

UE « Biologie des cancers »
Sujet d'Examen - 07/05/2023
Temps 2h

Barème sur 50 points

Remarque : Il est conseillé de répondre de manière brève et concise

I

Le cancer est un problème de santé publique majeur. En dépit d'une meilleure prévention et de traitements plus efficaces, le nombre de nouveaux cas de cancers ne cesse d'augmenter notamment en raison du vieillissement de la population mondiale. Les processus liés au vieillissement et au cancer incluent un environnement inflammatoire entraîné par des cellules sénescentes.

Q1/ Donnez en quelques lignes une définition de la sénescence répllicative. (3 pts)

Q2/ Expliquez brièvement comment un environnement inflammatoire peut favoriser la progression tumorale ? (3 pts)

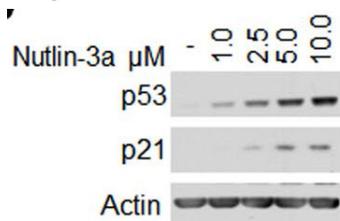
Le gène *TP53*, qui code la protéine p53, est muté dans au moins 50% des cancers chez l'homme et des altérations de ses régulateurs ou de ses effecteurs sont présentes dans les cas restants.

Q3/ Expliquez pourquoi le gène TP53 est si fréquemment muté dans les cancers humains. Quel type d'altérations de ses régulateurs est susceptible d'être observé dans les tumeurs sans mutation du gène TP53 ? (3 pts)

II

La culture cellulaire la plus courante s'effectue dans des conditions d'oxygène atmosphérique (20% O₂), or un taux d'oxygène de 3% est plus proche de la « normoxie » (condition physiologique) pour de nombreuses cellules. Les expériences décrites pour les figures 1 à 5 ont été réalisées en conditions de « normoxie ». Des fibroblastes humains primaires HCA2 ont été cultivés dans un incubateur qui régule les paramètres suivants : t° = 37°C, CO₂ = 5%, O₂ = 3%. Les cellules ont été traitées avec les concentrations indiquées de nutlin-3a, une molécule conçue pour empêcher l'ubiquitine ligase MDM2 d'interagir avec p53. Les niveaux d'expression des protéines p53 et p21 ont été analysés par Western blot.

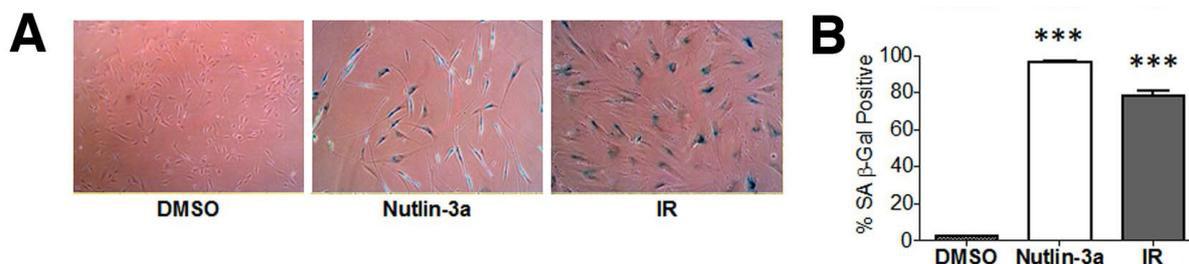
Figure 1



Q4/ Analysez et interprétez les résultats de la Figure1. Vous mentionnez le rôle de p21 et son lien avec p53. (3 pts)

Une des caractéristiques de la sénescence est une accumulation spécifique de β -galactosidase dans les cellules (appelée β -galactosidase associée à la sénescence ou SA- β -gal). Les fibroblastes normaux HCA2 ont été traités avec Nutlin-3a ou irradiés avec 10 Gray (IR). La SA- β -gal a été mise en évidence par une coloration spécifique bleue et le pourcentage de cellules positives a été évalué en Figure2.

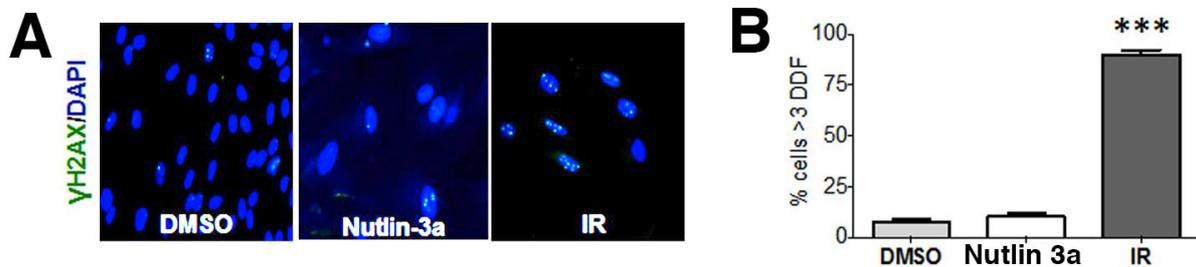
Figure 2



Q5/ Analysez et interprétez les résultats de la Figure 2 ? (2 pts)

Ensuite, les cassures d'ADN double-brins ont été évaluées par immunofluorescence dans ces cellules en utilisant le marqueur γ H2AX qui est spécifique des dommages à l'ADN. Les résultats en Figure 3B sont exprimés en foyers nucléaires positifs pour γ H2AX, appelés DDF (DNA Damage Foci).

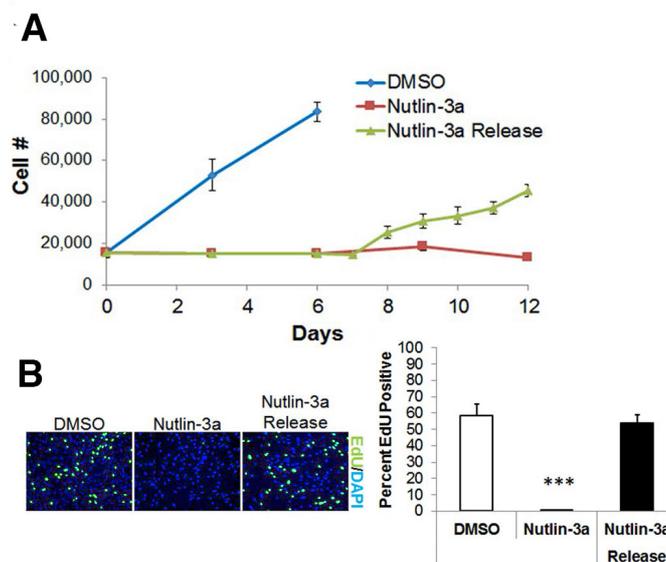
Figure 3



Q6/ Analysez et interprétez la Figure 3. Qu'est-ce que ces résultats suggèrent par rapport à l'action de Nutlin-3a en comparaison avec l'IR ? (3 pts)

L'effet de la nutlin-3a sur la prolifération des fibroblastes humains HCA2 a ensuite été évalué. Dans cette expérience, les fibroblastes humains HCA2 traités au DMSO sont utilisés comme contrôle. Les chercheurs ont également examiné l'effet de l'élimination de la Nutlin-3a après 7 jours de traitement sur la prolifération des cellules HCA2 (Nutlin-3a release). Dans une autre expérience réalisée sur ces mêmes cellules, l'incorporation de l'EdU, un analogue de la Thymidine, qui s'incorpore spécifiquement dans les cellules qui sont en phase S a été mesurée. Les résultats de ces deux expériences sont présentés dans la figure 4 ci-dessous.

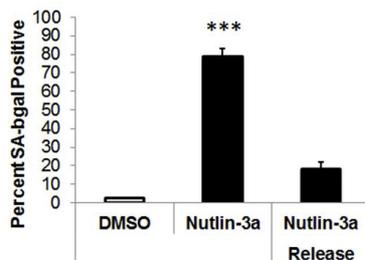
Figure 4



Q7/ Décrivez et interprétez les résultats de la Figure 4. (3 pts)

Un marquage SA-bGal a également été réalisé et le pourcentage des cellules SA-bGal positives a été déterminé (Figure 5).

Figure 5

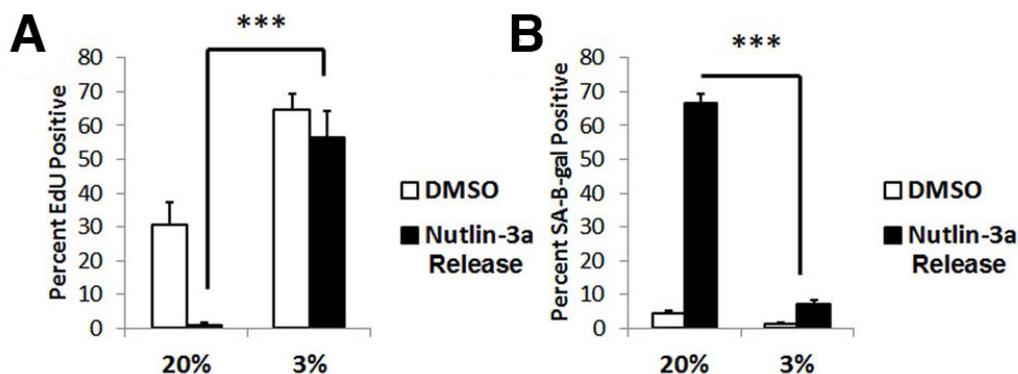


Q8/ Quel effet est mis en évidence par la Figure 5? (3 pts)

Q9/ Expliquez pourquoi ce résultat est en contradiction avec vos connaissances sur la sénescence. (2 pts)

Plusieurs rapports suggèrent que les cellules cultivées dans des conditions d'oxygène atmosphérique (20%) sont en condition d'hyperoxie et subissent divers effets délétères comme les dommages à l'ADN et l'instabilité génomique. Les chercheurs ont donc comparé les réponses associées à l'arrêt du traitement par la Nutlin-3a (Nutlin-3a release) sur les fibroblastes humains HCA2 en conditions d'hyperoxie (20% O₂) et de normoxie (3% O₂).

Figure 6



Q10/ Décrivez et interprétez les résultats de la Figure 6. Quelle hypothèse pouvez-vous formuler pour expliquer les différences observées à 20% et 3% d'O₂? (4 pts)

III

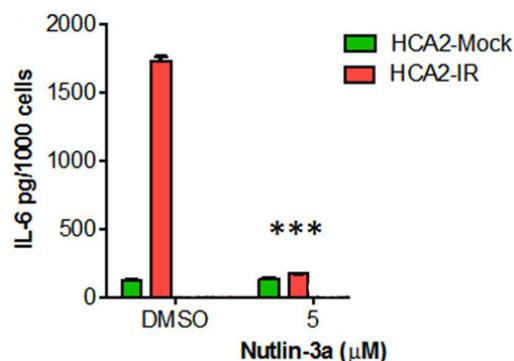
Les cellules sénescents sécrètent de nombreuses cytokines (telles que IL-6 et IL-8 parmi d'autres), facteurs de croissance et protéases. Plusieurs études indiquent que ce phénotype de sécrétion associé à la sénescence (SASP) peut paradoxalement créer un environnement plus permissif pour la tumorigénèse.

Il a été montré qu'en absence de p53 fonctionnelle les cellules sénescents présentent un phénotype SASP amplifié.

Q11/ Quel effet de p53 sur le SASP est suggéré par cette observation ? (3 pts)

Nutlin-3a fait actuellement l'objet de nombreux essais cliniques dans les traitements anticancéreux. Les auteurs ont voulu tester l'effet de la nutlin-3a sur la sécrétion d'interleukine-6 (IL-6), une cytokine qui favorise la tumorigénèse. Les fibroblastes HCA2 ont été irradiés (IR) ou non (Mock) comme précédemment et les niveaux de IL-6 secrétés dans le milieu cellulaire (milieu conditionné) ont été évalués par un dosage ELISA, en présence ou en absence de nutlin-3a.

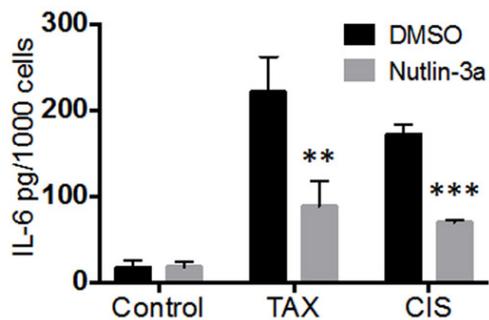
Figure 7



Q12/ Décrivez et interprétez les résultats de la Figure 7. Quel est l'intérêt du traitement IR des fibroblastes HCA2 ? (3 pts)

Ensuite, les fibroblastes HCA2 ont été traités avec les agents génotoxiques, tels que le taxol (TAX) ou la cisplatine (CIS) qui sont fréquemment utilisés en chimiothérapie. La sécrétion d'IL-6 a été mesurée en présence ou en l'absence de nutlin-3a.

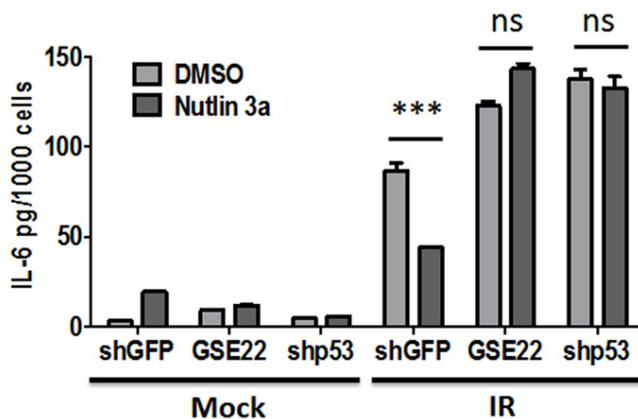
Figure 8



Q13/ Décrivez et interprétez les résultats de la Figure 8. (3 pts)

Ensuite, des fibroblastes HCA2 dans lesquels p53 a été inactivée par des ARN interférents spécifiques (shp53) ou bien par un inhibiteur de p53 - le peptide (GSE22), ont été irradiés (IR) ou non (Mock) et traités à la nutlin-3a ou non (DMSO). La sécrétion d'IL-6 dans le milieu conditionné a été mesurée par un test ELISA, comme précédemment.

Figure 9



Q14/ Quel est le but de cette expérience ? Décrivez et interprétez les résultats de la Figure 9. (3 pts)

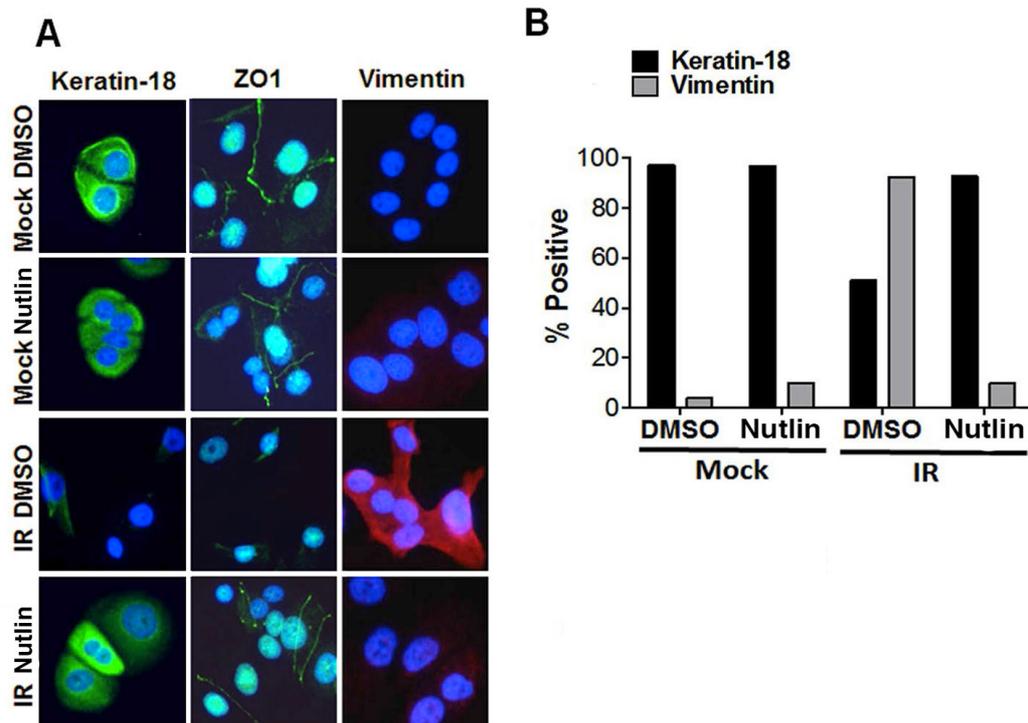
IV

La transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) est fréquente dans les cellules cancéreuses et est une étape clé du processus de dispersion métastatique. Parmi les mécanismes moléculaires de l'EMT, on retrouve une surexpression de la Vimentine, et

une diminution de l'expression de la protéine de jonctions serrées ZO-1 et de la protéine épithéliale Kératine-18. La figure 10A montre un immunomarquage sur cellules de cancer du sein non agressives ZR75-1 cultivées dans du milieu conditionné de fibroblastes HCA2 ayant subi différents traitements (Mock ou IR et DMSO ou Nutlin-3a). Il est à noter que les cellules HCA2 ont été lavées après les différents traitements et avant la collecte des milieux conditionnés. L'expression de ZO-1 et Keratin-18 (en vert), Vimentine (en rouge) et l'ADN (coloration au DAPI en bleu) a été analysée par immunofluorescence dans les cellules ZR75-1 cultivées dans le milieu conditionné des fibroblastes HCA2. La quantification des résultats obtenus est présentée dans la figure 10 B.

Q15/ Quel est l'intérêt d'utiliser du milieu conditionné de HCA2 préalablement lavées des drogues ? (3 pts)

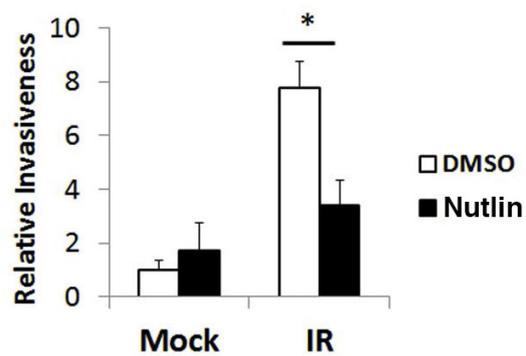
Figure 10



Q16/ Analysez et interprétez les résultats. (3 pts)

Ensuite, les cellules ZR75-1 ont étéensemencées sur la face supérieure d'un filtre dans la partie supérieure de chambres à double fond. Après 18h, les cellules ZR75-1 présentes sur la face inférieure du filtre de la chambre supérieure ont été colorées et comptées. Dans leur partie inférieure, ces chambres contenaient des milieux conditionnés de fibroblastes HCA2 comme décrit pour la figure 10.

Figure 11



Q17/ Quel est le but de cette expérience ? interprétez les résultats. (3 pts)

Q18/ Bonus : En conclusion, quels seraient les effets de la Nutlin3a sur les cellules normales, les cellules sénescents du microenvironnement tumoral et sur des cellules cancéreuses avec ou sans mutation du gène TP53? (4 pts)