

## L3 Biologie des Cancers

Durée : 2 heures

### Recommandations :

- L'évaluation de votre travail accordera beaucoup d'importance à l'exposé de l'analyse des données et à leur interprétation. N'oubliez pas de justifier.
- Il vous est demandé de rédiger dans un français correct, tant du point de vue de l'orthographe que de la syntaxe. Attention à l'utilisation d'acronymes non définis...
- Bien faire apparaître le numéro des questions

### Sujet : rôle du canal potassique Kv11.1 dans le développement des cancers du sein

Le canal Kv11.1, aussi appelé hERG1, est un canal connu pour jouer un rôle fondamental dans l'excitabilité membranaire de certains types cellulaires comme les myocytes cardiaques. Il y a une dizaine d'années, il a été montré qu'il était aussi exprimé dans des cellules cancéreuses dérivées de cellules non-excitables, mais son rôle était inconnu. Parmi ces cancers, il y a les cancers du sein.

Dans une série d'articles, l'équipe de Saverio Gentile a étudié son expression et son rôle dans des lignées de cancer du sein en utilisant différentes techniques et un activateur spécifique, le NS1643. Dans un article plus récent, l'équipe de Gentile s'est focalisée sur son rôle dans la diffusion de métastase.

### Expression de Kv11.1 dans les cellules

Les chercheurs ont utilisé plusieurs lignées cellulaires humaines de cancers du sein, principalement SKBR3 et MDA-MB231, qui n'expriment ni le récepteur aux œstrogènes, ni le récepteur à la progestérone. Dans une première expérience, ils ont comparé l'expression de Kv11.1 dans la lignée SKBR3 et la lignée CHO (Chinese Hamster Ovary), ainsi que l'effet de l'activateur spécifique NS1643 sur la prolifération cellulaire.

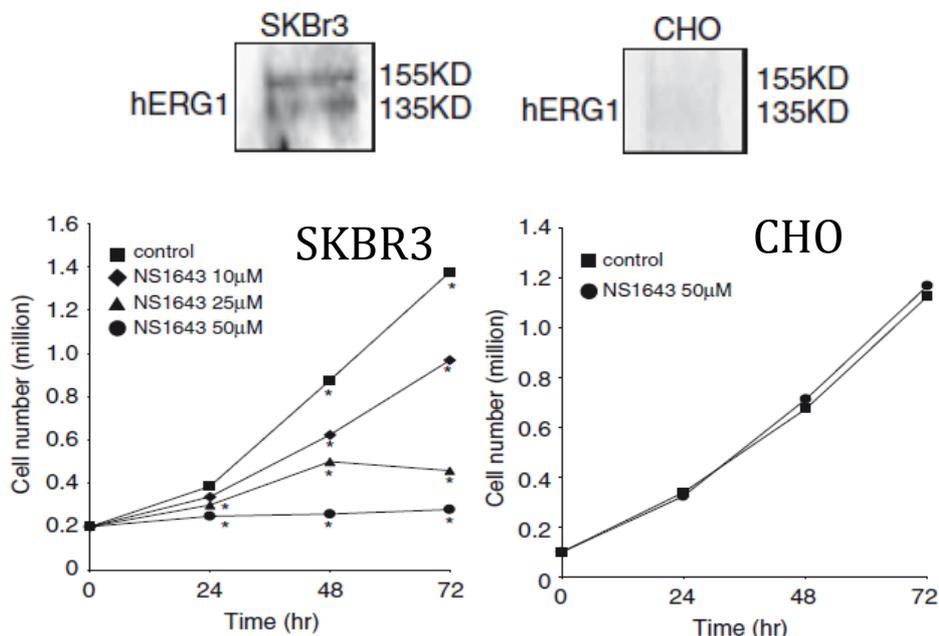


Fig. 1 : Western-blot sur lysat cellulaire des lignées SKBR3 et CHO avec un anticorps spécifique anti hERG1 (= Kv11.1, en haut). Evolution du nombre de cellules en culture compté par un « Cell counter », en absence et présence de différentes concentrations de NS1643 sur les 2 lignées (bas).

Q1 : quel est l'intérêt d'utiliser la lignée CHO ?

Q2 : quel est l'effet de l'activateur de Kv11.1 sur la prolifération cellulaire ?

Q3 : quelle autre technique les auteurs auraient pu utiliser pour démontrer ici le lien entre prolifération et présence de Kv11.1 ?

Dans une seconde expérience, les auteurs ont traité les cellules de la lignée SKBR3 durant 72h avec 50  $\mu$ M de NS1643. Puis les cellules ont été lavées et leur prolifération a été mesurée comme précédemment avec du bleu de Trypan.

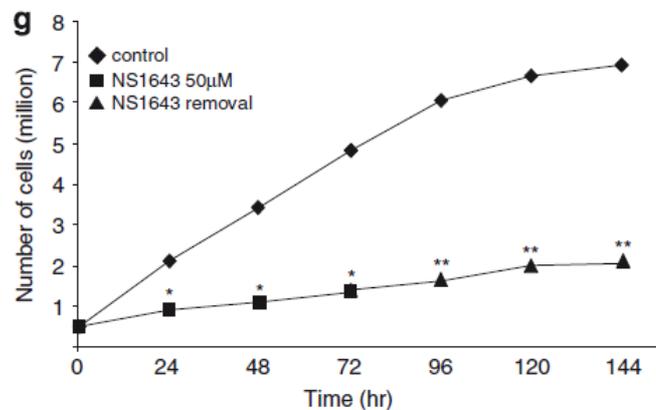


Fig. 2 : évolution de nombres de cellules SKBR3 en présence de NS1643, ou après lavage (« removal »)

Q4 : que pouvez vous conclure sur l'effet de l'activateur NS1643 ?

Suite au résultat obtenu avec le comptage des cellules traitées par l'activateur NS1643, les auteurs ont ensuite mesurer la mort cellulaire de la lignée SKBR3 à l'aide du bleu de Trypan (les cellules mortes restent marquées par la coloration bleue, au contraire des cellules vivantes).

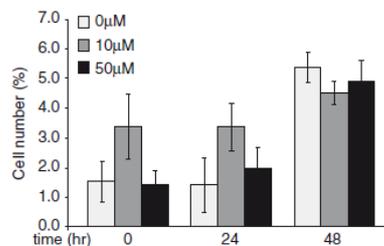


Fig. 3 : évolution du pourcentage de cellules mortes comptées au bleu de Trypan avec ou sans NS1643 durant 48h

Q5 : Comment évolue le pourcentage de cellules mortes ? Que peut-on conclure à 48 h ? Quel est l'effet du NS1643 et donc le rôle de Kv11.1 ?

En parallèle du comptage des cellules mortes, les auteurs ont étudié l'apoptose des cellules SKBR3 avec la technique Annexine V.

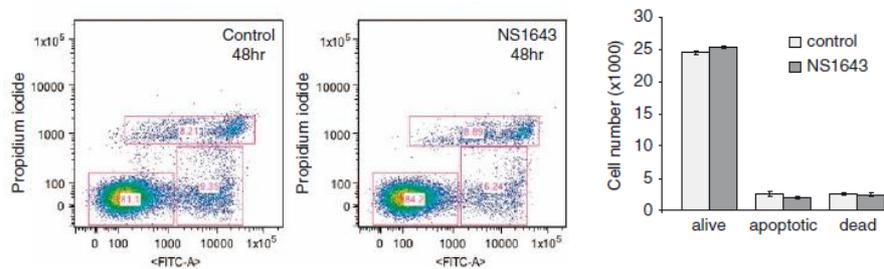


Fig. 4 : Marquage par Annexine V (abscisse) et Iodure de Propidium (ordonnée) des cellules SKBR3 traitées avec NS1643 durant 48h (au milieu) ou non-traitées (à gauche). A droite, histogramme-résumé des du comptage de cellules vivantes (« alive »), apoptotiques (« apoptotic ») ou mortes (« dead »).

Q6 : que marque l'Annexine V et l'iodure de propidium ? Quel est l'intérêt de combiner ces 2 marquages ?

Q7 : quelle autre technique auraient-ils pu utiliser pour détecter l'apoptose des cellules ?

Q8 : quel est l'effet du NS1643 ? Avec votre réponse à la question 2, que pouvez-vous conclure ?

Les auteurs ont ensuite étudié la répartition des cellules SKBR3 dans les différentes phases du cycle cellulaire par cytométrie de flux en mesurant la quantité d'ADN dans chaque cellule.

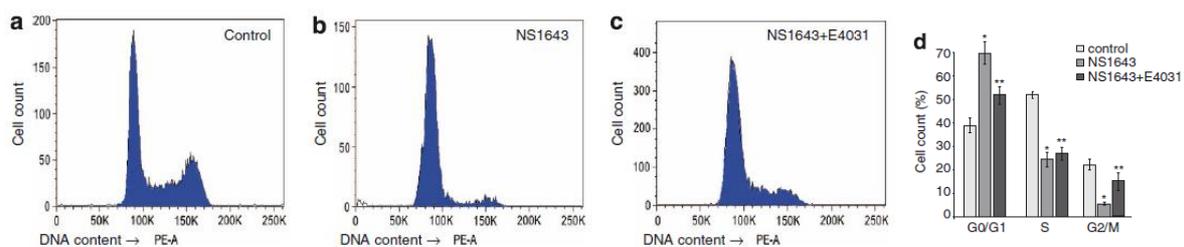


Fig. 5 : Répartition des cellules selon leur contenu en ADN : contrôle (a), traitées 48h avec NS1643 (b), traitées 48h avec NS1643 + E4031 = inhibiteur de Kv11.1). (d) Histogramme du pourcentage de cellules selon les phases du cycle.

Q9 : que pouvez-vous conclure quant à l'effet du NS1643 ?

Q10 : quel est l'effet de l'E4031 ? Comment pouvez-vous le qualifier ?

Devant ces modifications, les auteurs ont étudié par western-blot certaines protéines clés du cycle cellulaire comme la cycline E2, Rb et Cdk1.

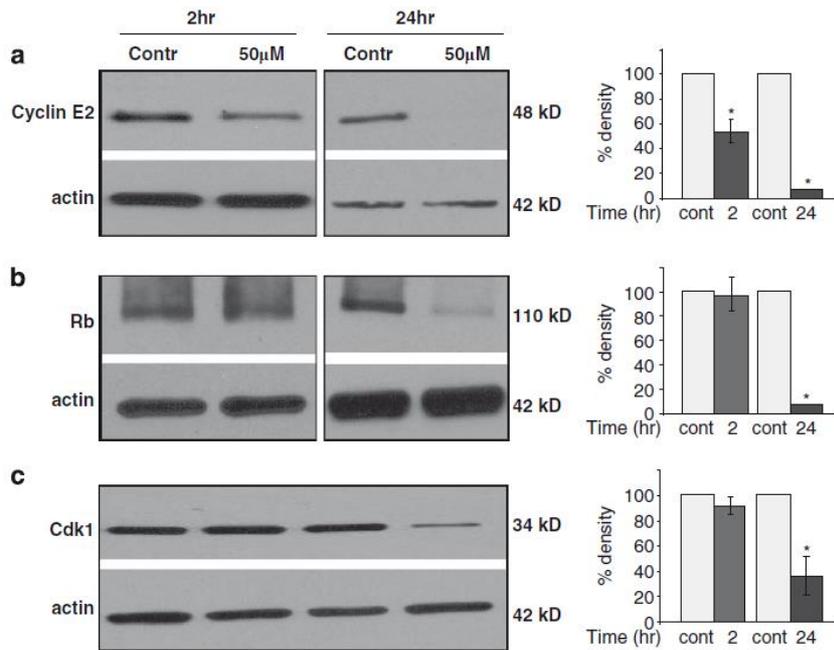


Fig. 6 : western-blot d'expression de la cycline E2, Rb et Cdk1 à 2 et 24h de traitement ou non des cellules SKBR3 par 50  $\mu$ M NS1643.

Q11 : quel est l'effet de NS1643 sur l'expression de ces 3 protéines à 2 et 24 h ? Que pouvez-vous en conclure ? Est-ce logique avec le résultat de la figure 5 ?

Dans un second article, les auteurs ont étudié la capacité migratoire des cellules SKBR3 traitées ou non avec NS1643.

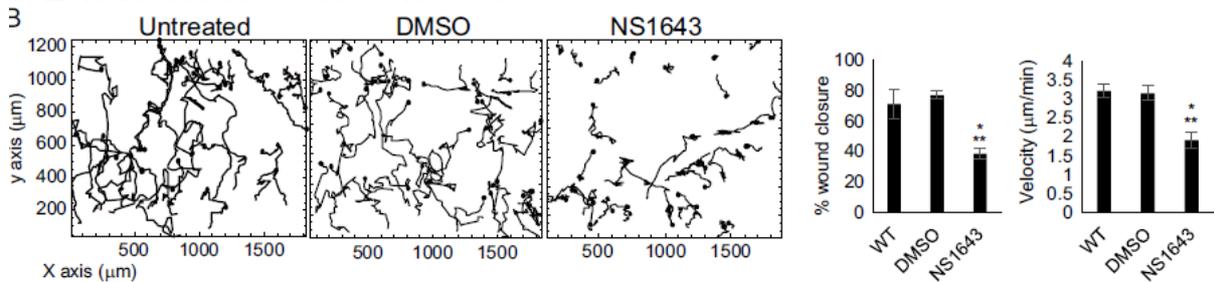


Fig.7 : suivi de la migration de cellules SKBR3 sur fond de boite de culture. Non-traitées (« untreated »), traitées par NS1643 ou par le solvant du NS1643 (= véhicule, « DMSO »)

Q12 : quel est l'effet de NS1643 sur la motilité cellulaire ?

Dans une dernière expérience, les cellules SKBR3 ont été injectées dans le flanc à des souris. Dès que la tumeur est palpable, du NS1643 ou son véhicule (DMSO) est injecté dans le péritoine. Le volume des tumeurs originelles est mesuré, et des coupes de foie sont effectuées pour détecter des métastases hépatiques.

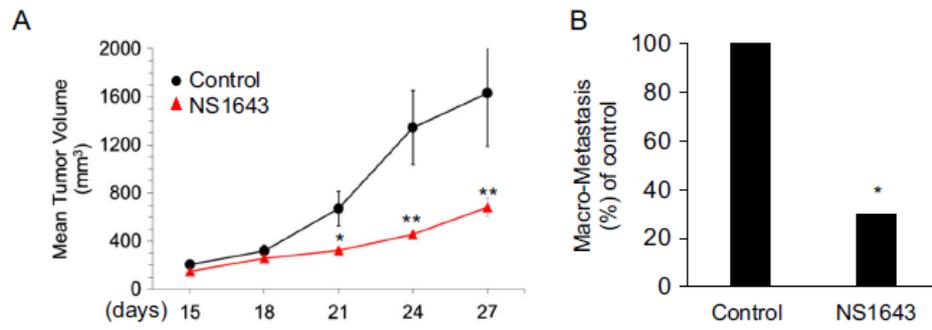


Fig. 8 : A. Volume moyen des tumeurs après traitement des souris par NS1643 ou son véhicule (=control). B. Pourcentage de macro-métastase dans le foie des souris.

Q13 : quel est l'effet du NS1643 sur les tumeurs dues aux cellules SKBR3 ? Et sur le développement de métastases ?

Q14 : conclusion générale sur le NS1643 et son intérêt thérapeutique