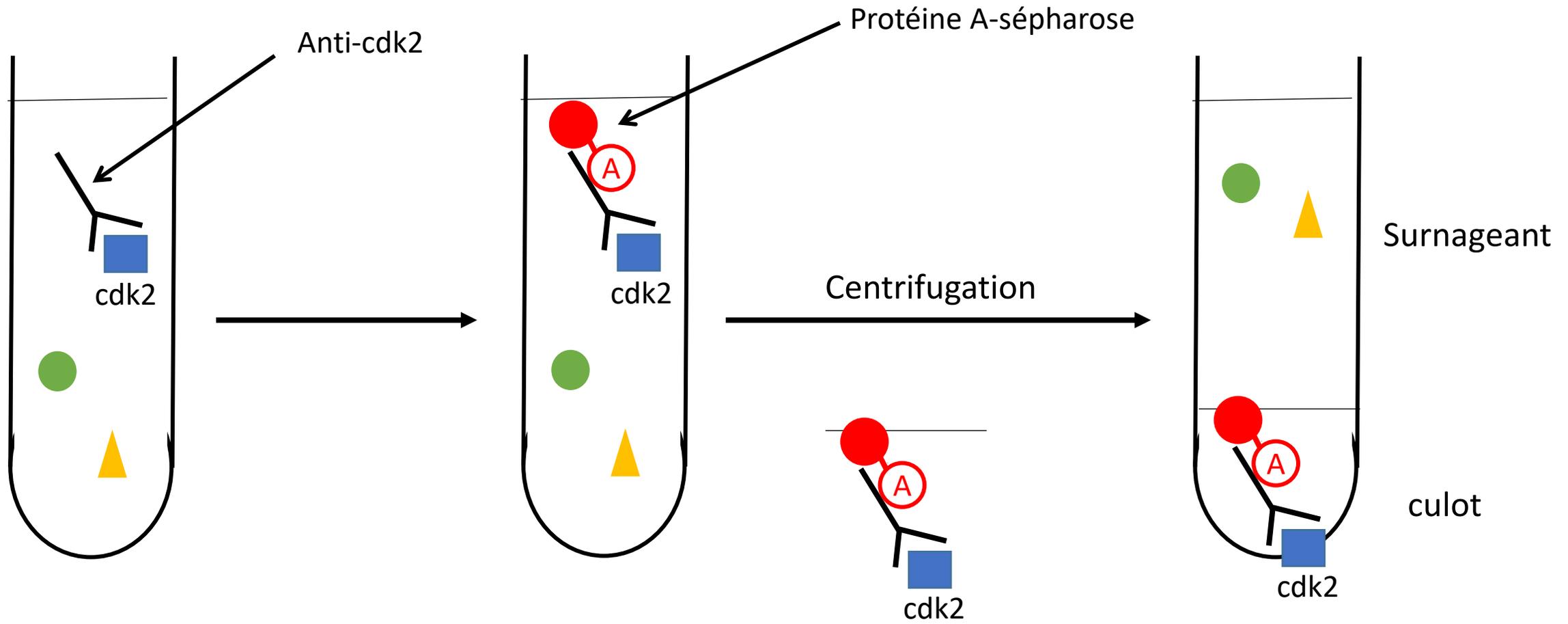
Figure 1 : après récolte, les cellules A2780 sont lavées au PBS puis incubées dans du PBS contenant 50 μ g/ml d'iodure de propidium et 20 μ g/ml de RNase A pendant 15 minutes, puis le contenu en ADN des cellules est analysé dans un cytomètre en flux.

Disparition des cellules en phase S, accumulation des cellules en phase G1 du cycle cellulaire

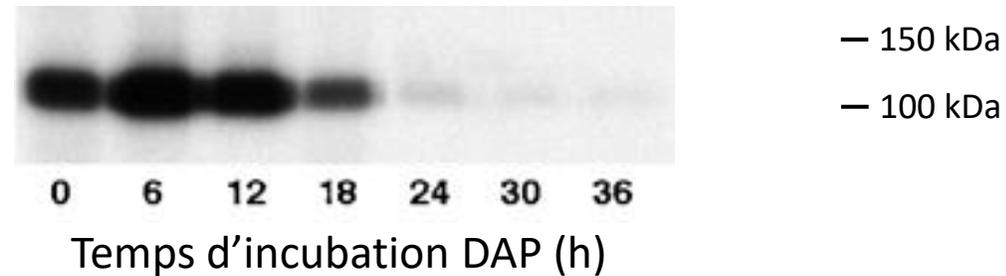
Expérience 2:

- Traitement par DAP,
- Lyse des cellules
- Isolation par immunoprécipitation de la protéine cdk2,
- Mesure de l'activité de cdk2 sur son substrat pRb

Expérience 2



- Isolation par immunoprécipitation de la protéine cdk2,
- Mesure de l'activité de cdk2 sur son substrat pRb

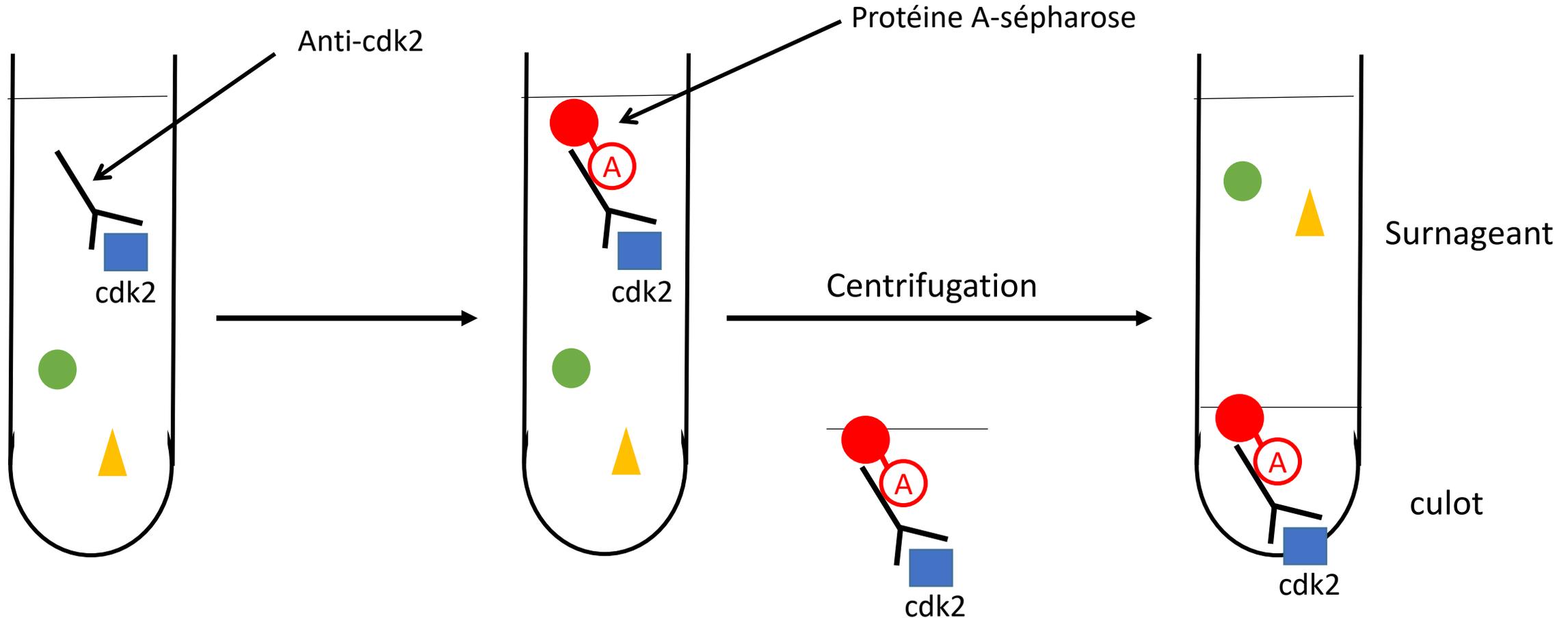


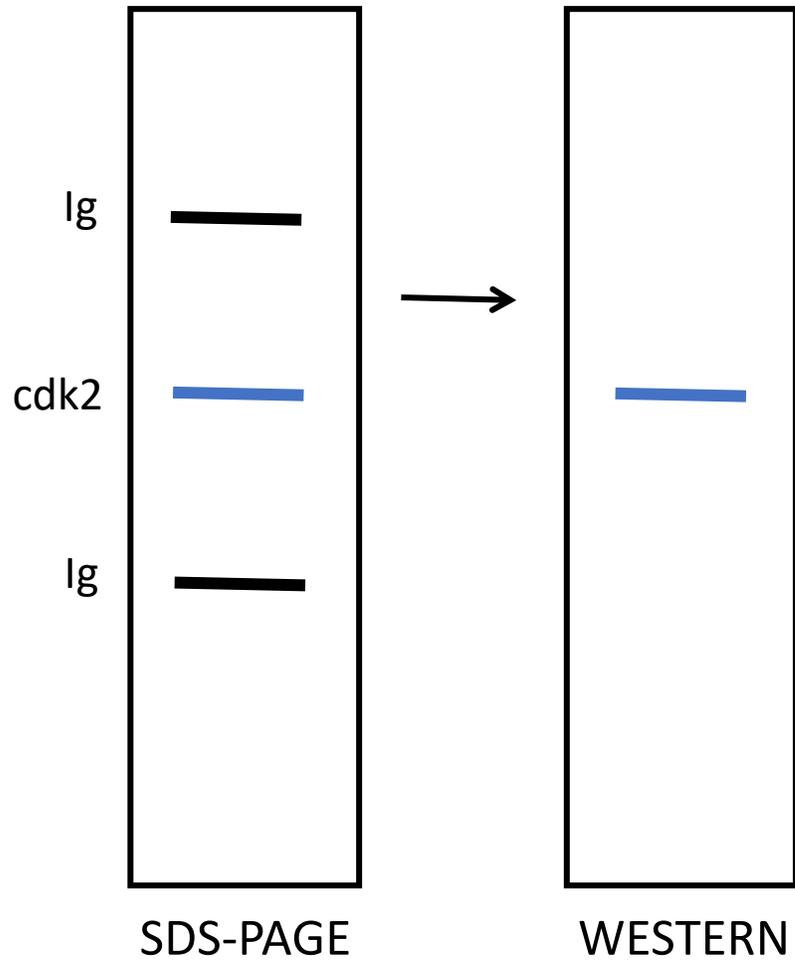
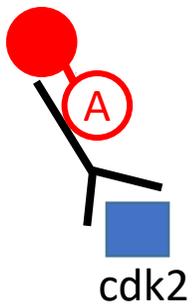
L'activité de cdk2 décroît au cours du temps en présence de DAP

Arrêt de la transition G1/S, parallèle à l'inhibition de cdk2

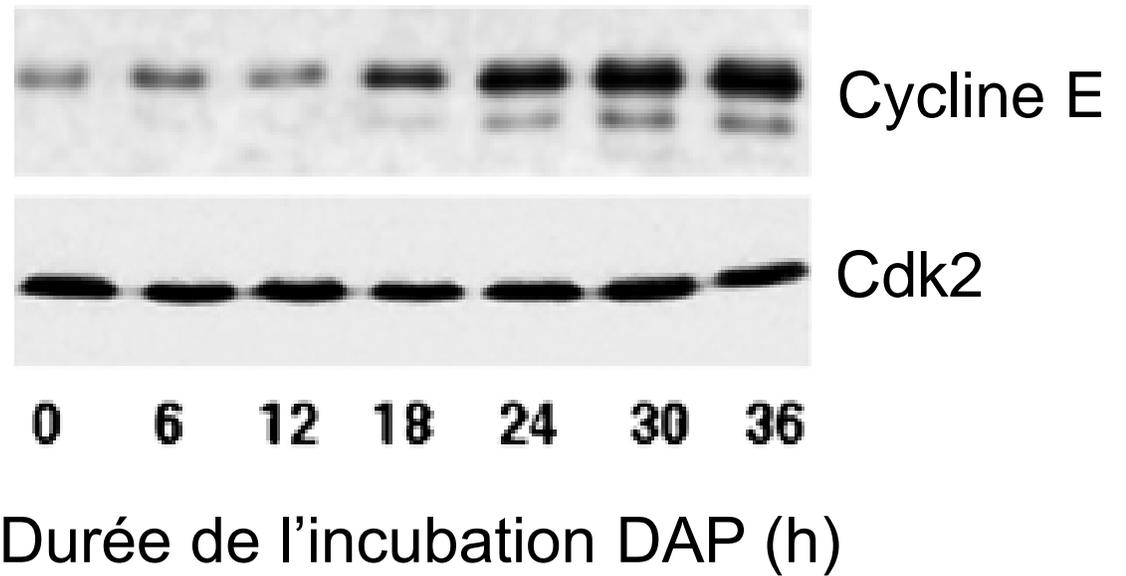
Expérience 3

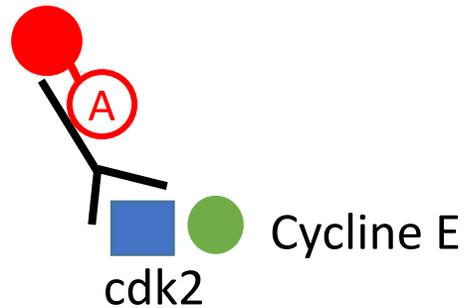
EXPERIENCE 3- Les immunoprécipités réalisés avec un anticorps spécifique anti-cdk2 obtenus dans l'expérience précédente sont déposés sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE, et analysés en Western-blot à l'aide d'anticorps anti-cdk2 et anti-cycline E (figure 3)



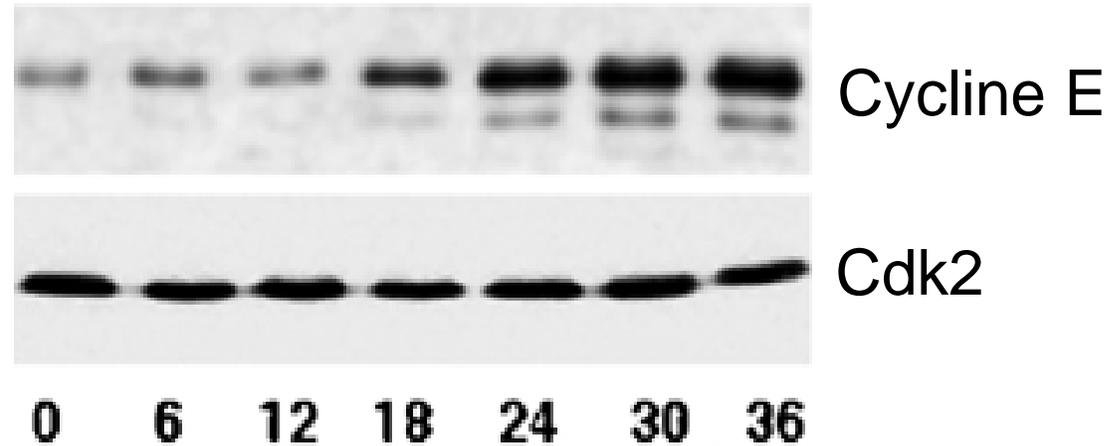


IP: anti-Cdk2





IP: anti-Cdk2



Durée de l'incubation DAP (h)

Pas de variation de la quantité de cdk2: la perte d'activité est bien d ue   une inhibition

Apparition de la cycline E: coimmunopr ecipit ee avec cdk2

Augmentation de la liaison cycline E –cdk2, mais disparition de l'activit  cdk2?

La liaison cdk2-cycline E n'est pas perturb ee, ce n'est pas la cause de l'inhibition de cdk2

Expérience 4

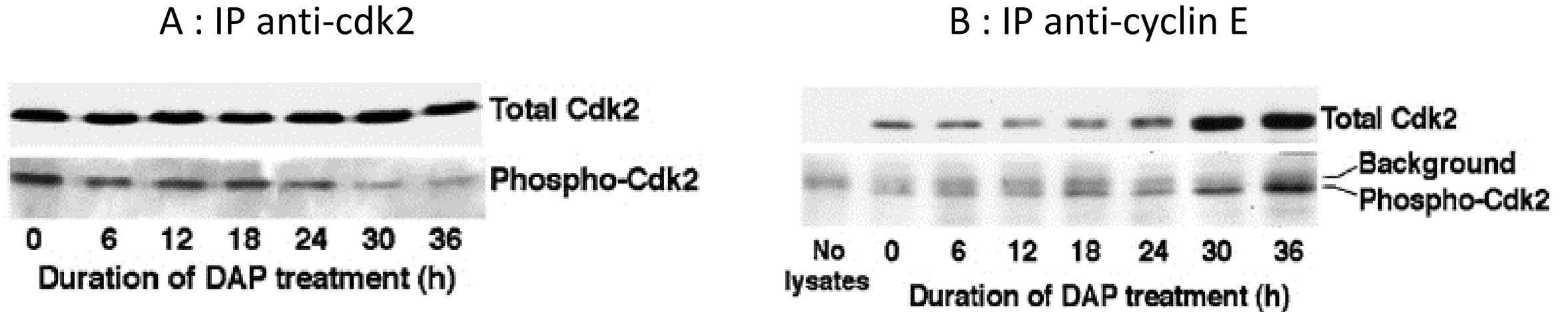


Figure 4 :

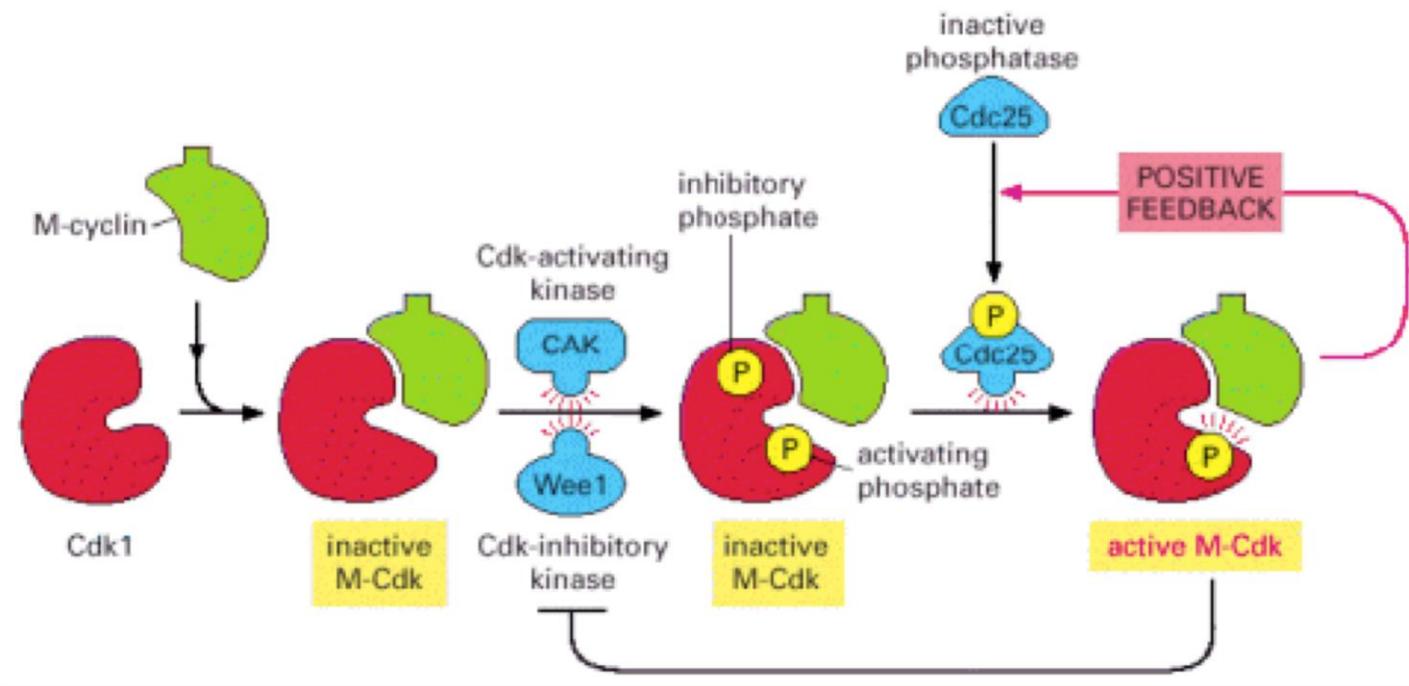
(A) lysats immunoprécipités par anti-cdk2, western-blot réalisé avec des anticorps anti-cdk2 et anti-phosphotyrosine.

(B) ; Immunoprécipitation anti-cycline E, Western blot : anti-cdk2, anti phospho-cdk2 (Thr160).

A: pas de variation de quantité de cdk2; décroissance de la phosphorylation sur une tyrosine

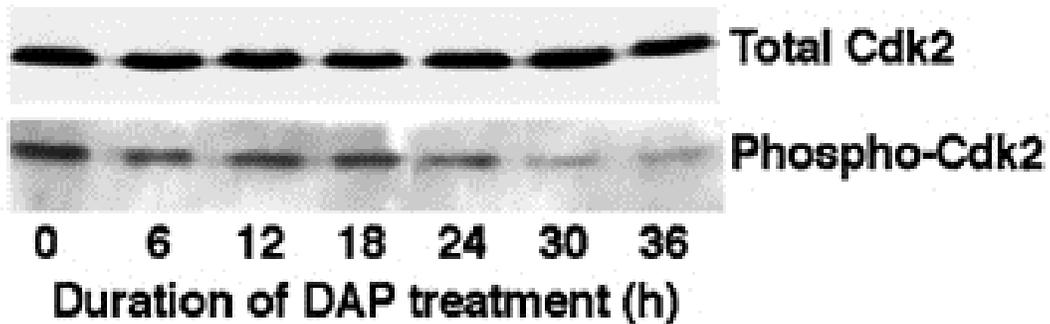
B: les bandes phospho cdk2 augmentent d'intensité; en parallèle, la quantité de cdk2 coIP avec cycline E augmente, donc pas de variation de la phosphorylation de thréonine sur cdk2

La **CAK** (CyclineH/CDK7) phosphoryle la **T 161** devenue accessible après la liaison de la cycline à la Cdk. Ceci a pour effet un changement de conformation qui dégage l'entrée du site substrat. La phosphorylation de la Cdk par la CAK est donc "activatrice".

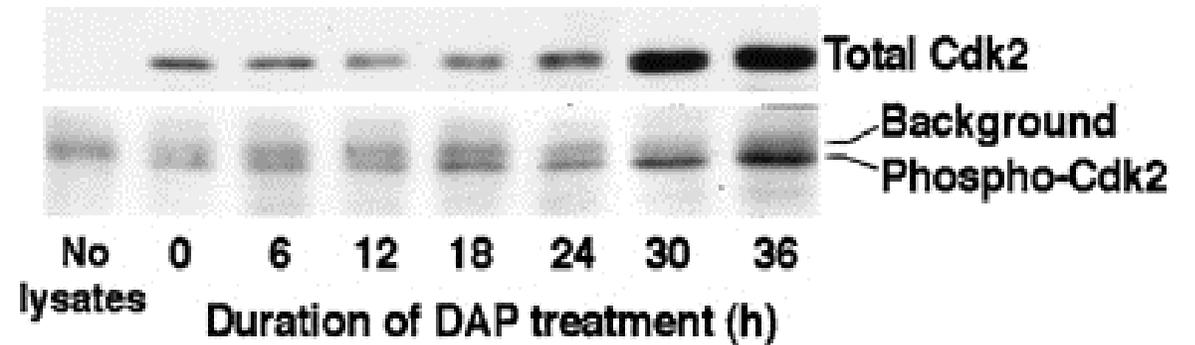


Wee1 phosphoryle la Cdk sur **T 14 et Y 15**. Ces phosphorylations empêchent l'entrée de **l'ATP** dans son site, elles sont donc inhibitrices, même si la Cdk est phosphorylée sur **T 161** par la CAK (elle accepte alors le substrat, mais reste inactive sans l'ATP). **Cdc 25**, en déphosphorylant T 14 et Y15, permet à l'ATP de se placer correctement, ce qui correspond à l'activation de la Cycline B/ Cdk2

A : IP anti-cdk2



B : IP anti-cyclin E



Bilan de l'état de phosphorylation de cdk2 : - disparition des phosphotyrosines
- pas de modification des phosphothréonines

Disparition de phosphorylations inhibitrices : la disparition de l'activité cdk2 n'est pas due à une perturbation de son état de phosphorylation

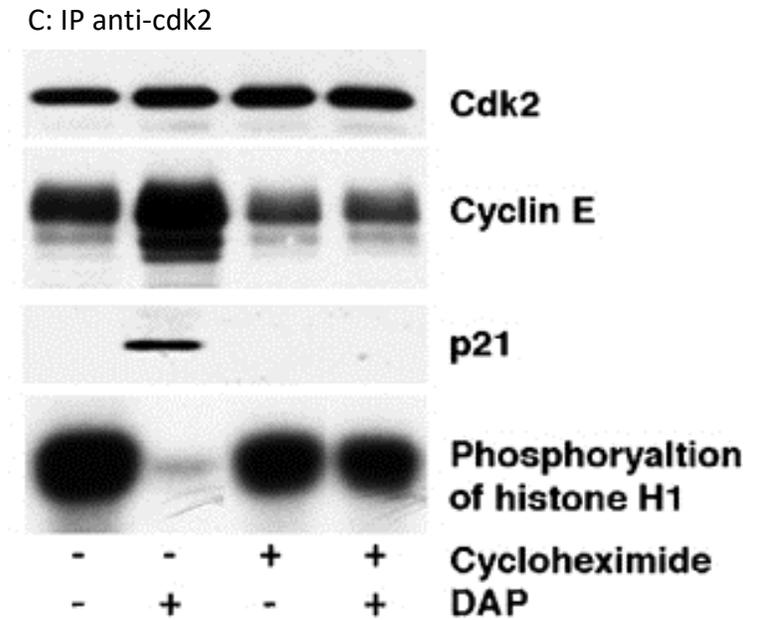
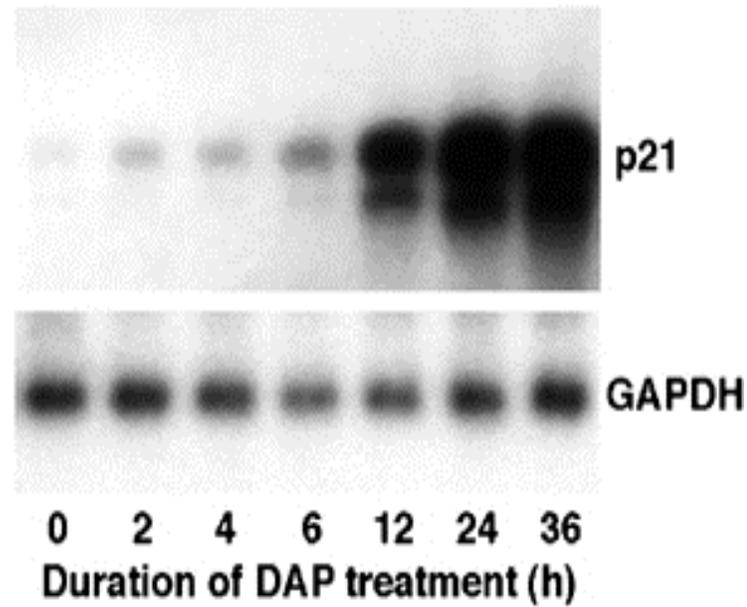
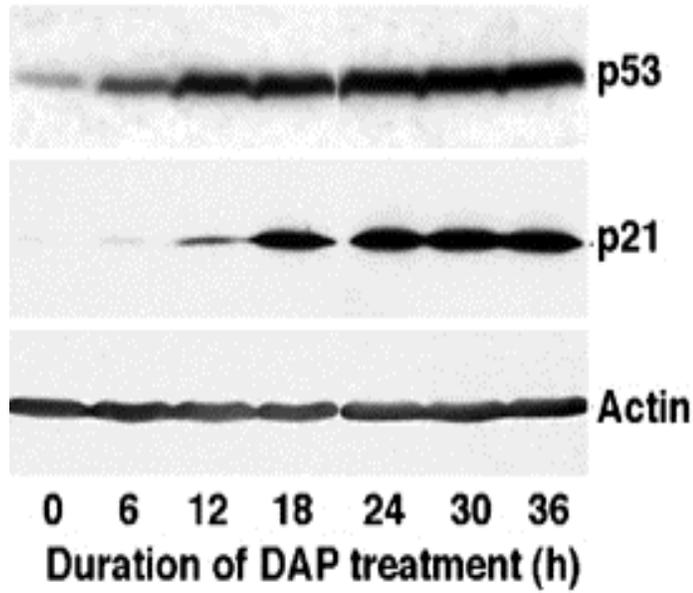
Cellules + DAP

+ Cycloheximide (CHX)

Lysats : Western blot

ARN: Northern blot

Lysats, IP anti cdk2

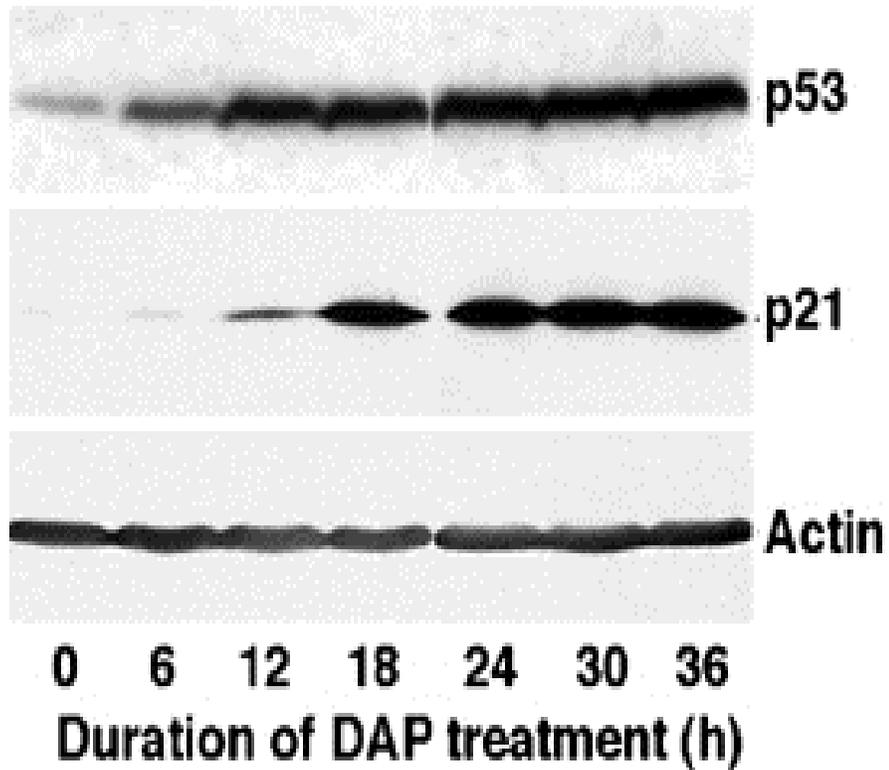


Cellules + DAP



Lysats : Western blot

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.



↗ p53

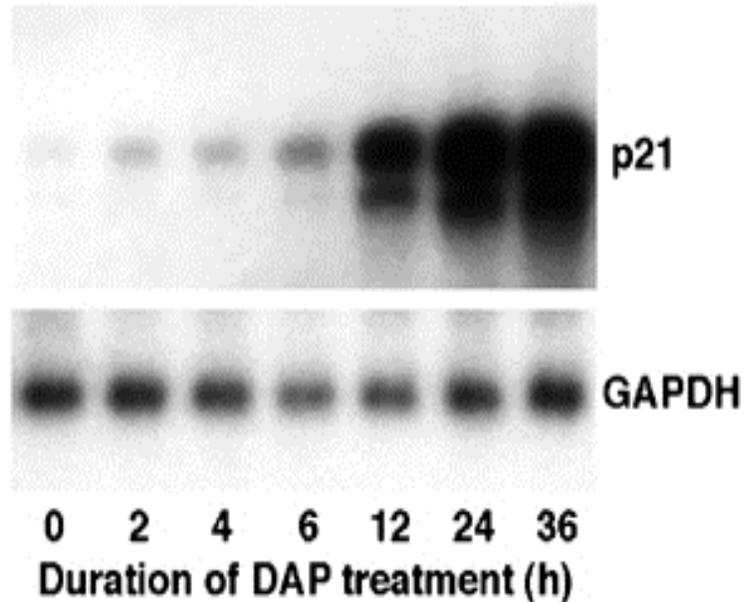
↗ p21

Cellules + DAP



ARN: Northern blot

(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.



↗ ARNm p21

Western blot + Northern blot:

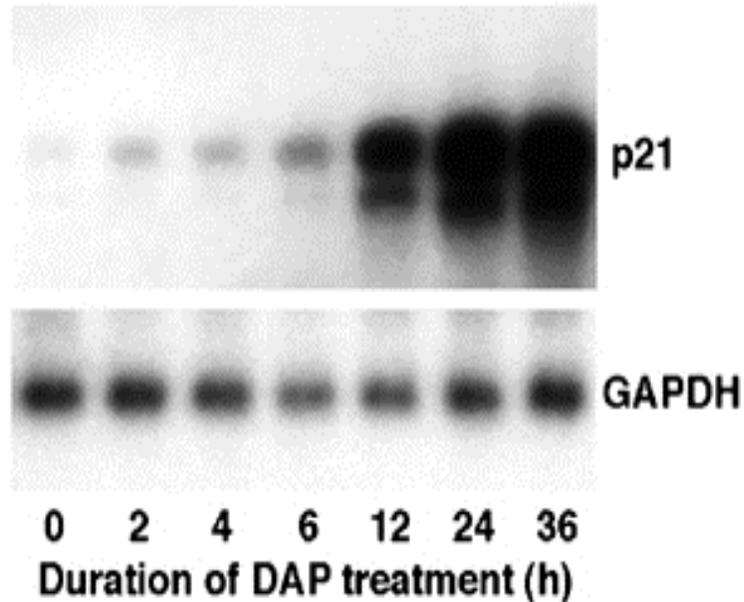
- La synthèse de l'ARNm p21 précède celle de la protéine p21
- p53: facteur de transcription, activé par dommages à l'ADN (*cf* DAP)
- L'accumulation de p53 précède celle de p21 (gène-cible)

Cellules + DAP



ARN: Northern blot

(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.



↗ ARNm p21

Western blot + Northern blot:

- La synthèse de l'ARNm p21 précède celle de la protéine p21
- p53: facteur de transcription , activé par dommages à l'ADN (*cf* DAP)
- L'accumulation de p53 précède celle de p21 (gène-cible)

Résultats supplémentaires !

Cellules + DAP

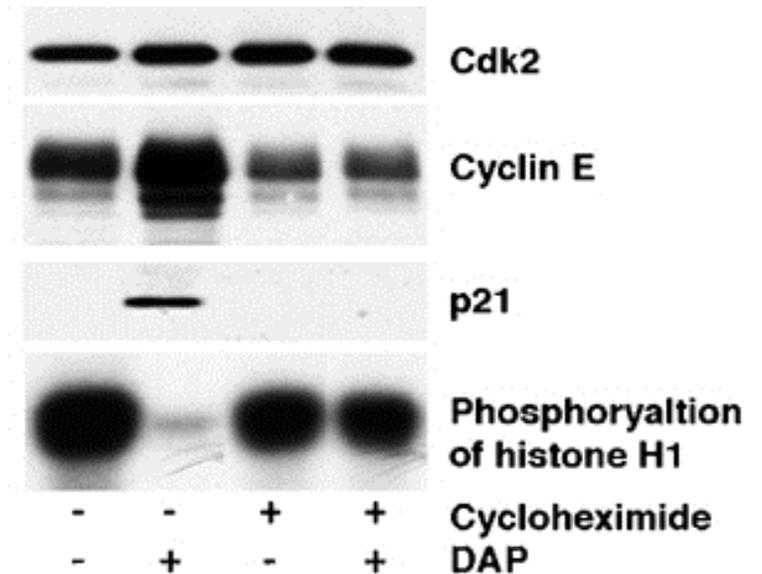
+ Cycloheximide (CHX)

Lysats, IP anti cdk2

(C) Les lysats de cellules A2780 sont 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.

C: IP anti-cdk2



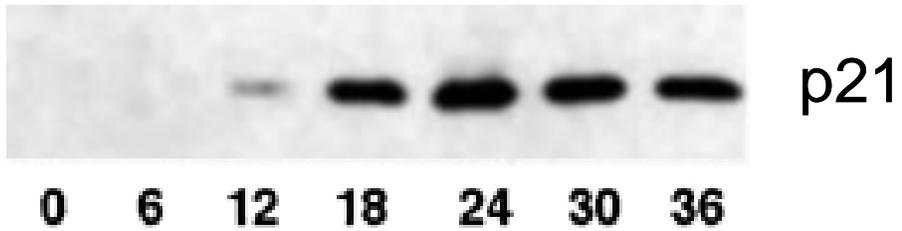
p21 s'associe au complexe cycline E-cdk2 en présence de DAP

En présence de cycloheximide (bloque synthèse protéique): pas de p21 néosynthétisé (cf A et B)

- Pas d'association avec p21: l'activité cdk2 n'est pas inhibée
- Néosynthèse de cycline E au cours du cycle

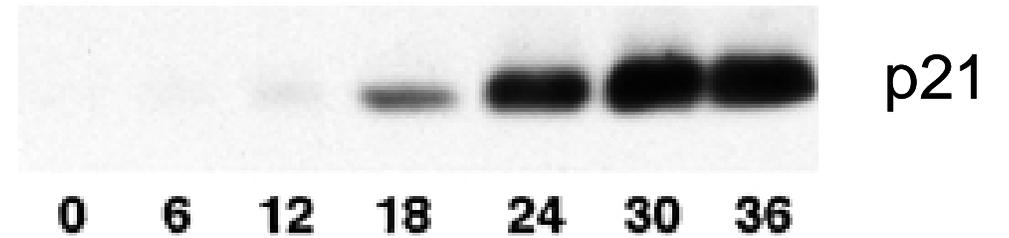
Figure 6: Analyse par western-blot d'immunoprécipités anti-cdk2 (panel de gauche) ou anti-cycline E (droite)

IP: anti-Cdk2



Durée de l'incubation DAP (h)

IP: anti-Cycline E

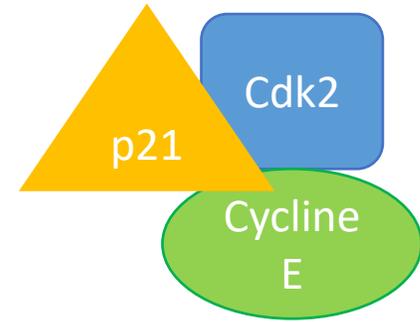


Durée de l'incubation DAP (h)

Liaison de p21 à cdk2 et cycline E. On a une cinétique de 0 à 36h,; La formation du complexe avec p21 est parallèle avec la décroissance de l'activité kinase.

DAP
↓
Dommages à l'ADN
↓
p53
↓
p21 (CKI ou CDKN)

G1



Phase S



Néosynthèse
(transition G1/S)



G1/S

Dégradation de la cycline E

TD Sénescence

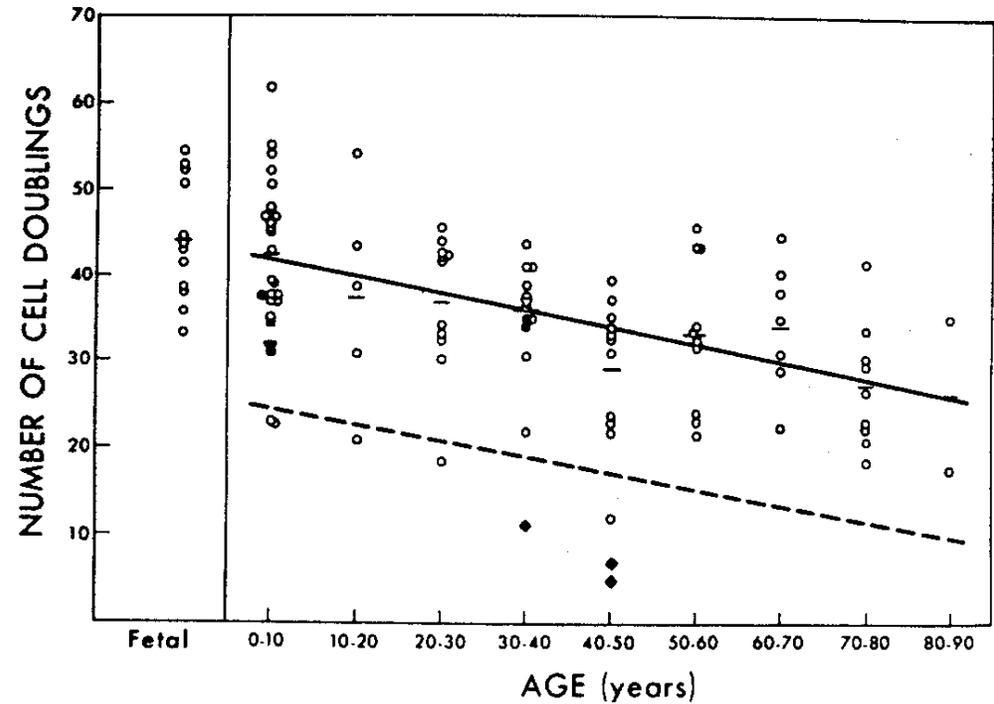
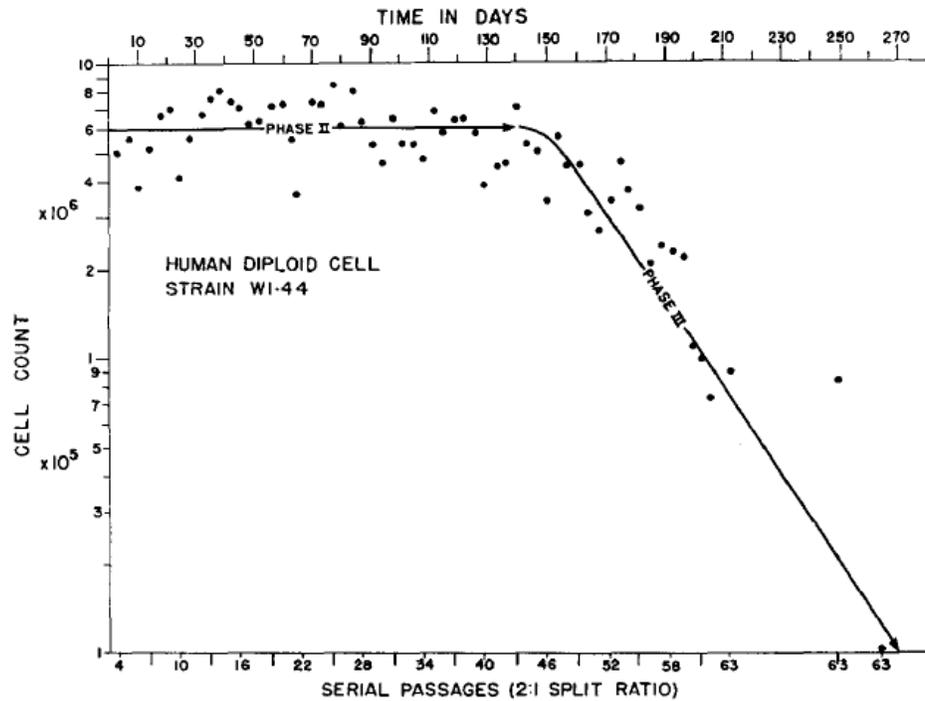


Figure 1 : A/ Cell counts determined at each passage of human foetal fibroblast every four days for split ratios 1: 2. Total cell counts are plotted as a function of time in days and actual passages.
B/ Cumulative number of cell doublings achieved by human skin fibroblast cultures plotted as a function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

Nombre limité de divisions cellulaires en culture in vitro, capacité de division décroissante en fonction de l'âge

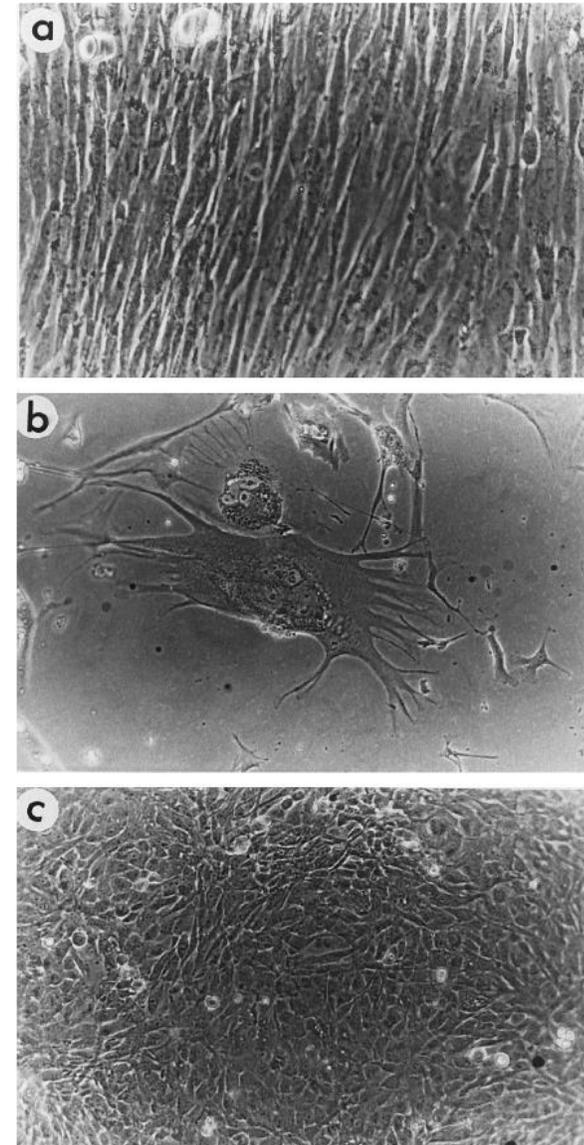
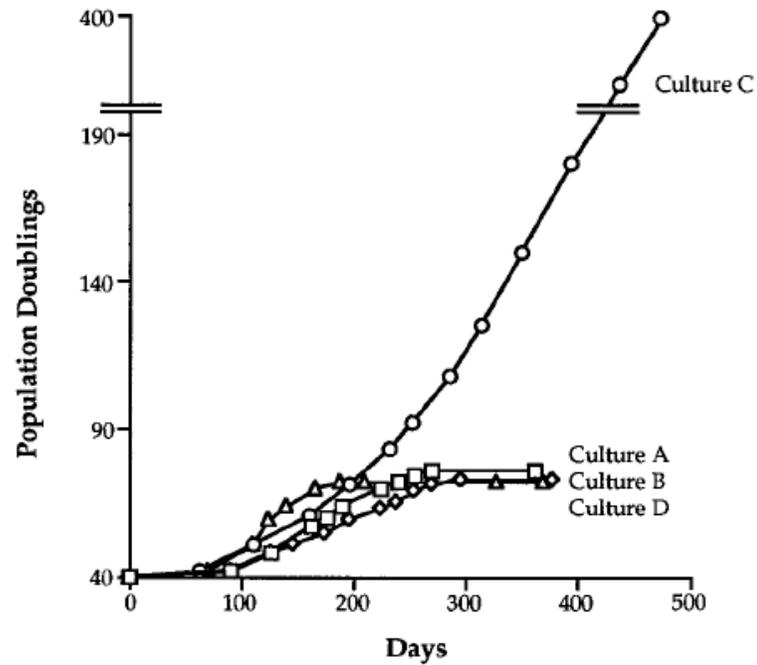
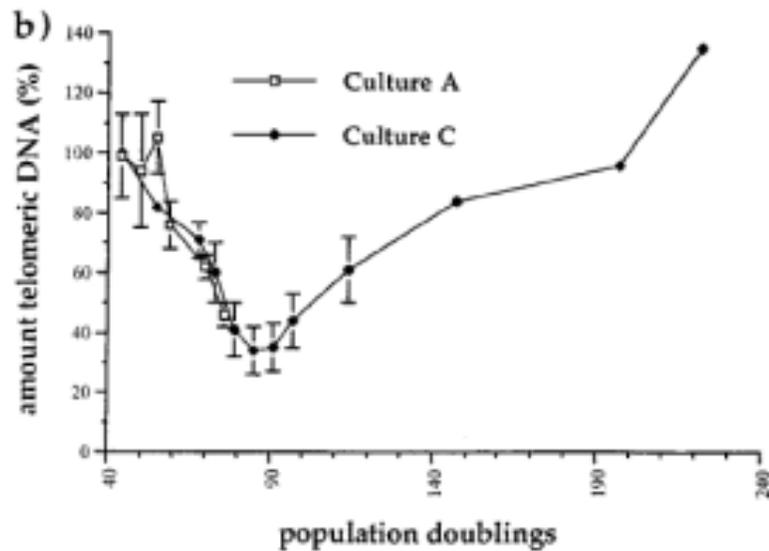


Figure 2:

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.

Arrêt de division irréversible pour les sous-cultures A,B,D, la sous-culture C est immortalisée. Important remaniement morphologique des cellules sénescents par rapport aux cellules en division



*. 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.*

Raccourcissement des télomères corrélé avec l'établissement de la sénescence

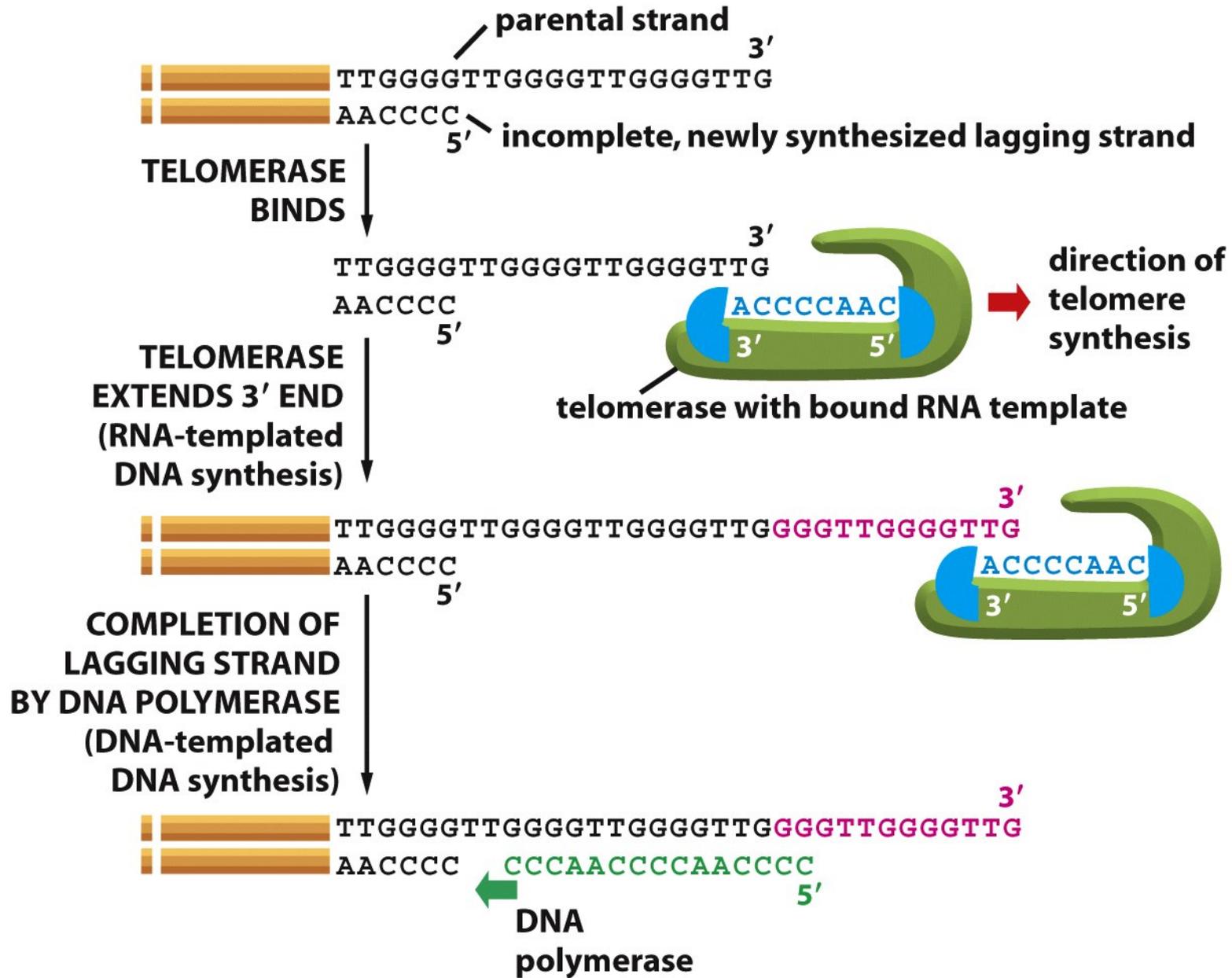


Figure 5-41 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

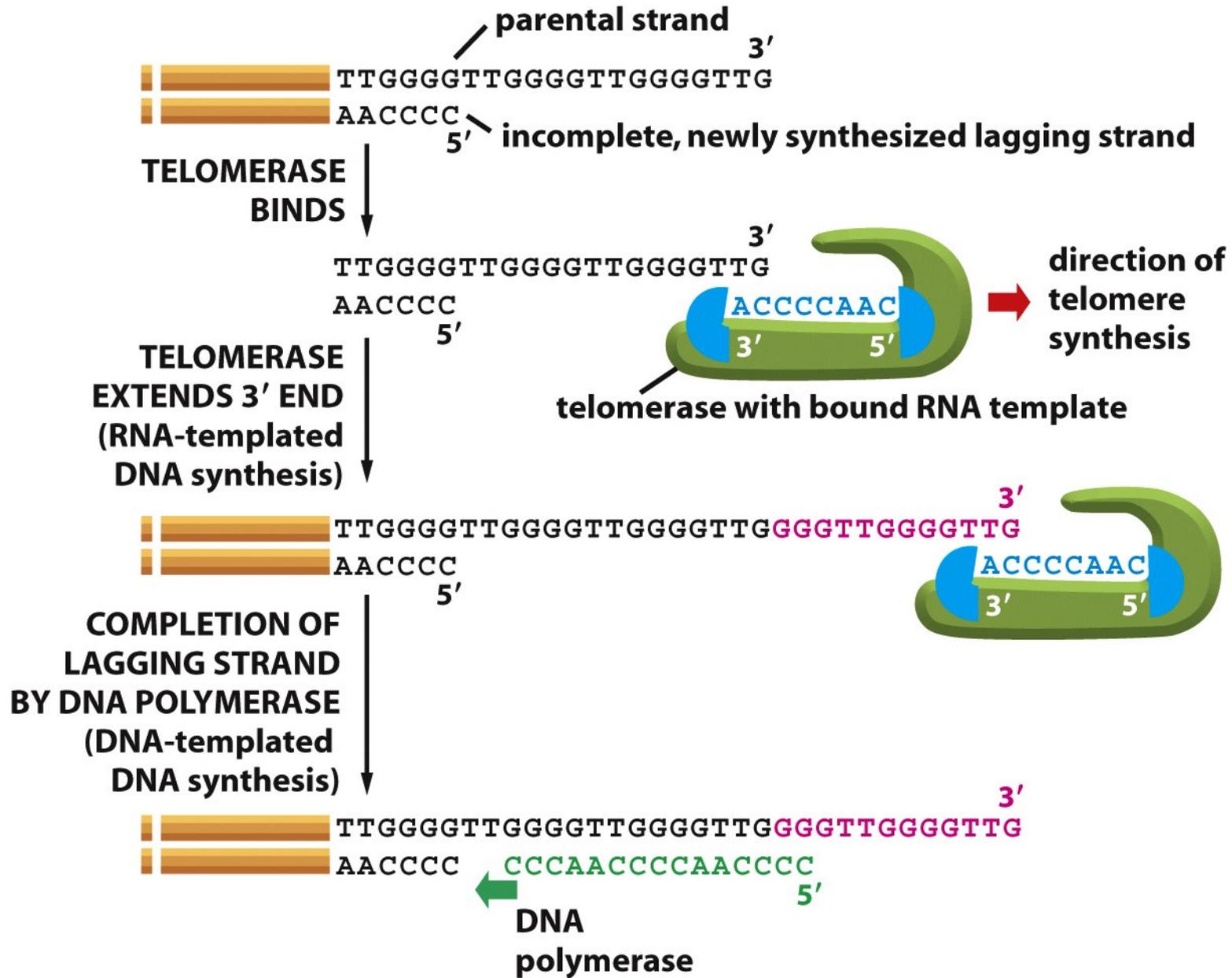
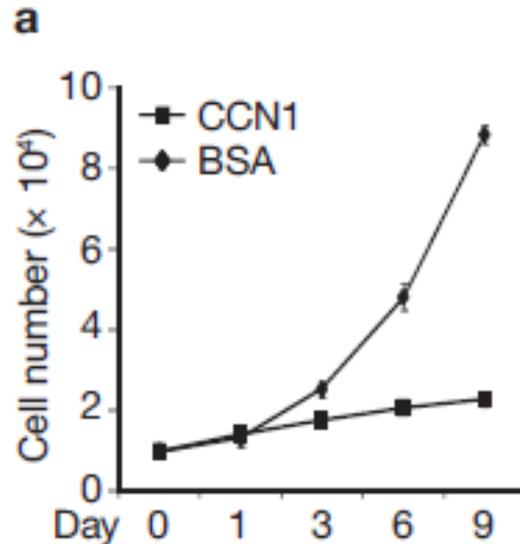


Figure 5-41 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Expérience 1 :

Figure 1 : *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.



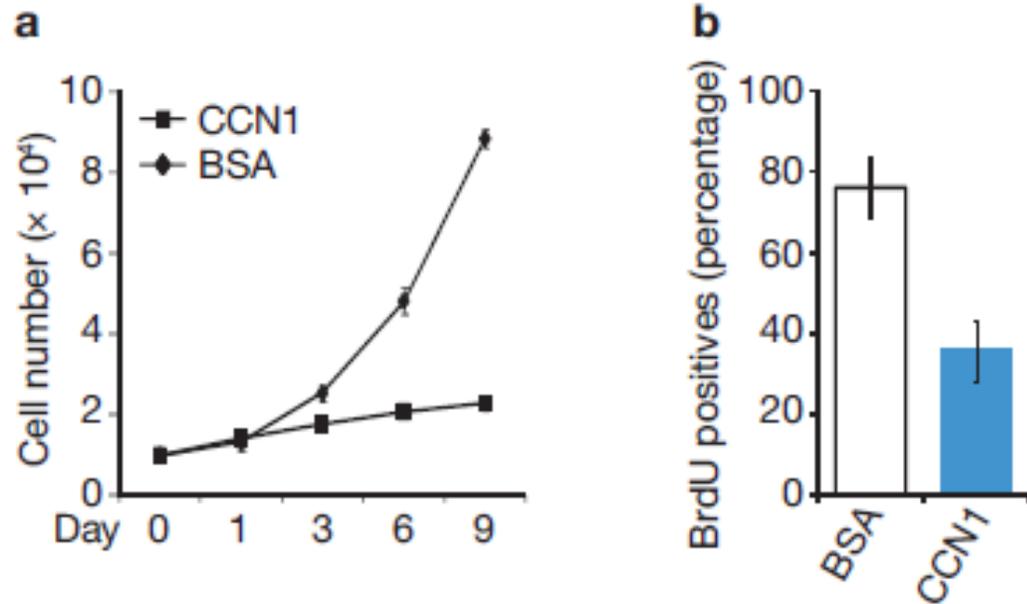
CCN1 limite le nombre de cellules :
Arrêt ou fort ralentissement de la division cellulaire ?

CCN1: protéine de la matrice extracellulaire
BSA: protéine contrôle.

Expérience 3 :

Figure 3 : Young human BJ fibroblasts were treated with purified recombinant CCN1 protein ($2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$).

(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.



Moins d'incorporation de BrdU en présence de CCN1

Arrêt de la prolifération cellulaire

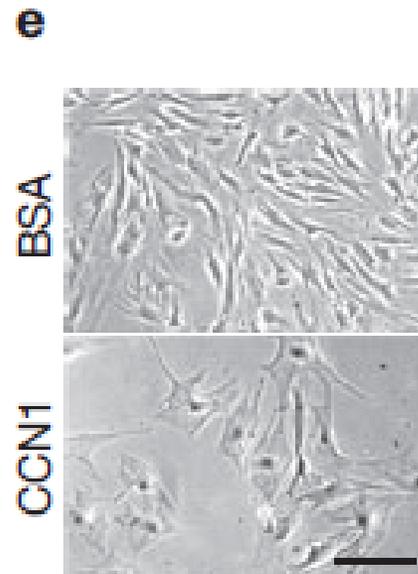
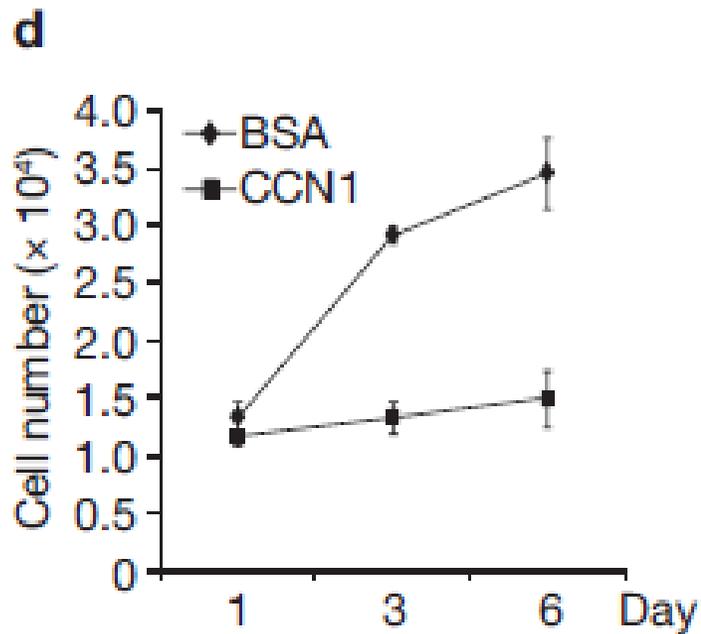
BrdU= bromodéoxyuridine, analogue de la thymidine:
Suivi de son incorporation dans l'ADN par des Ac spécifiques

Expérience 1 :

Figure 1 : Young human BJ fibroblasts were treated with purified recombinant CCN1 protein ($2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$).

(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.



Effet irréversible de CCN1
sur la division des cellules

Arrêt de la prolifération en absence de CCN1

Expérience 3 :

Figure 3 : *Young human BJ fibroblasts were treated with purified recombinant CCN1 protein (2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$).*

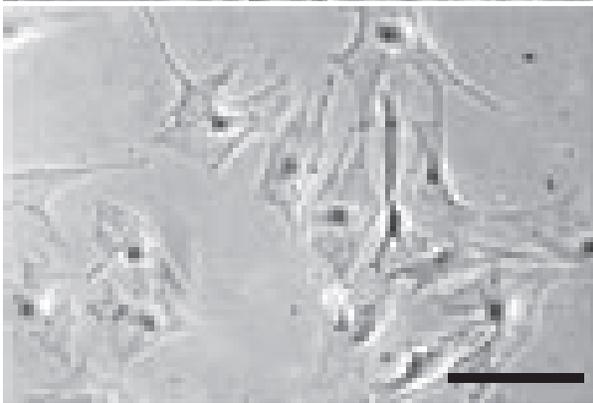
(e) Morphology of cells treated with CCN1.

e

BSA



CCN1

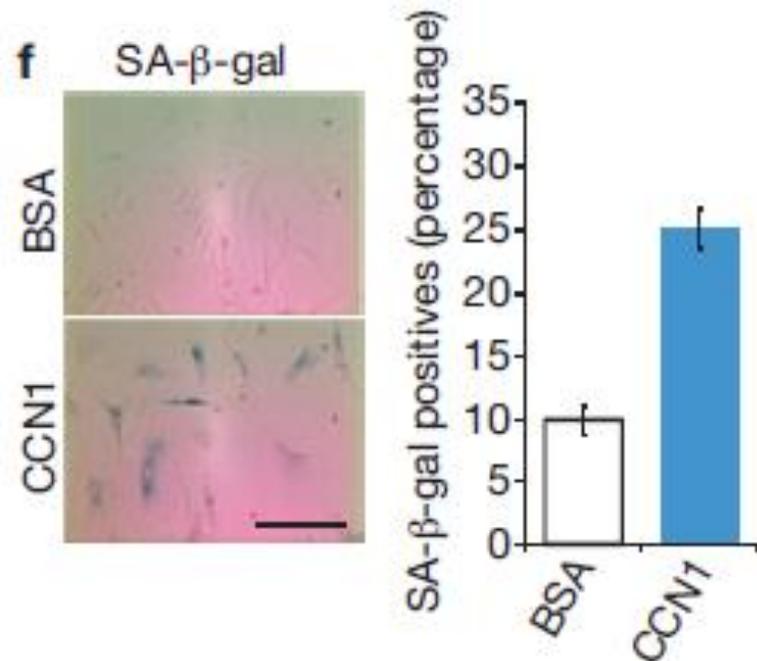


Changement morphologique:
Aspect plus étalé des cellules en présence de CCN1

Expérience 3 :

Figure 3 : Young human BJ fibroblasts were treated with purified recombinant CCN1 protein ($2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$).

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 .



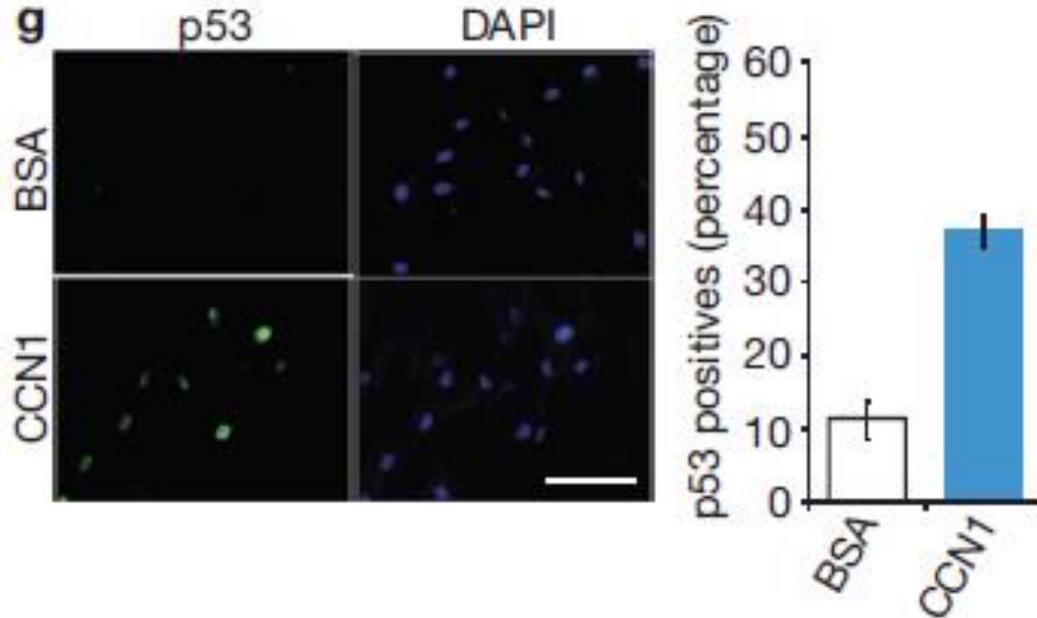
SA- β -gal = senescence-associated β -galactosidase, activité caractéristique des cellules sénescentes

Activité SA- β -gal augmentée en présence de CCN1

Expérience 3 :

Figure 3 : Young human BJ fibroblasts were treated with purified recombinant CCN1 protein ($2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$).

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, $100 \mu\text{m}$.

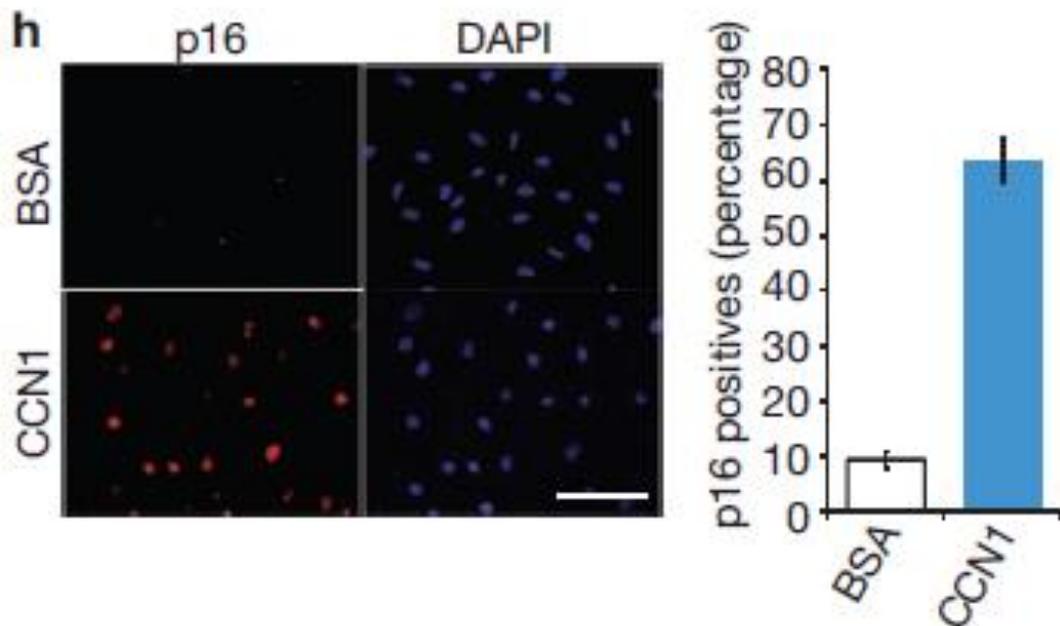


p53 s'accumule dans les cellules en réponse au traitement par CCN1

Expérience 3 :

Figure 3 : Young human BJ fibroblasts were treated with purified recombinant CCN1 protein ($2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$).

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 p16^{INK4a} (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 .



p16= (ou p16^{INK4a} ou CDKN2a)

Famille des cyclin dependent kinase inhibitors

CDKN régulant la transition G1/S

L'expression de p16 est augmentée
, en présence de CCN1

Expérience 4

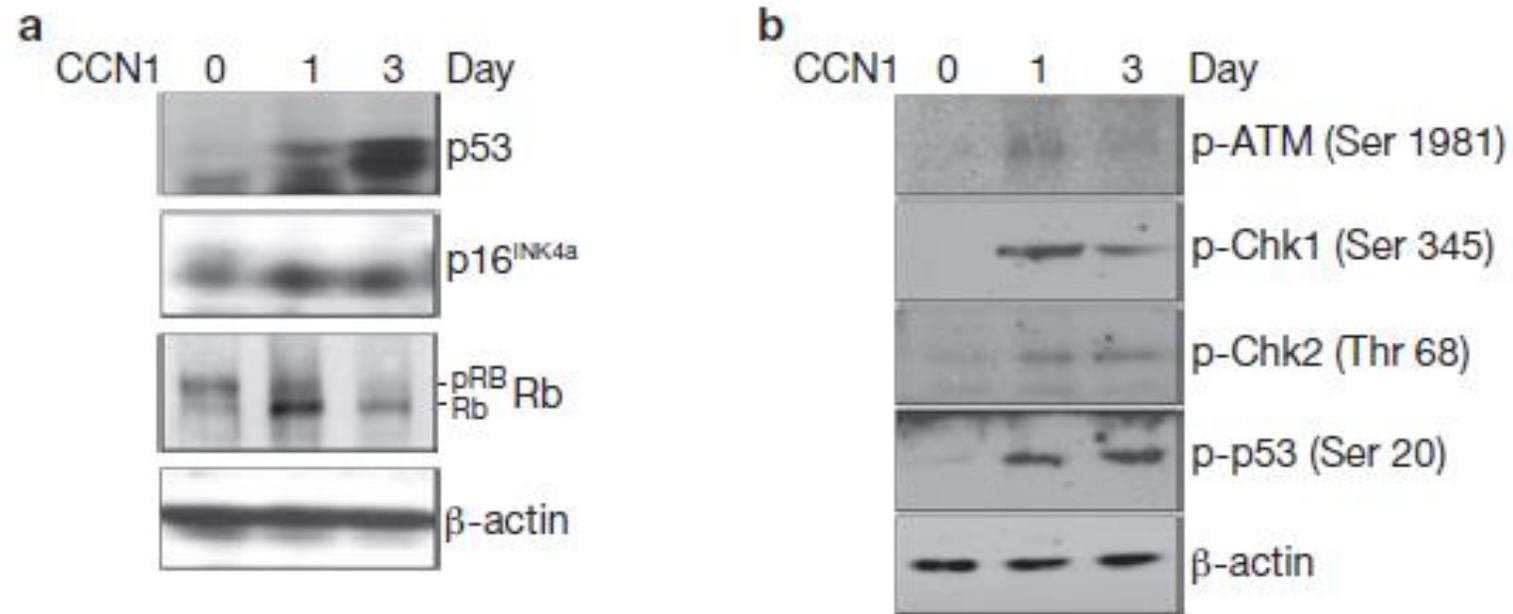


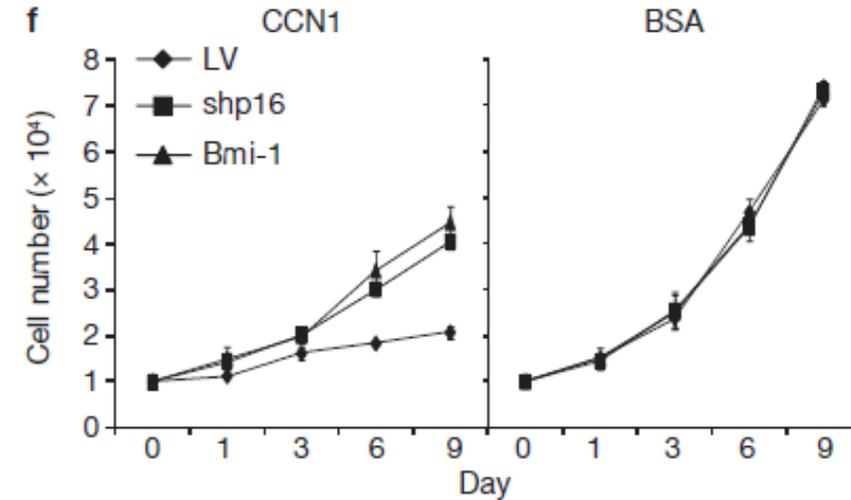
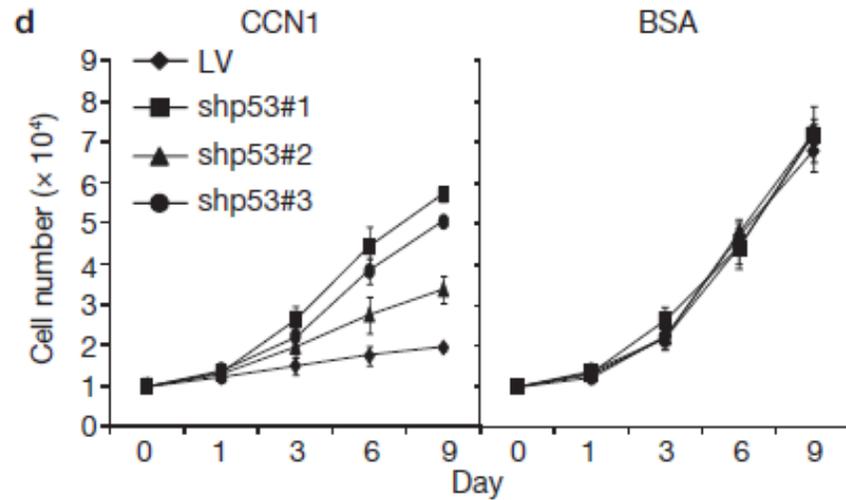
Figure 4 (a, b) BJ cells were treated with CCN1 for the indicated times.

Expression of p53, p16^{INK4a}, 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.

Accumulation de P53, P16, Rb passe d'une forme majoritairement phosphorylée à une forme déphosphorylée.

ATM, chk1 et Chk2 sont phosphorylés en présence de CCN1

Expérience 4



(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.

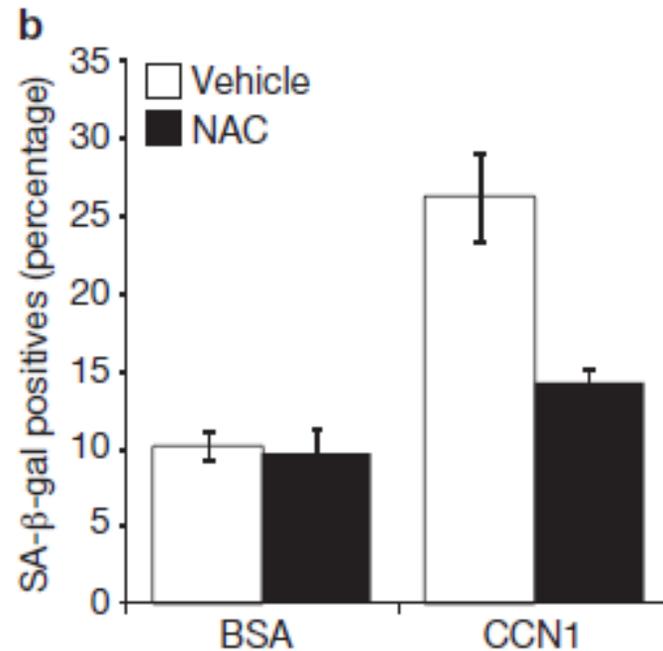
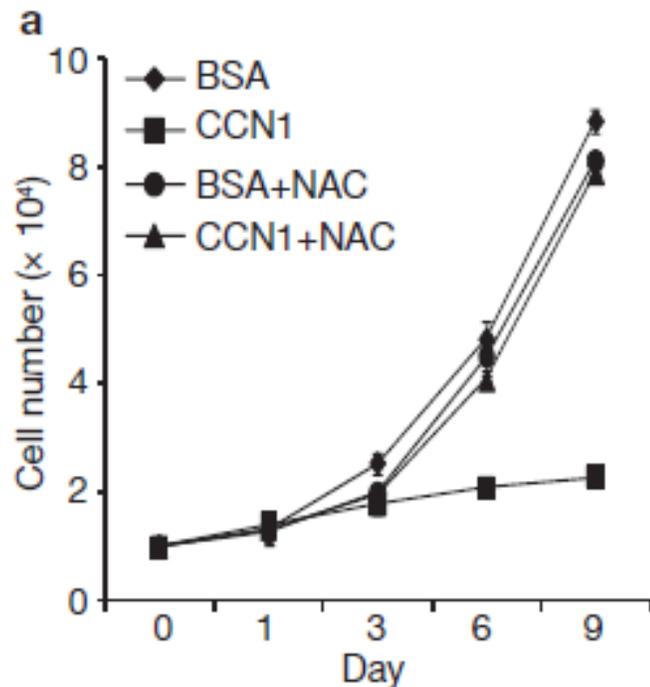
(d) Cells infected were treated with either CCN1 or BSA and cell numbers counted at indicated days.

(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 \pm s.d.

P53 et p16 sont impliqués dans la voie de signalisation permettant l'établissement de la sénescence par CCN1

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.



NAC annule l'effet de CCN1 sur la prolifération cellulaire

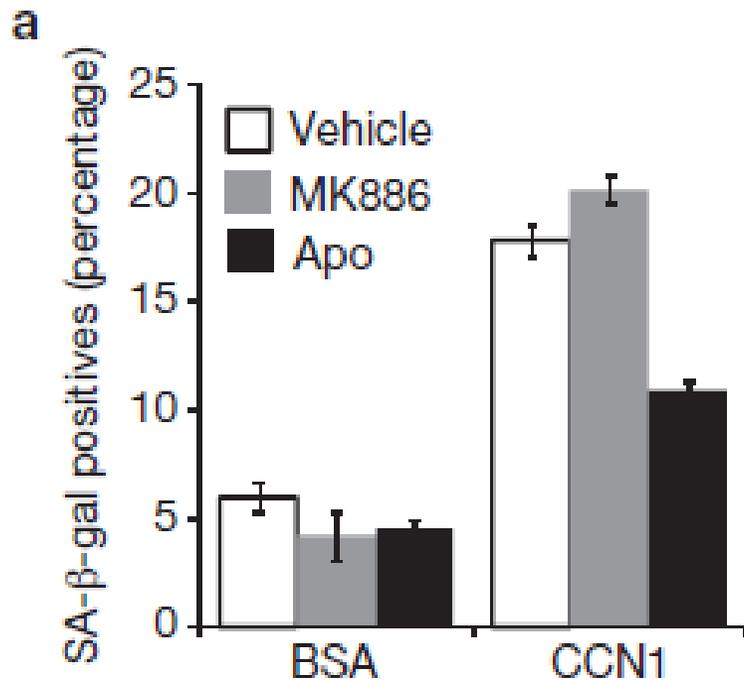
NAC inhibe la sénescence déclenchée par CCN1

NAC= N-acétyl-cystéine = molécule antioxydante

Implication des espèces réactives de l'oxygène dans ce processus

Expérience 5

Figure 5: (c) BJ cells were preincubated for 1 h with inhibitors of 5-LOX (MK886, 5 μ M), NADPH oxidase (apocynin; Apo, 10 μ M) 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.



MK886 : pas d'inhibition de la production d'espèces réactives de l'oxygène

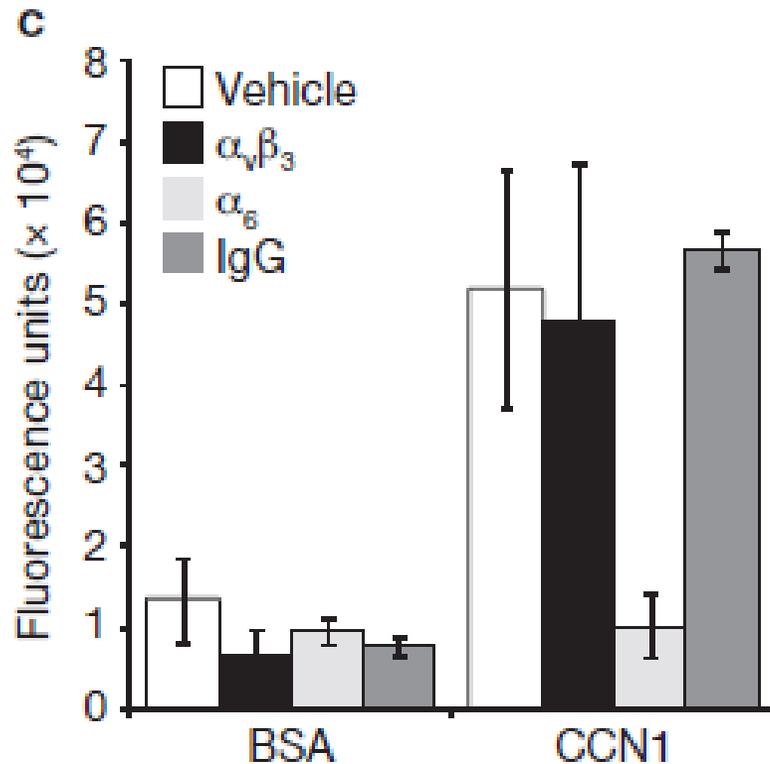
Apocyanine: inhibition significative de la production d'ERO

CCN1 induit l'activation de NADPH oxydases

Lipoxygenases, NADPH oxydases: sources d'E.R.O.

Expérience 5

Figure 5: (d) Cells were pretreated with function-blocking antibodies against $\alpha\beta_3$ integrin or α_6 ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$ each) for 1 h, followed by CCN1 treatment for an additional 1 h and then stained with H2DCF-DA ($10 \mu\text{M}$). ROS was quantified by fluorescence measurements.

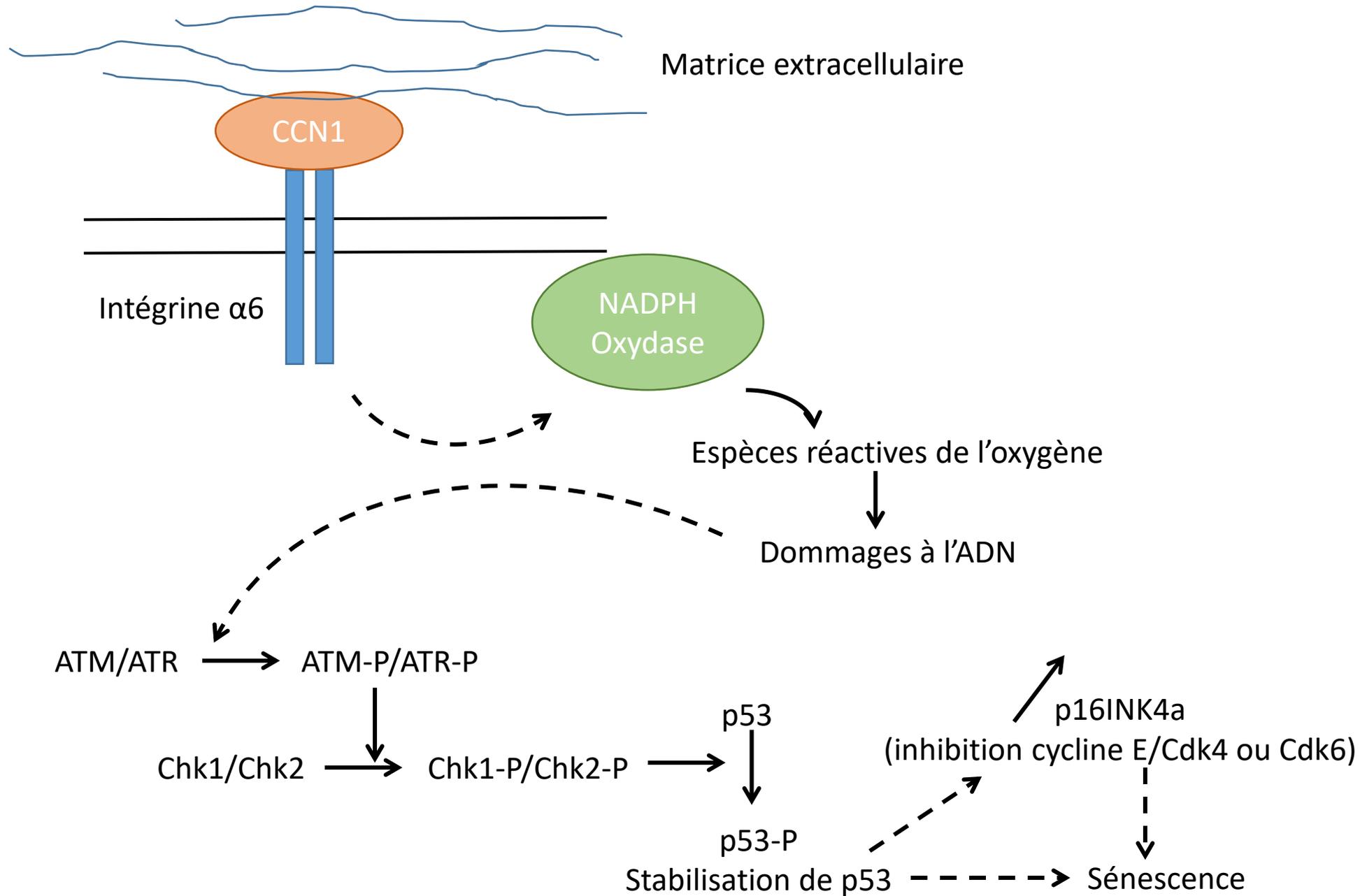


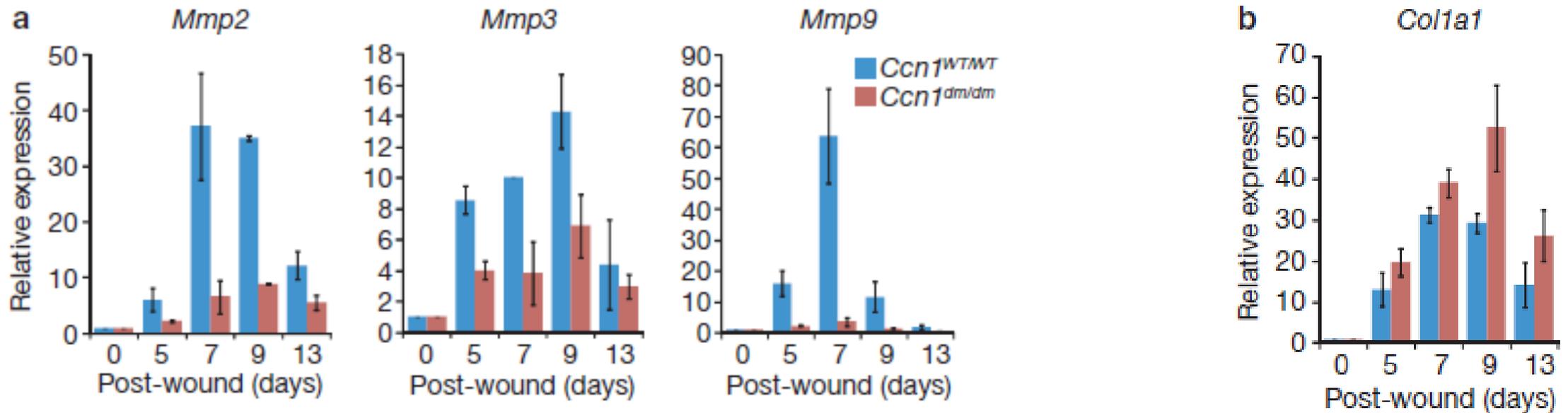
- Blocage de l'intégrine $\alpha\beta_3$:
production d'ERO déclenchée par CCN1 maintenue

- Blocage de l'intégrine α_6 :
le traitement par CCN1 ne déclenche plus la production d'ERO

l'intégrine α_6 : est le récepteur de CCN1

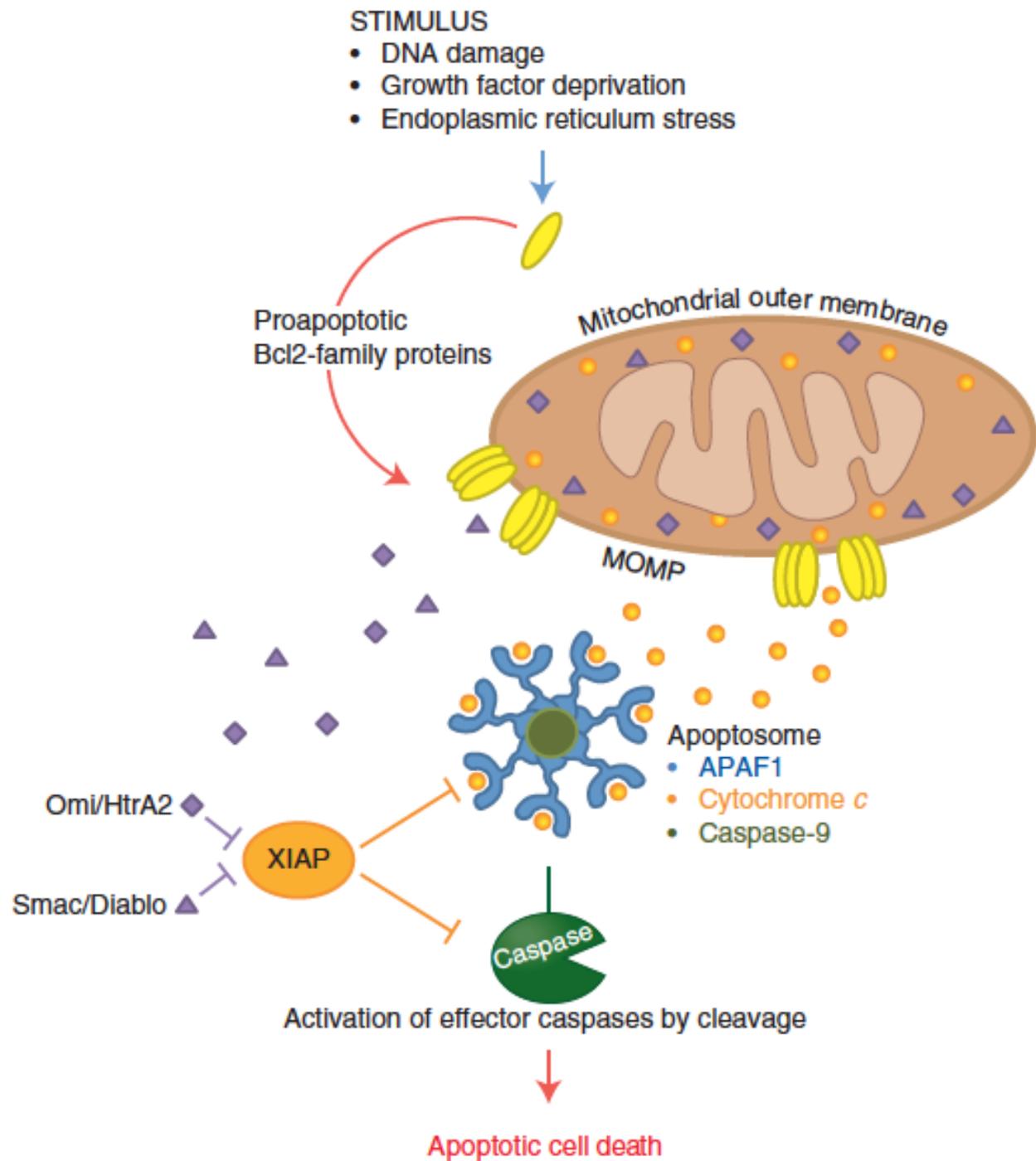
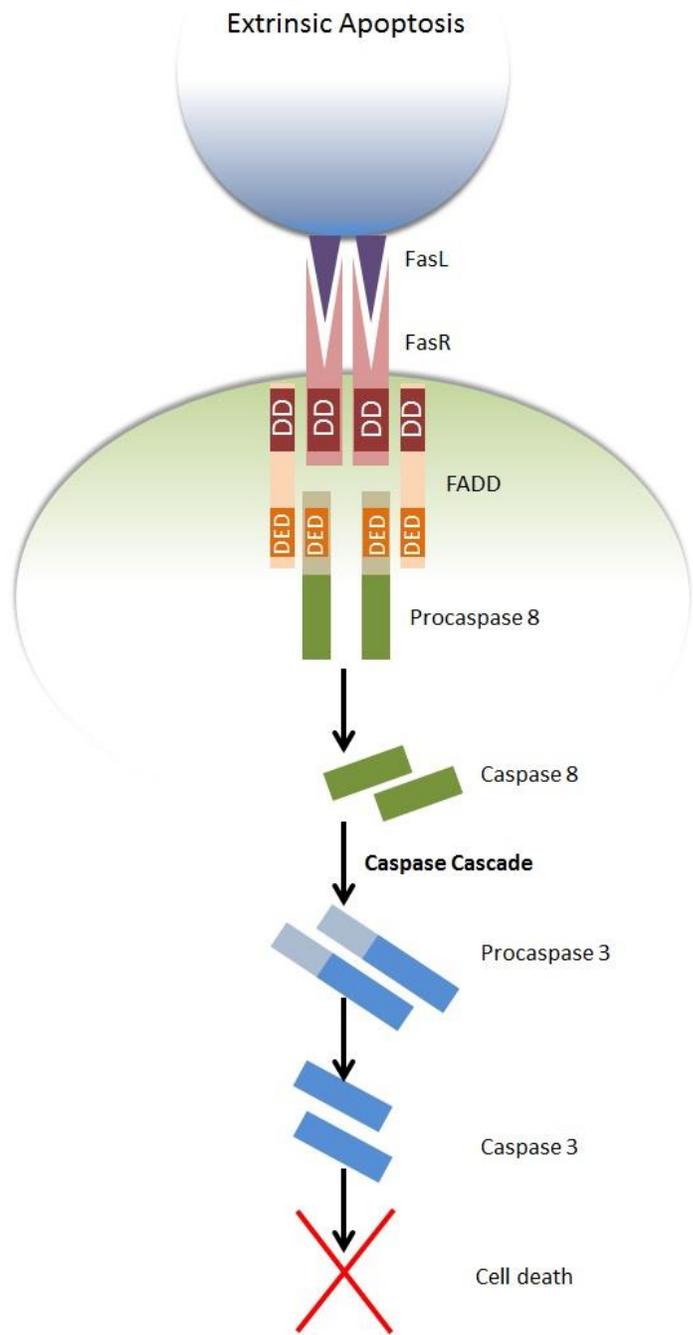
H2DCF-DA: sonde fluorescente sensible aux ERO





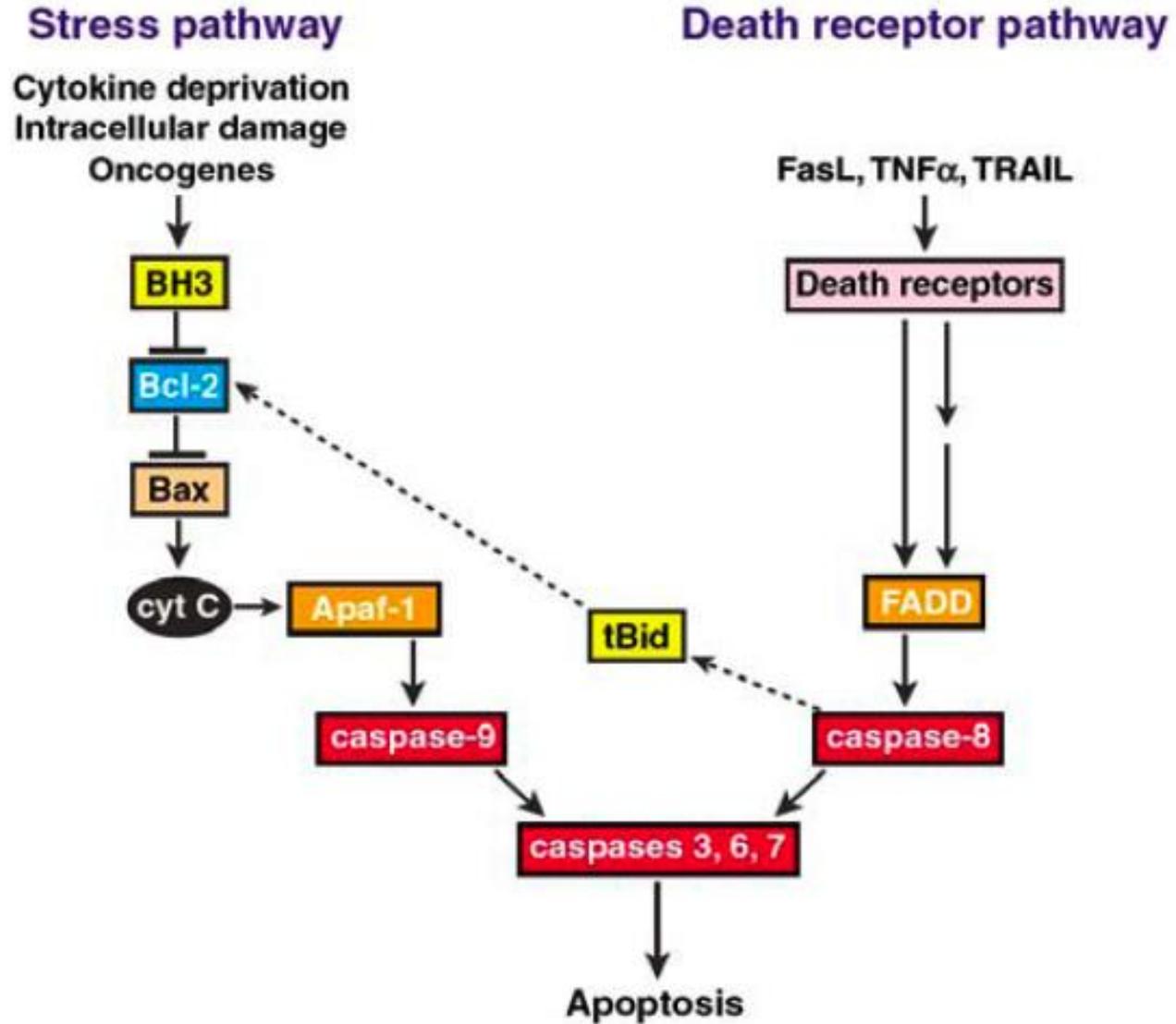
Purified recombinant CCN1 protein (0.1 mg ml⁻¹; 50 µl per dose) in PBS (or PBS alone as a control) was topically applied to excisional wounds of Ccn1dm/dm mice daily. Relative expression of Mmp2, Mmp3 and Mmp9 and Col1a1 in granulation tissues from wild-type and Ccn1dm/dm mice 5–13 days postwounding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

CCN1 favorise la sénescence des fibroblastes, favorise l'expression de molécules antifibrotiques pendant la phase de régénération du tissu: induction de la sénescence dans un but physiologique



REGULATION DE L'APOPTOSE

Relation entre voies mitochondriale et des récepteurs de mort



Fibrose: développement commun aux maladies chroniques du foie

Fibrose = Accumulation excessive de matrice extracellulaire (MEC)

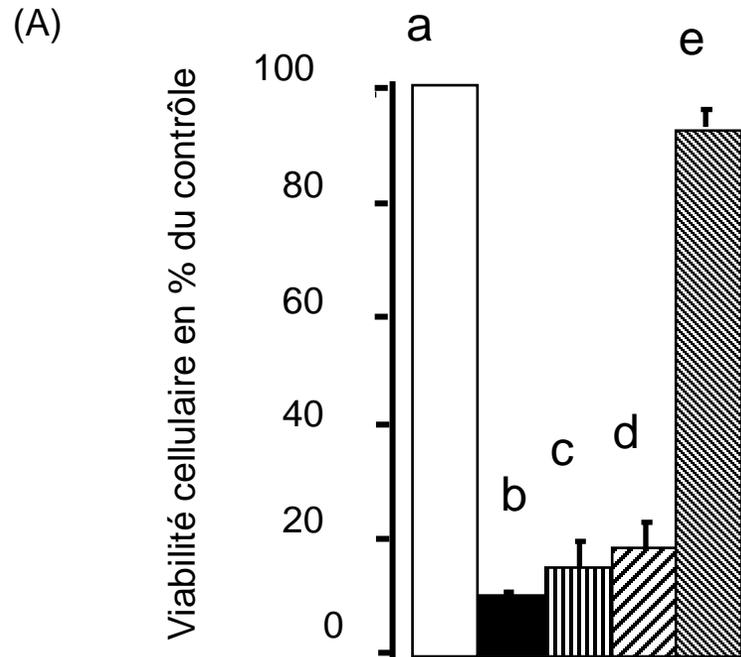
Différenciation de cellules hépatiques en myofibroblastes: synthèse de MEC en grande quantité

Myofibroblastes : expriment les deux récepteurs CB1 et CB2

CB1 et CB2 :- récepteurs couplés à des protéines G

- ligands endogènes et exogènes : THC (affinité égale pour CB1/CB2)
- antagonistes spécifiques de l'un ou l'autre récepteur
- implication dans la prolifération/survie cellulaire

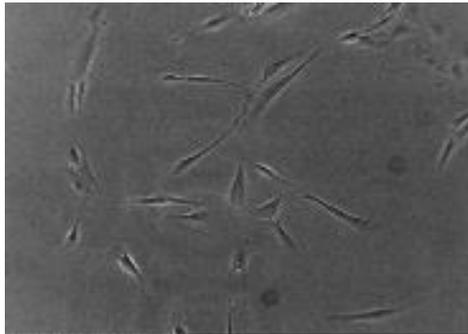
Figure 1 : A) Viabilité des MFh exposés 16 heures à un milieu contrôle (a), à du THC 2 μ M (b), à 2 μ M de THC+ de la toxine pertussique (empêche l'activation des protéines Gi) (c), à du THC 2 μ M + un antagoniste de RCB1 (d) ou à du THC 2 μ M + un antagoniste de RCB2 (e)



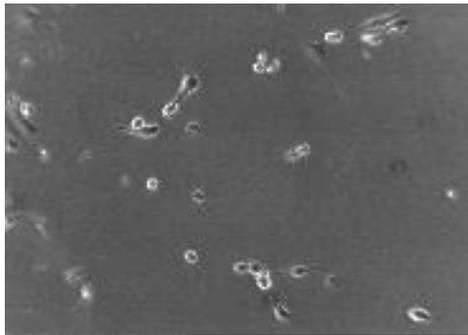
a:contrôle	100% viabilité
b: +THC	THC provoque une forte mortalité
c:THC + T.P.	Pas d'implication de protéines Gi
d: faible viabilité	Pas de rôle de CB1
e: blocage spécifique de CB2	L'activation de CB2 est responsable de la diminution de la viabilité

Figure 1 : B) Micrographie de MFh exposés au milieu contrôle ou 2 μ M de D9THC pendant 16h.

(B)



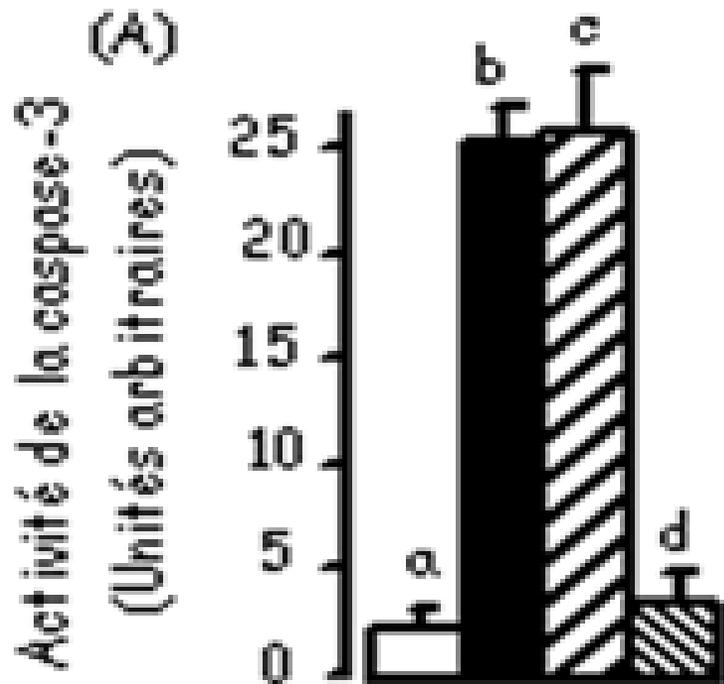
Contrôle



2mM de
D⁹THC

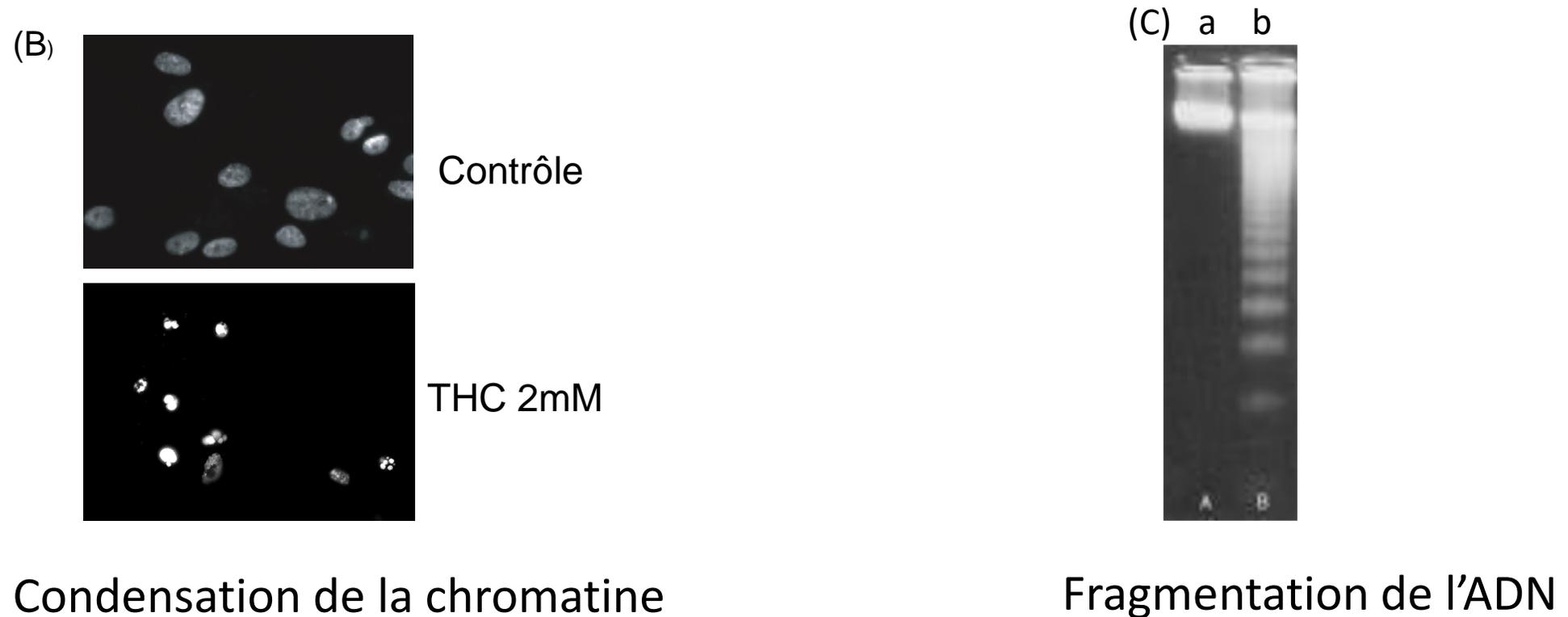
+16h THC, changement de morphologie :
Confirmation de la mortalité des cellules

Figure 2. (A) Mesure de l'activité de la caspase 3 dans les MFh traités pendant 4h avec un milieu contrôle (a), du THC 2mM (b), du THC 2mM + un antagoniste de RCB1 (c), ou du THC 2mM + un antagoniste de RCB2 (d). Des MFh traités 10h avec un milieu contrôle ou par 2 mM 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).



a: contrôle	Activation basale	
b: stimulation par THC	Caspase 3 activée	
c: RCB1 non activable	Caspase-3 activée	Pas d'implication de CB1 dans l'activation de la caspase-3
d: RCB2 bloqué	Inhibition caspase 3	L'activation de CB2 entraine l'activation de la caspase-3

Figure 2. Des MFh traités 10h avec un milieu contrôle ou par 2 mM 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).

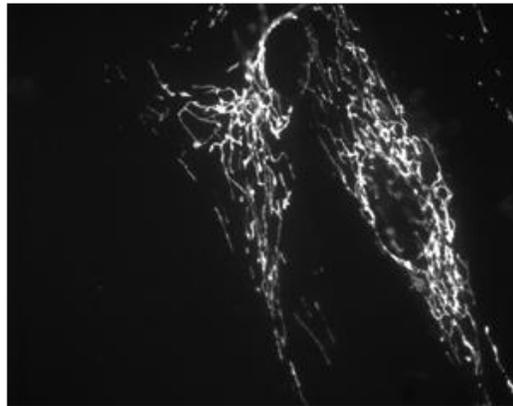


Mort des MFh par apoptose en présence de THC

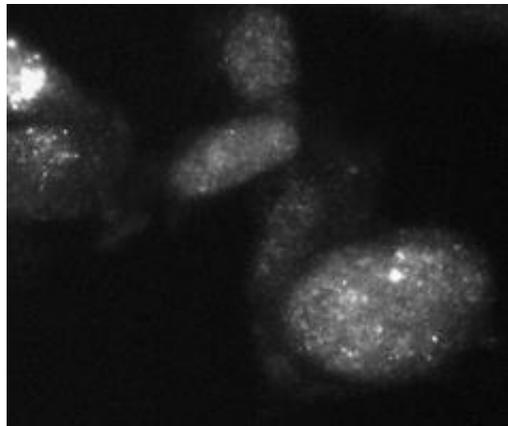
Figure 3. (A) Photos en microscopie à fluorescence de MFh traités pendant 1h avec un milieu contrôle ou avec 2 μ M de THC, puis marqués par un anticorps dirigé contre le cytochrome C.

(A)

Contrôle



THC
2 μ M

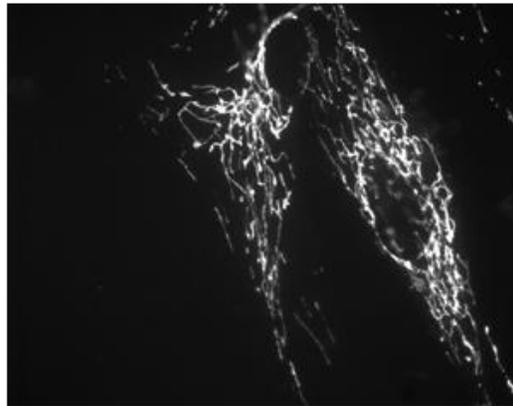


Libération du cytochrome c:
apoptose par la voie intrinsèque

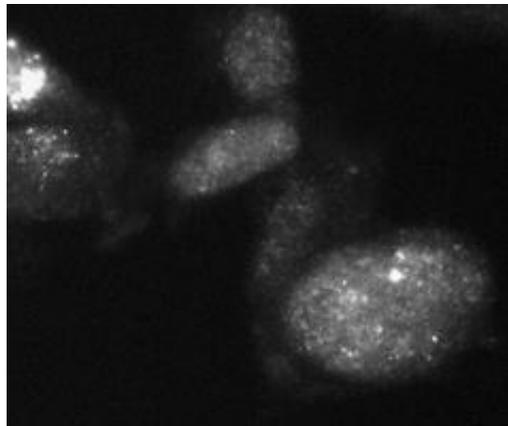
Figure 3. (A) Photos en microscopie à fluorescence de MFh traités pendant 1h avec un milieu contrôle ou avec 2 μ M de THC, puis marqués par un anticorps dirigé contre le cytochrome C.

(A)

Contrôle

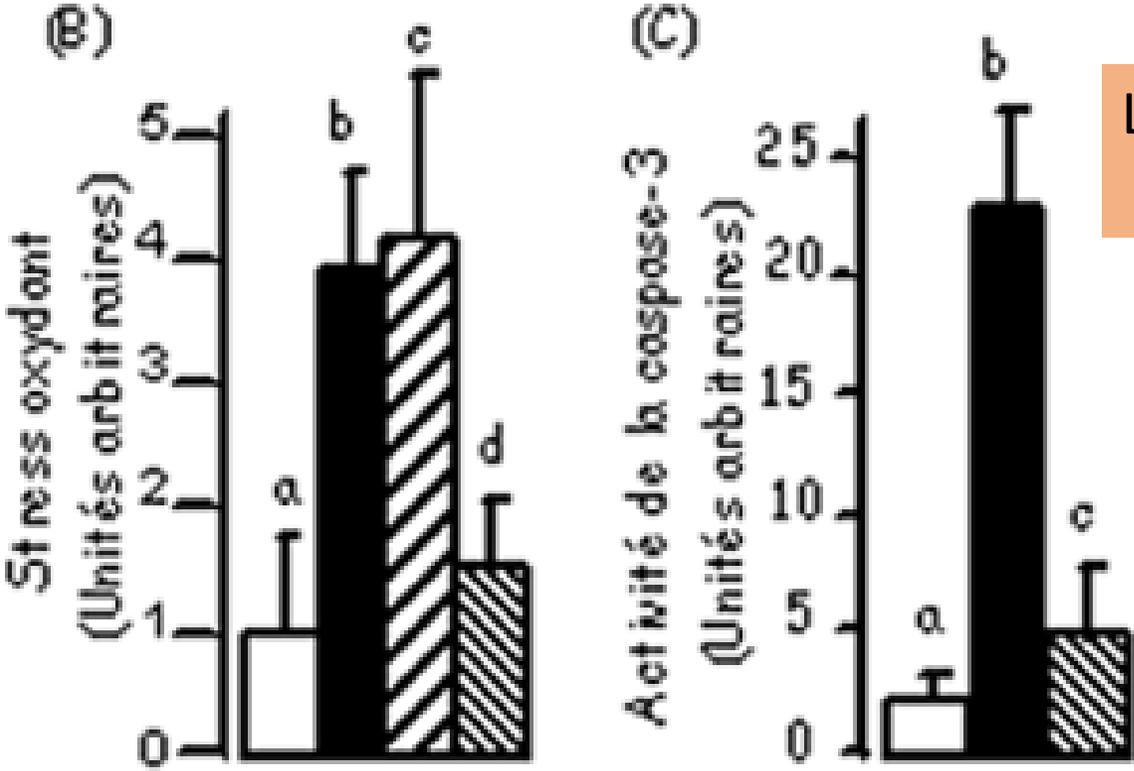


THC
2 μ M



Libération du cytochrome c:
apoptose par la voie intrinsèque

Figure 3. (A) (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 2µM (b), du THC 2µM + l'antagoniste de RCB1 (c) ou du THC 2µM + l'antagoniste de RCB2 (d); **(C)** Mesure de l'activité caspase 3, dans les MFH traités pendant 4h avec avec un milieu contrôle (a), du THC 2µM (b), THC 2µM + un antioxydant (inhibiteur du stress oxydant) (c)



L'activation de CB2 par le THC provoque la production d'espèces réactives de l'oxygène

Le stress oxydant entraîne l'activation de la caspase-3

Q6. schéma représentant l'enchaînement d'évènements cellulaires décrit dans ces expériences depuis le début du traitement avec le THC jusqu'aux effets observés sur les MFh.

Pour remettre les différents évènements analysés dans l'ordre chronologique, on se base sur les temps d'incubations de chaque expérience qui sont les temps optimaux pour obtenir l'effet maximum., et sur les connaissances de cours.

- 1 : liaison ligand récepteur (à 7 passages transmembranaires,
- 2 : (20 minutes) : production d'ERO,
- 3 : 1h, libération du cytochrome c, (constitution de l'apoptosome)
- 4 : 4h, activation de la caspase 3,
- 5 :10h, fragmentation et condensation de l'ADN,
- 6: 16h : perte de viabilité

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-vous chez les souris KO_{CB1} et KO_{CB2} par rapport au sauvage ? Argumentez votre hypothèse.

Absence du récepteur CB2:

moins d'apoptose des MFh, donc développement accéléré de la fibrose

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 atteint d'hépatite C : fumeur quotidien de cannabis versus non fumeur de cannabis.

Q8. Quel résultat attendez vous ? Argumentez.

THC: amélioration de la condition des patients?

Dans la réalité: stimulation du R CB1 par des ligands endogènes: effets mitogènes