

Prix FNG -Servier

19^{ème} édition

7 octobre 2010

1^{er} Prix

Mariko TAGA

Modulation de l'activité de p70S6K et de la toxicité de H₂O₂ par l'acide phosphatidique dans les cultures de neuroblastomes SH-SY5Y

Institut du fer à Moulin UMR-S 839

Directeur de l'Institut : Jean-Antoine Girault

Directeur de stage : Jacques Hugon

2^{èmes} prix Ex Aequo

Thibault BUCZKOWSKI

Etude du contrôle de la différenciation des cellules souches de la moelle osseuse par la N-cadhérine.

Mémoire réalisé sous la direction du Dr Eric HAY
Hôpital Lariboisière, INSERM U606 Os et Articulations

Equipe 1 : Biologie et pathologie de l'Ostéoblaste

Directeur d'équipe : Dr Pierre MARIE

Directeur d'unité : Pr M6C de VERNEJOU

Christelle MOGES

Etude des mécanismes moléculaires du transport de fer dans le rein dans deux modèles physiopathologiques de surcharge en fer

INSERM U773- Faculté de médecine Xavier Bichat

Equipe « Fer et synthèse de l'hème »

Directeur d'équipe : Dr Carole Beaumont

Maître de stage : Dr Zoubida Karim

Modulation de l'activité de p70S6K et de la toxicité de H₂O₂ par l'acide phosphatidique dans les cultures de neuroblastomes SH-SY5Y

Mariko TAGA

Institut du fer à Moulin UMR-S 839

Directeur de l'Institut : Jean-Antoine Girault

Directeur de stage : Jacques Hugon

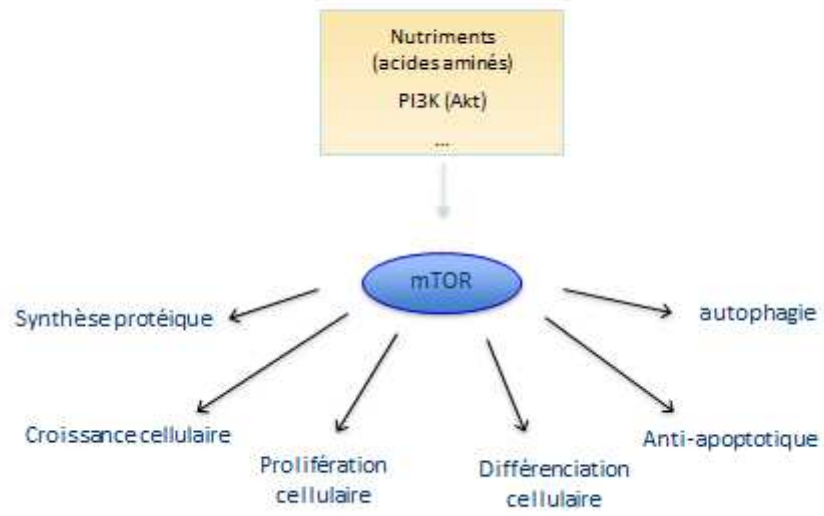
Contexte : La voie PI3K/Akt/mTOR, est une voie de signalisation intracellulaire ayant un rôle central dans la régulation de la croissance cellulaire, dans la prolifération, dans la synthèse protéique et dans la survie cellulaire. Cette voie métabolique fait intervenir la protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), présente sous deux formes de complexes moléculaires structurellement et fonctionnellement bien distincts : mTORC1 et mTORC2. Seul le complexe mTORC1 est impliqué dans la régulation de la synthèse protéique en activant la protéine kinase p70S6K et peut être stimulé par certains facteurs de croissance, d'acides aminés ou par des éléments nutritifs tels que l'acide phosphatidique (PA). Plusieurs études ont révélées une modification de l'activité du complexe mTORC1 en présence de stress tel que le stress oxydant. Il a été ainsi observé un dérèglement de l'activité du complexe mTORC1 chez les cellules soumises aux stress A β et stress oxydant, dans le cortex de souris transgéniques APP (Amyloid Precursor Protein) / PS1 (Presenelin 1) et dans le cerveau des patients atteints de maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington). La fonction biochimique de la voie mTOR/p70S6K est donc modifiée chez les patients atteints de maladies neurodégénératives et cette altération pourrait être un facteur aggravant la mort neuronale observée chez ces patients.

Objectif : L'objectif est d'étudier dans les cellules de la lignée de neuroblastomes humains SH-SY5Y. La stimulation de la voie mTOR par l'acide phosphatidique (PA), peut réduire les effets pro-apoptotiques induits par le stress oxydant et ainsi conduire à l'atténuation de la dégénérescence cellulaire.

Résultats : L'analyse de l'expression de la forme phosphorylée de p70S6K par la technique du Western Blot a montré une augmentation significative de l'activité de mTORC1 en présence de 200 μ M de PA. Cette activité est diminuée en présence de 0.5mM de peroxide d'hydrogène (H₂O₂). De plus, les cellules traitées par PA puis exposées au H₂O₂ présentent une augmentation significative de l'activité de mTORC1 par rapport aux cellules traitées par le stress seul. Le prétraitement par PA a permis donc le maintien de l'activité de la voie mTOR/p70S6K dans les cellules soumises au stress. D'autre part, l'analyse de l'expression de la forme clivée de PARP, substrat clivé par la caspase 3 lors de l'apoptose, a permis de montrer une diminution de la forme clivée de PARP en présence de PA alors qu'elle est augmentée en présence de H₂O₂. Le prétraitement par PA suivi du traitement par H₂O₂ a permis d'obtenir une diminution significative de l'apoptose en comparaison avec les cellules traitées par H₂O₂ seul. Ces résultats obtenus ont donc permis de proposer que le PA, en préservant l'activité de mTORC1 et en réduisant l'apoptose, atténue la toxicité du stress oxydant.

Perspectives : Dans cette étude, nous avons obtenus des résultats permettant de mettre en évidence l'effet protecteur de PA contre la toxicité du stress oxydant. Ce dernier étant impliqué dans de nombreuses pathologies du système nerveux central, il serait intéressant de continuer notre étude dans des cultures primaires de neurones puis sur des modèles des souris transgéniques Alzheimer. Il est aussi envisagé d'utiliser d'autres éléments capables de stimuler mTOR tels que la leucine, la citrulline ou un analogue de PA comme la fluorométhylène et voir leurs effets sur la modulation de la toxicité du stress oxydant et la toxicité de peptide A β .

Activation et Fonctions de la Voie mTOR



Etude du contrôle de la différenciation des cellules souches de la moelle osseuse par la N-cadhérine.

Thibault BUCZKOWSKI

Mémoire réalisé sous la direction du Dr Eric HAY
Hôpital Lariboisière, INSERM U606 Os et Articulations
Equipe 1 : Biologie et pathologie de l'Ostéoblaste
Directeur d'équipe : Dr Pierre MARIE
Directeur d'unité : Pr M6C de VERNEJOUL

Au cours du vieillissement l'activité de la population de cellules ostéoblastiques, capables de régénérer la matrice osseuse, diminue au profit de la population de cellules adipogénique. Ceci contribue à diminuer la formation osseuse et à fragiliser le squelette. Ces deux lignées cellulaires étant issues des cellules souches mésenchymateuses de la moelle, connaître leurs mécanismes de différenciation pourrait permettre de stimuler la production d'ostéoblastes, réduisant ainsi la perte osseuse chez le sujet âgé.

La voie de signalisation Wnt, très impliquée dans le développement tissulaire et tumoral, a la capacité de stimuler la différenciation des ostéoblastes. Les protéines Wnt se fixent sur les récepteurs Frizzled et LRP5, déclenchant la translocation du co-facteur de transcription β -caténine dans le noyau. La β -caténine permet alors l'activation des gènes impliqués dans l'ostéoblastogenèse. Les travaux du laboratoire ont montré qu'une molécule d'adhésion cellulaire, la N-cadhérine, inhibe la voie Wnt en se fixant sur LRP5, bloquant la prolifération des ostéoblastes.

Le but de cette étude était d'étudier l'effet de la N-cadhérine sur la différenciation adipogénique et ostéoblastique des cellules souches mésenchymateuses, *in vivo* et *in vitro*.

L'étude de la moelle de souris transgéniques a permis de montrer que la surexpression de la N-cadhérine dans les ostéoblastes stimule l'adipogenèse médullaire *in vivo*.

In vitro, la surexpression de la N-cadhérine dans des cellules souches mésenchymateuses murines et humaines a permis de confirmer cet effet : la surexpression de la N-cadhérine augmente l'expression des gènes adipogéniques et l'adipogenèse, tout en diminuant l'expression des gènes ostéoblastiques et l'ostéoblastogenèse.

La transfection avec des constructions de la N-cadhérine tronquée a permis de montrer que l'effet anti-ostéoblastique de la N-cadhérine est Wnt-dépendant alors que son effet pro-adipogénique est Wnt-indépendant.

Les voies de signalisation impliquées dans cet effet restent à identifier, ainsi que son impact sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses *in vivo* au cours du vieillissement. Ces données ouvrent la voie à des recherches thérapeutiques visant à modifier les interactions entre la N-cadhérine et la voie Wnt pour contrôler la différenciation ostéoblastique et adipogénique altérée par le vieillissement. Cette approche offre de nouvelles perspectives médicales dans le cadre de la lutte contre la fragilisation osseuse des personnes âgées.

Etude des mécanismes moléculaires du transport de fer dans le rein dans deux modèles physiopathologiques de surcharge en fer

Christelle MOGES

INSERM U773- Faculté de médecine Xavier Bichat

Equipe « Fer et synthèse de l'hème »

Directeur d'équipe : Dr Carole Beaumont

Maître de stage : Dr Zoubida Karim

Le fer est un élément vital, qui contribue à de nombreux processus métaboliques, incluant la synthèse d'hème, et donc d'hémoglobine. Cependant, l'excès de fer est toxique, de part ses propriétés réactives. L'intestin et les macrophages sont considérés comme des sites importants de contrôle de la concentration plasmatique du fer.

Des études récentes ont suggéré que le rein pourrait contribuer à cet équilibre en excréant l'excès de fer ou d'hème dans les urines. En effet, l'excrétion de fer et son accumulation rénale sont régulièrement observées dans des maladies hémolytiques ou dans des pathologies rénales diverses.

Le but de cette étude est de déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels le rein transporte et accumule le fer dans des conditions normales et pathologiques. Pour cela, nous avons utilisé deux modèles de souris. Le premier est un modèle de porphyrie érythropoïétique congénitale (C.E.P.) caractérisé par un trouble de biosynthèse de l'hème conduisant à une hémolyse chronique, et le second est un modèle invalidé pour l'hepcidine, caractérisé par un trouble du métabolisme du fer (hepc-/-).

Chez les souris C.E.P., l'analyse histologique montre une accumulation de fer dans le cortex rénal. Les niveaux d'expression en ARNm et en protéine de la ferroportine (FPN, responsable de l'export du fer) et de l'hème-oxygenase-1 (HO-1, responsable du catabolisme de l'hème) sont augmentés. Cependant, les niveaux d'expression de DMT-1 (Divalent metal transporter 1) et du récepteur à la transferrine (TfR1) qui sont tous deux responsables de l'entrée de fer dans les cellules, sont peu ou pas modifiés. Ces données suggèrent que l'accumulation de fer dans le rein chez les souris C.E.P. est médiée par l'entrée d'hème et/ou d'hémoglobine dans les tubules proximaux.

Chez les souris hepc-/-, l'accumulation de fer a été observée dans la médullaire rénale. Le niveau d'ARNm de la ferroportine est augmenté alors que le niveau d'expression en ARNm et en protéine de DMT-1 et TfR1 sont diminués.

Enfin, la teneur en ARNm de l'érythropoïétine, l'hormone qui stimule l'érythropoïèse, est diminuée.

Nous concluons qu'il y a dans le rein une régulation spécifique de l'acquisition du fer et de l'hème. La réabsorption du fer et sa régulation dans les cellules tubulaires sont probablement responsables de la synthèse de l'érythropoïétine.