

17 décembre 2024

Dynamique cellulaire – Sujet « Cours Magistraux » – Durée 1h
(Dans votre intérêt, répondez de manière brève aux questions)

Le centrosome est composé d'une paire de centrioles enveloppés dans un nuage de protéines qui constituent le matériel péricentriolaire (PCM). Il joue un rôle clé de centre organisateur des microtubules de la plupart des cellules animales et régule divers processus cellulaires comme la prolifération et la différenciation. Des analyses protéomiques réalisées à partir de centrosomes purifiés ont conduit à l'identification de la protéine TACC3. Une équipe de recherche a entrepris d'analyser les conséquences d'une perte de fonction de cette protéine TACC3 dans des cellules cancéreuses HCT116. Les résultats de cette étude sont présentés ci-après.

Des cellules HCT116 ont été transfectées de manière transitoire par des ARN interférant (siRNA) spécifiques de TACC3 (TACC3KD) ou contrôles (Luc esiRNA). Le niveau d'expression de la protéine TACC3 a été analysé par Western-Blot 72 heures après transfection (Figure 1A). La localisation subcellulaire de TACC3 a également été analysée dans ces mêmes cellules par une expérience d'immunofluorescence indirecte (Figure 1B).

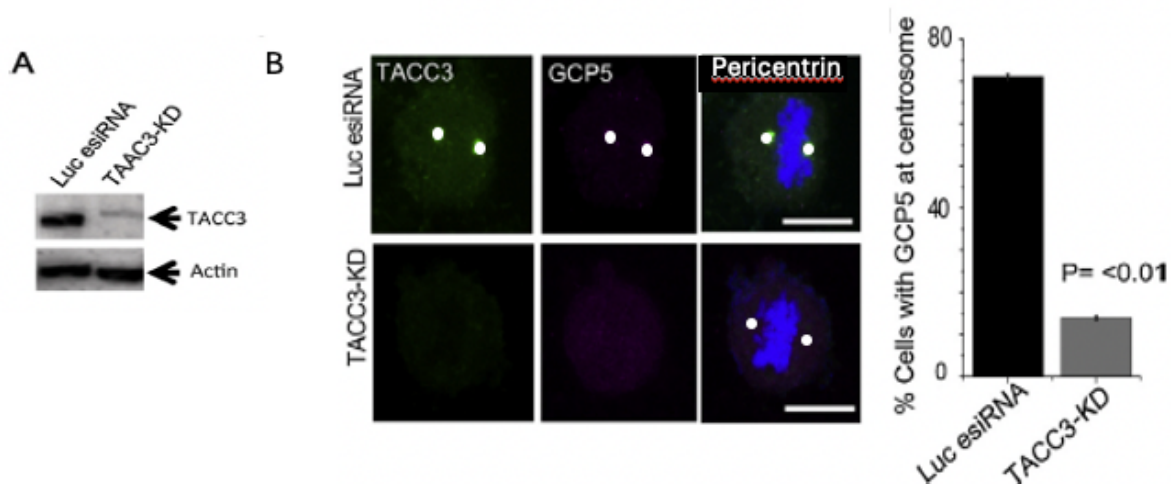


Figure 1. A/ Western-blot comparant les niveaux d'expression de TACC3 dans les cellules contrôles (Luc esiRNA) et TACC3KD. B/ A gauche : Immunofluorescence montrant la localisation subcellulaire dans une cellule en mitose des protéines TACC3 (à gauche) ; GPC5, une protéine connue pour jouer un rôle essentiel pour garantir l'intégrité du centrosome (au milieu) et de la Péricentrine, une protéine du centrosome (à droite). Les points « blancs » correspondent au marquage d'immunofluorescence. Sur l'image de droite la zone grisée correspond à un marquage au DAPI de l'ADN. A droite : Quantification du % de cellules avec une localisation de GPC5 au niveau des centrosomes.

Question 1. Que montrent ces résultats (3 conclusions attendues) ? (3 pts)

La figure 1A montre que les niveaux d'expression de la protéine TAAC3 sont diminués dans les cellules transfectées de manière transitoire par des ARN interférant (siRNA) spécifiques de TACC3 (TACC3KD). Le knock-down de TAAC3 a donc marché !

La figure 1B montre que dans les cellules contrôles, la protéine TACC3 est colocalisée avec GCP5 et Péricentrin au niveau du centrosome.

La figure 1B montre que la perte d'expression de TACC3, entraine une perte d'expression de la protéine GPC5.

Question 2. Quelle hypothèse pouvez-vous formuler pour expliquer ces résultats ? (1pt)

TACC3 est nécessaire à l'expression de GPC5 (ou à sa localisation au niveau des centrosomes).

Une analyse par FACS du cycle cellulaire a été réalisée sur les cellules HCT116 TACC3KD et HCT116 contrôles 72 heures après la transfection (Figure 2A). Une expérience de marquage au BrdU a également été réalisée sur ces mêmes cellules (Figure 2B).

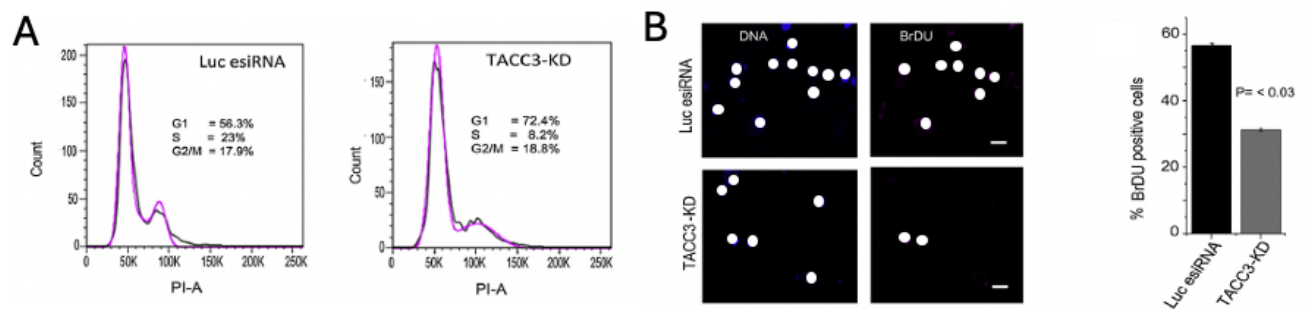


Figure 2 : A/ 72heures après transfection, les cellules HCT116 TACC3KD et contrôles ont été fixées, perméabilisées et marquées à l'iodure de propidium (PI), un intercalant fluorescent de l'ADN avant passage au FACS. Le pourcentage de cellules en phases G1, S et G2 ou M (G2/M) sont respectivement (G1 :56,3%, S :23%, G2/M : 17,9%) pour les cellules LucesiRNA et (G1 :72,4 %, S :8,2%, G2/M : 18,8%) pour les cellules TACC3-KD. B/ A gauche : Image de microscopie confocale montrant un marquage au DAPI (colonne de gauche) et BrdU (colonne de droite) des cellules HCT116 TACC3KD (en bas) et contrôles (en haut). Les points « blancs » indiquent les cellules positives pour le marquage. A droite : quantification des résultats.

Question 3. Quelle conséquence a la perte de fonction de TACC3 sur le déroulement du cycle cellulaire ? (2 pts)

La perte de fonction de TAAC3 entraine un blocage des cellules en G1.

Les niveaux d'expression de la protéine p53 ont été examinés par Western-blot dans ces mêmes cellules en utilisant un anticorps spécifique de la forme activée (Figure 3A).

Question 4. Pourquoi est-il judicieux d'analyser les niveaux de la forme activée de la protéine p53 ? (3 pts)

P53 est un facteur de transcription qui est stabilisé et activé en réponse à divers stress cellulaires et qui peut induire un arrêt du cycle cellulaire.

La perte de TACC3 entraîne un arrêt du cycle en G1 qui pourrait être la conséquence d'un stress cellulaire lié à un dysfonctionnement des centrosomes.

Il est possible que cet arrêt du cycle cellulaire en G1 soit la conséquence de l'activation de p53.

Question 5. Que montrent les résultats de la figure 3A ? (1 pt)

Les résultats de la figure 3A indiquent que la diminution d'expression de TACC3 entraîne une légère augmentation de la forme activée de p53.

L'effet sur le cycle cellulaire de la perte de fonction de TACC3 a été analysé dans des cellules HCT116 p53+/+ et HCT116 p53-/- (p53 KO). Les résultats d'une analyse par FACS réalisée dans les mêmes conditions que précédemment sont présentés dans la figure 3B.

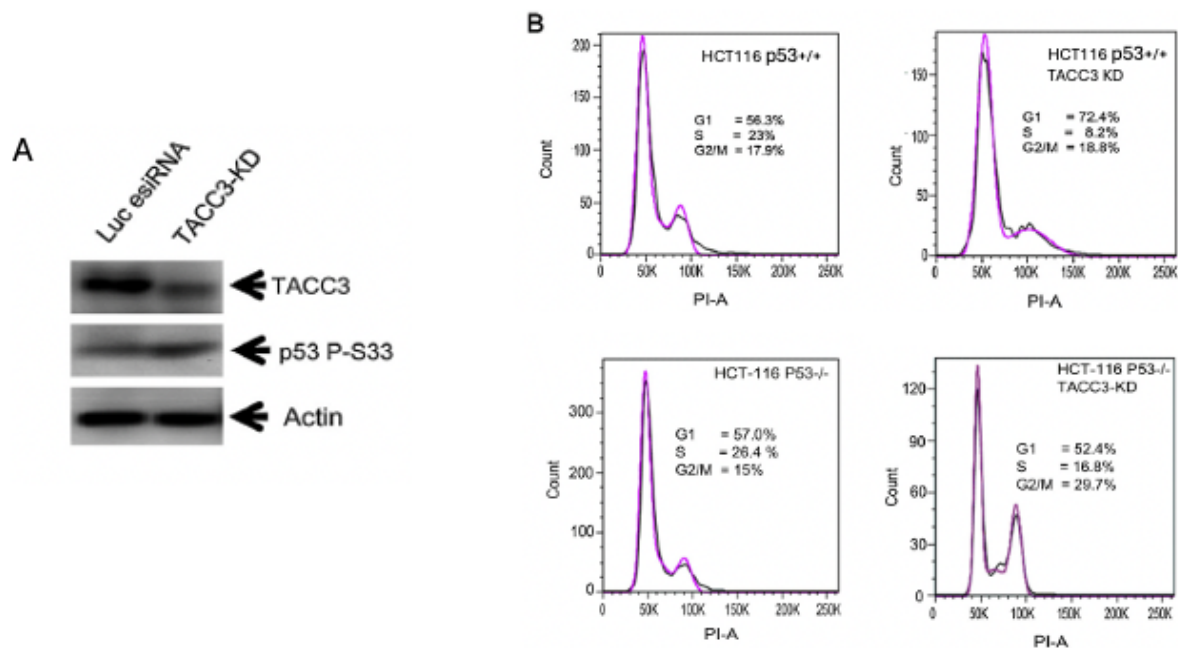


Figure 3 : A/ Western-blot comparant les niveaux d'expression de TACC3 et d'une forme activée de p53 (p53 P-S33) dans les cellules HCT116 p53+/+ contrôles (Luc esiRNA) et TACC3KD. B/ 72heures après transfection, les cellules HCT116 des différents génotypes ont été fixées, perméabilisées et marquées à l'iodure de propidium (PI), un intercalant fluorescent de l'ADN avant passage au FACS.

Question 6. Qu'indiquent les résultats de la figure 3B (3 conclusions attendues) ? (3 pts)

Comparaison HCT116 p53+/+ vs HCT116 p53+/+ TACC3 KD :

Comme vu précédemment, la perte d'expression de TACC3 entraîne un arrêt du cycle en G1 dans un contexte p53+/+. Ce résultat indique que TACC3 est nécessaire au bon déroulement du cycle cellulaire.

Comparaison HCT116 p53+/+ vs HCT116 p53-/- :

Dans un contexte TACC3 sauvage, la perte d'expression de p53 n'a pas d'effet notable sur le cycle cellulaire. Ce résultat indique que p53 n'est pas nécessaire au bon déroulement du cycle cellulaire dans les HCT116 avec des niveaux d'expression normaux de TACC3.

Comparaison HCT116 p53+/+ TACC3 KD vs HCT116 p53-/- TACC3 KD:

L'arrêt du cycle en G1 qui était observé dans un contexte TACC3 KD p53+/+, n'est plus observé dans un contexte p53 -/-. Ce résultat indique que l'arrêt du cycle en G1 observé en contexte TACC3 KD dépend de p53.

pt bonus s'il est mentionné que la perte d'expression de TACC3 dans un contexte p53-/- semble entraîner un arrêt du cycle en G2 ou M.

L'effet sur l'apoptose de la perte de fonction de TACC3 a également été analysé dans des cellules HCT116 p53+/+ et HCT116 p53-/- (Figure 4).

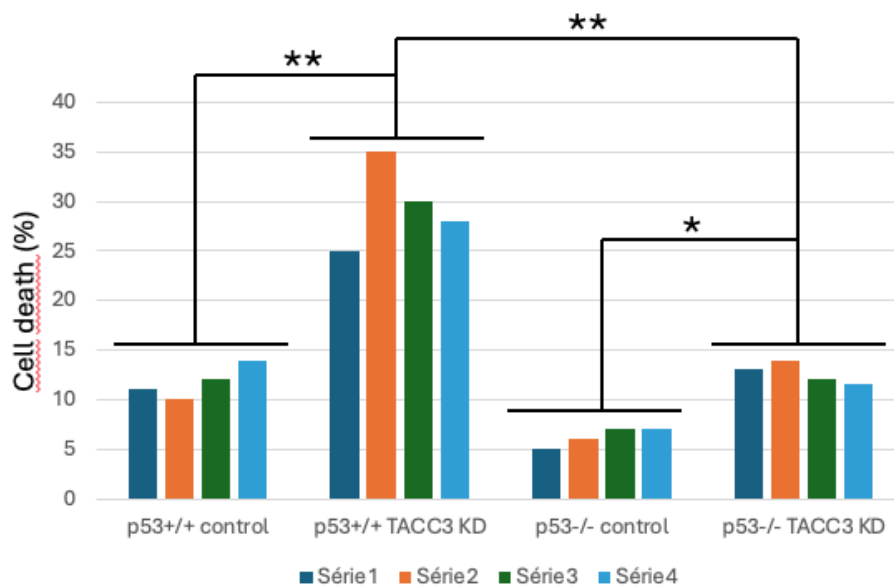


Figure 4 : Résultats d'une quantification du pourcentage de cellules apoptotiques de cellules HCT116 p53+/+ et HCT116 p53-/- avec (TACC3KD) ou sans (control) inhibition de l'expression de TACC3. L'expérience a été répétée 4 fois et des tests statistiques ont été réalisés (* : p value <0.05 ; ** : p value <0.01)

Question 7. Qu'indiquent les résultats de la figure 4 (3 conclusions attendues) ? (3 pts)

Comparaison p53+/+ control vs p53+/+ TACC3 KD :

La perte de TACC3 dans un contexte p53+/+ induit l'apoptose.

Comparaison p53+/+ TACC3 KD vs p53-/- TACC3 KD :

L'induction de l'apoptose observée en absence de TACC3 dans un contexte p53+/+ n'est plus observée dans un contexte p53-/-. Ceci indique que l'apoptose induite en absence de TACC3 dépend de p53.

Comparaison p53-/- control vs p53-/- TACC3 KD :

La perte d'expression de TACC3 dans un contexte p53-/- entraîne une légère augmentation de l'apoptose qui est par essence indépendante de p53.

L'effet sur l'apoptose de la perte de fonction de TACC3 a également été analysé dans des cellules HCT116 en contexte de perte de fonction pour p21 (p21-KD TACC3-KD) (Figure 5).

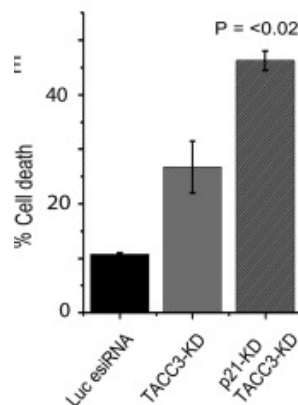


Figure 5 : Résultats d'une quantification du pourcentage de cellules apoptotiques de cellules HCT116 p53+/+ contrôles, avec inhibition de l'expression de TACC3 (TACC-3KD) et avec inhibition de l'expression de TACC3 et p21 (p21-KD TACC3-KD). L'expérience a été répétée 4 fois. Des différences statistiques avec une p value < 0.05 ont été observées pour toutes les comparaisons 2 à 2 possibles.

Question 8. Rappelez le rôle de p21 et son lien avec la protéine p53 (2 pts).

P21 est une protéine inhibitrice de complexes cyclines/CDK.

Le gène qui code p21 est un gène cible de p53.

Question 9. Qu'indiquent les résultats de la figure 5 ? (2 pts)

Comparaison TACC3KD vs p21KD et TACC3KD : L'induction de l'apoptose liée à la perte de TACC3 est encore plus importante dans un contexte perte de fonction pour p21 (p21KD). Ceci indique que dans le contexte TACC3KD, p21 favorise la survie cellulaire.