

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIES

U42 - BIOLOGIE CELLULAIRE

SESSION 2023

DUREE DE L'ÉPREUVE : 2h
COEFFICIENT : 1

Matériel autorisé :

- dictionnaire anglais/français.

Dès que ce sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Ce sujet comporte 12 pages numérotées de 1/12 à 12/12.

BTS BIOTECHNOLOGIES		Session 2023
Biologie cellulaire	23BOE4BC	Page 1 sur 12

	Intitulé des capacités évaluées	points
C1	Maitrise des connaissances scientifiques et techniques	4
C2	Aptitude à organiser et à exposer les connaissances	4
C3	Qualité de l'analyse et du traitement des données fournies	7
C4	Pertinence et cohérence des solutions proposées	3
C5	Clarté et rigueur de l'expression écrite et de la composition	2

Transition épithélio-mésenchymateuse et immunothérapie anti-cancéreuse

La Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM) fait partie des étapes tardives du processus de cancérisation. Ce phénomène cellulaire est corrélé avec la formation de métastases.

Durant la TEM, les cellules épithéliales se transforment en cellules mésenchymateuses qui acquièrent de nouvelles propriétés conduisant à la formation de métastases. La dissémination des métastases est favorisée par leur échappement au système immunitaire et leur résistance aux traitements de chimiothérapie. Ces deux phénomènes constituent les principaux écueils dans la lutte contre le cancer. Depuis peu, l'immunothérapie offre de nouvelles perspectives thérapeutiques.

1. Étude phénotypique des cellules épithéliales et mésenchymateuses

Le **document 1** présente un schéma du processus de TEM ainsi que les résultats d'une analyse par cytométrie de flux, obtenus pour une population de cellules d'origine épithéliale, entrée en phase de TEM.

- 1.1 Analyser les résultats obtenus pour argumenter que la TEM s'accompagne d'une perte d'expression en E-cadhérine et d'une augmentation de l'expression de la vimentine.
Montrer que la population de cellules étudiée est en début de TEM. (C3)
- 1.2 Schématiser un épithélium. Indiquer la localisation de la E-cadhérine sur ce schéma. (C1)
- 1.3 Proposer, à partir du schéma du processus de TEM, une analyse comparative, aux niveaux cellulaire et tissulaire, des cellules épithéliales et des cellules mésenchymateuses.
En déduire une propriété majeure des cellules mésenchymateuses, argumenter. (C2)

Les cadhérines participent à des voies de transduction de signaux intracellulaires dont l'une est présentée dans le **document 2**.

- 1.4 Analyser cette voie de transduction pour montrer les conséquences de la perte de l'E- cadhérine. (C2)

Les cellules mésenchymateuses sont capables de migrer en formant des lamellipodes. Ces derniers contiennent un réseau dynamique d'actine, dont la polymérisation est contrôlée par plusieurs protéines comme le complexe Arp 2/3 (Actin Related Protein). Le **document 3** présente le principe d'une technique de mesure de la polymérisation de l'actine *in vitro*, ainsi que les résultats d'une étude analysant l'influence de Arp 2/3 sur la vitesse de polymérisation de l'actine.

- 1.5 Expliquer le principe de la technique utilisée pour mesurer la polymérisation de l'actine. (C3)
- 1.6 Comparer la vitesse de polymérisation de l'actine G ainsi que les concentrations critiques, en présence et en absence d'Arp 2/3. Conclure sur l'influence du complexe Arp 2/3 sur la migration cellulaire. (C3)

2. Mise au point d'un modèle d'étude de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

Afin d'explorer *in vitro* les caractéristiques cellulaires et moléculaires des cellules en TEM, les cellules de la lignée A549, issue d'un « cancer du poumon non à petites cellules » (CPNPC), ont été choisies comme modèle d'étude.

Pour induire la TEM, les cellules A549 sont cultivées en présence de TNF- α et de TGF- β .

Le **document 4** présente les résultats de trois expériences :

- Observation de cellules au microscope à contraste de phase,
- Test de migration de cellules,
- Mise en évidence de marqueurs membranaires par Western-blot.

- 2.1 Présenter deux intérêts de l'utilisation du microscope inversé à contraste de phase en technologie cellulaire. (C1)
- 2.2 Proposer un schéma annoté de l'édifice moléculaire correspondant à une détection positive de la E-cadhérine par Western blot. (C2)
- 2.3 Analyser les résultats obtenus pour chacune des trois expériences. (C3)
- 2.4 Argumenter la pertinence du choix des cellules A549 comme modèle d'étude. (C4)

3. Transition épithélio-mésenchymateuse et immunothérapie

Le système immunitaire est capable de reconnaître et d'éliminer les cellules cancéreuses.

- 3.1 Schématiser les interactions moléculaires impliquées dans la reconnaissance d'une cellule cancéreuse par un lymphocyte T cytotoxique. Expliquer les phénomènes à l'origine de la destruction de la cellule cancéreuse. (C1)

BTS BIOTECHNOLOGIES		Session 2023
Biologie cellulaire	23BOE4BC	Page 3 sur 12

Les cellules qui subissent la TEM échappent parfois au système immunitaire. L'une des stratégies d'échappement couramment utilisée par les cellules tumorales, est l'expression de PD-L1 (Programmed cell Death protein- Ligand) qui inactive les lymphocytes T cytotoxiques.

L'étude de l'expression de PD-L1 dans le modèle d'induction de la TEM des cellules A549 est présentée dans le **document 5**.

3.2 Expliquer le rôle du témoin réalisé dans cette étude. (C2)

3.3 Analyser les résultats obtenus. (C3)

La protéine PD-L1 est devenue une cible privilégiée des thérapies anti-cancéreuses basées sur l'utilisation des anticorps monoclonaux.

Des anticorps monoclonaux MEDI4736 dirigés contre PD-L1 ont été produits par la technique des hybridomes présentée dans le **document 6**.

3.4 Argumenter le choix du milieu HAT pour la sélection des hybridomes. (C3)

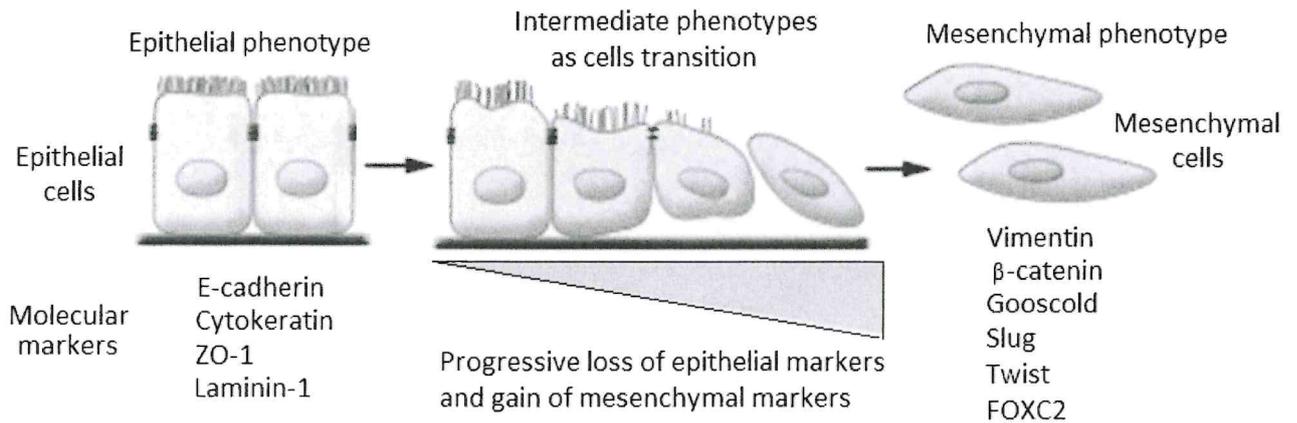
Pour tester l'efficacité des anticorps MEDI4736, des cellules cancéreuses associées ou non à des lymphocytes T cytotoxiques sont implantés dans des souris immunodéficientes. Des anticorps MEDI4736 sont ensuite injectées à ces souris. L'évolution du volume des tumeurs est suivi au cours du temps. Le **document 7** présente les résultats de cette étude.

3.5 Analyser et interpréter les résultats obtenus. (C3)

3.6 Dédire de l'ensemble des études menées, les phénomènes mis en jeu, depuis l'action des anticorps MEDI4736 jusqu'à la régression des tumeurs. (C4)

Document 1. La transition épithélio-mésenchymateuse.

Epithelial-mesenchymal transition

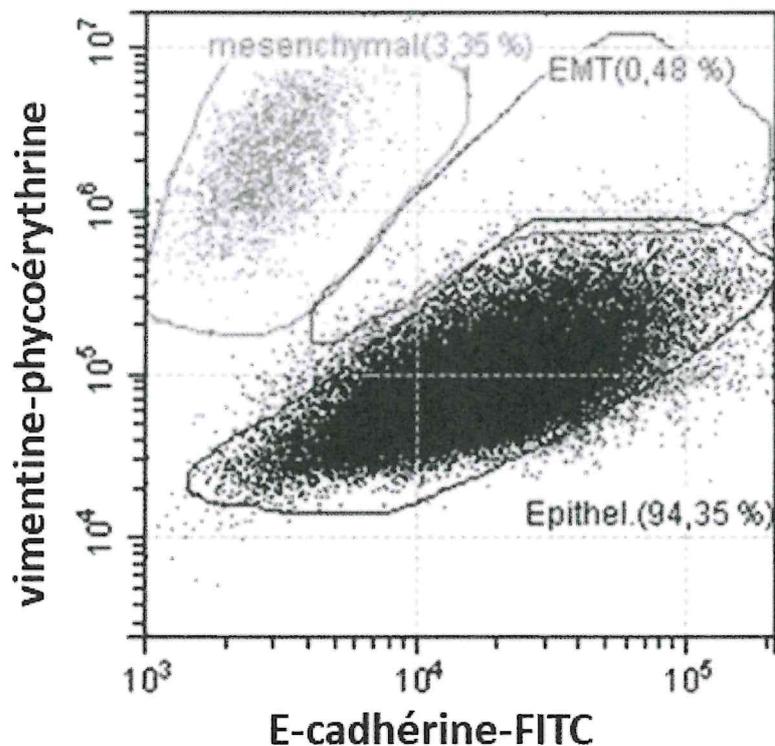


D'après Kalluri R et al., The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest. 2009 Jun;119(6):1420-8.

Analyse en cytométrie en flux de cellules en phase de TEM, marquées par des anticorps.

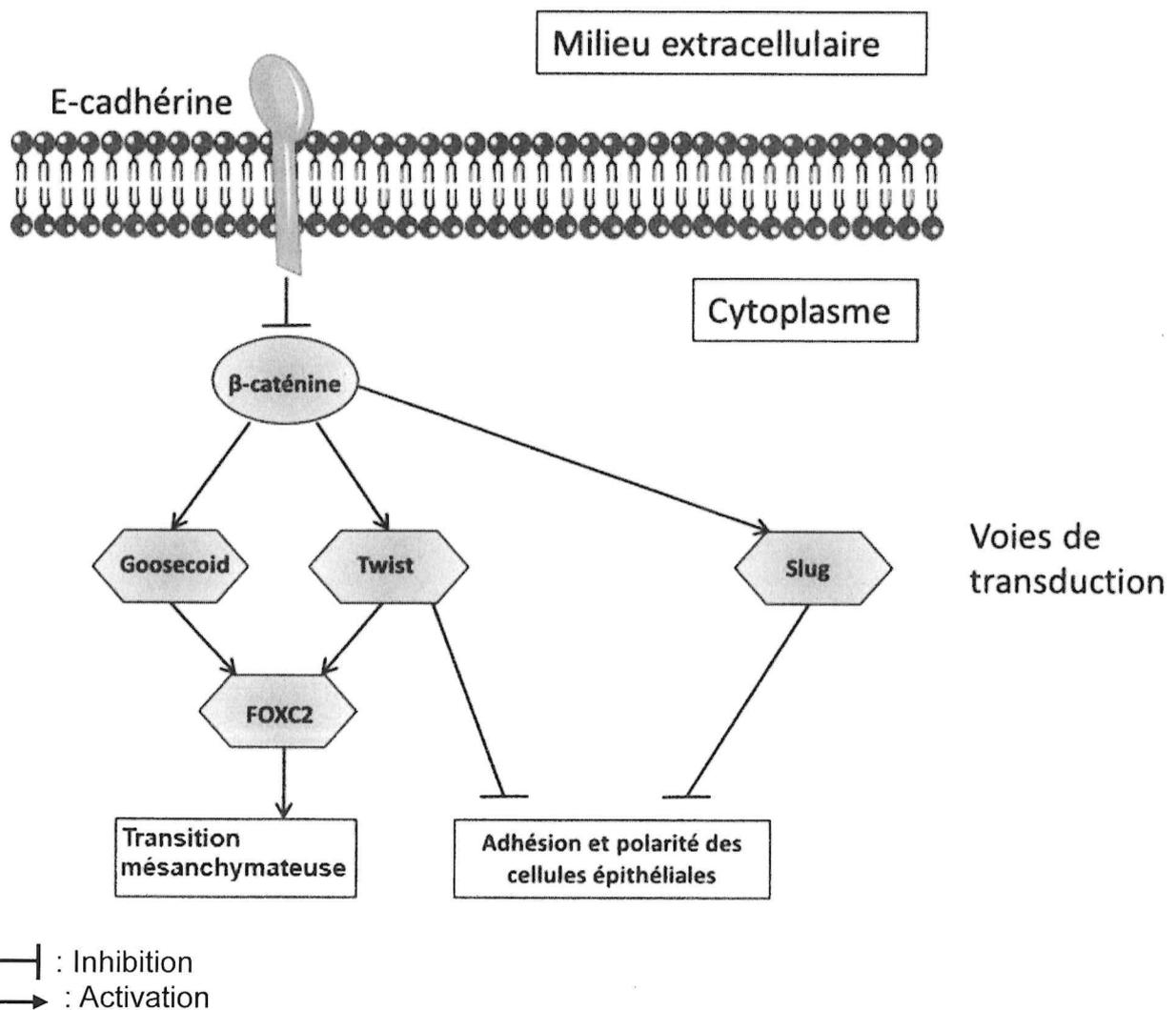
Anticorps utilisés pour le marquage :

- anticorps anti-E-cadhérine couplé au FITC
- anticorps anti-Vimentine couplés à la phycoérythrine



D'après Steinbichler et al., Pleiotropic Effects of Epithelial Mesenchymal Crosstalk on Head and Neck Cancer : EMT and beyond. Cancer Microenviron. 2019 Dec;12(2-3):67-76.

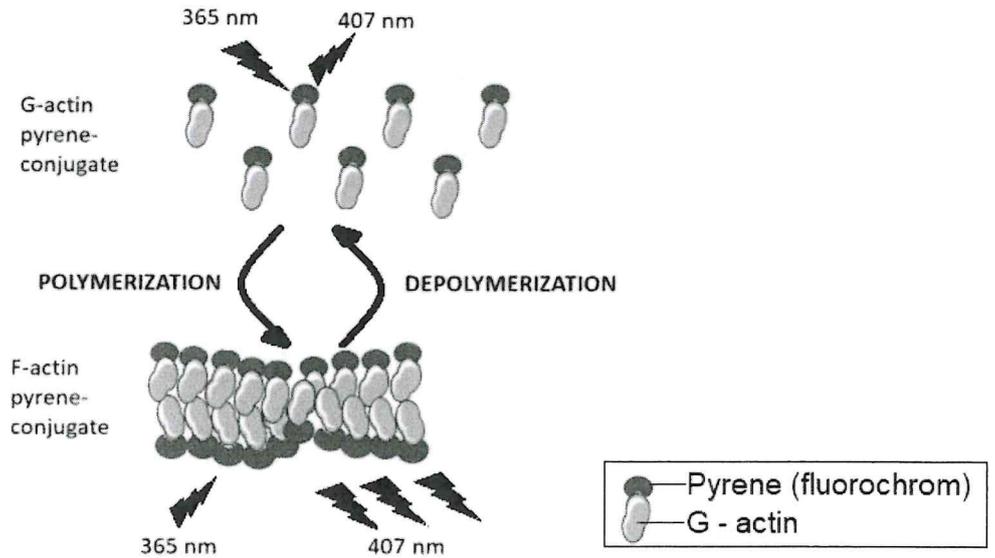
Document 2. Une des voies de transduction impliquant la E-cadhérine



D'après Yang J et al., Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. Dev Cell. 2008 Jun;14(6):818-29.

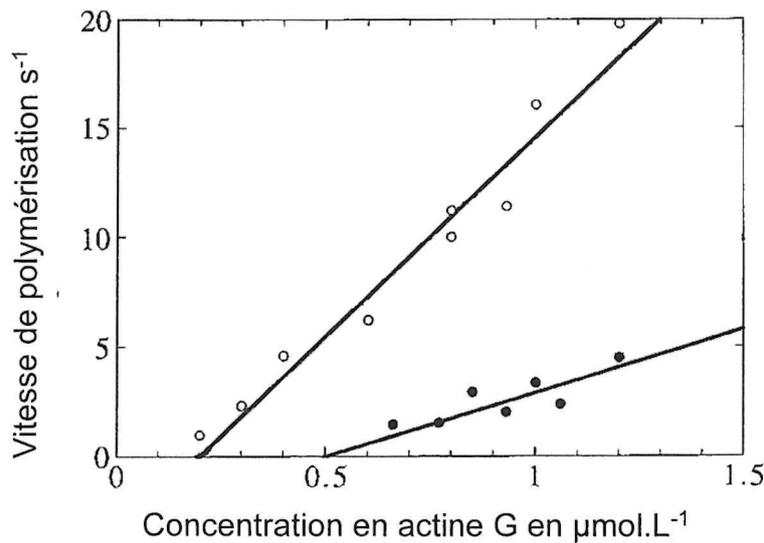
Document 3. Étude de la polymérisation de l'actine dans les lamellipodes.

Principe de la mesure de la polymérisation de l'actine *in vitro*



Les monomères d'actine G sont liés à un pyrène. Le pyrène est positionné à proximité de résidus de tryptophane et de tyrosine présents dans l'actine G, avec pour conséquence d'éteindre en partie la fluorescence du pyrène. Lorsque les monomères d'actine G s'assemblent, elle subit une légère réorganisation structurale qui tend à éloigner le pyrène des résidus tryptophane et tyrosine.

Influence de Arp 2/3 sur la vitesse de polymérisation de l'actine G



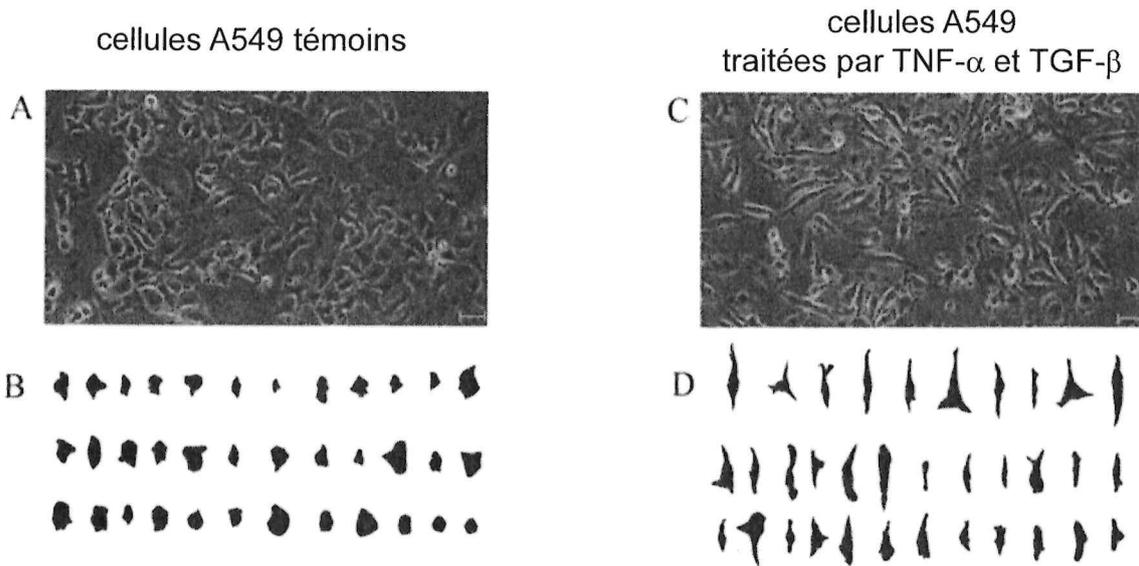
- polymérisation de l'actine en présence de Arp 2/3
- polymérisation de l'actine en absence de Arp 2/3

La concentration critique est la concentration en actine G à partir de laquelle la polymérisation démarre.

D'après Ressad F et *al.*, Control of actin filament length and turnover by actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) in the presence of capping proteins and ARP2/3 complex. J Biol Chem. 1999 Jul 23;274(30):20970-6.

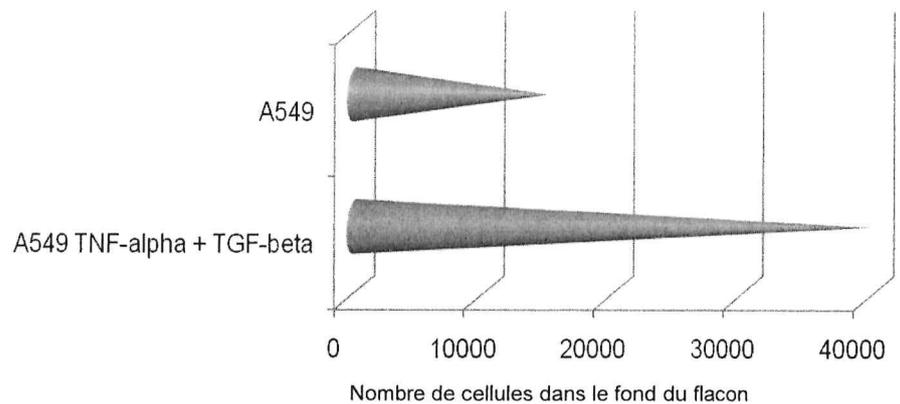
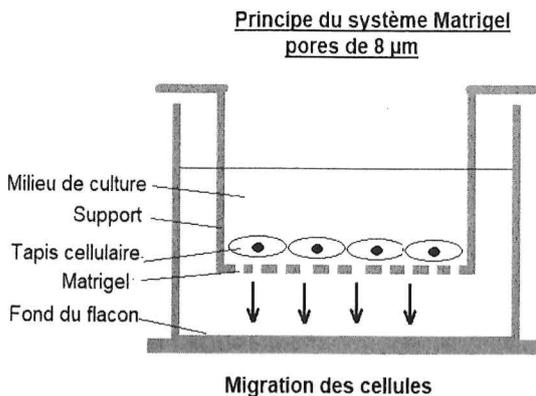
Document 4. Induction de la transition épithélio-mésenchymateuse par TNF- α et TGF- β .

Observation des cellules au microscope à contraste de phase



A et C : Images obtenues en microscopie à contraste de phase (Olympus CKX41-A32PH)
 B et D : Analyse de la forme des cellules par le logiciel Image Pro Plus

Test de migration des cellules A549 traitées au TNF- α et TGF- β par le système Matrigel pores de 8 μ m



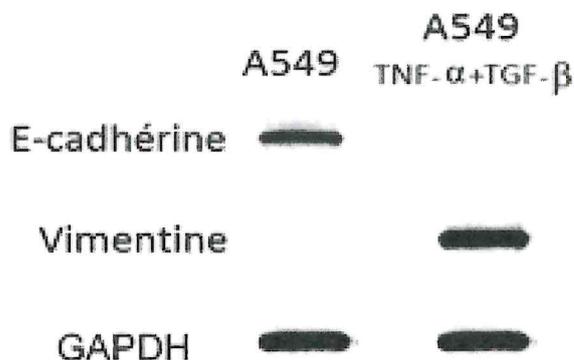
Document 4. Induction de la transition épithélio-mésenchymateuse par TNF- α et TGF- β . (suite)

Mise en évidence de marqueurs épithélias et mésenchymateux par Western blot sur des cellules A549 cultivées avec ou sans TNF- α et TGF- β

Protocole :

Cellular proteins were separated by electrophoresis (SDS-PAGE) in a polyacrylamide gel in presence of sodium dodecylsulfate (SDS) according to their molecular weight, then transferred to a nitrocellulose membrane for staining by specific antibodies. For E-cadherin detection, an anti-E-cadherin antibody produced in goat is used. The secondary antibody is a peroxidase-conjugated anti-Goat Ig antibody. For Vimentin detection, an anti-vimentin antibody produced in rabbit is used. The secondary antibody is a peroxidase-conjugated anti-Rabbit Ig antibody. For GAPDH detection, an peroxidase-conjugated anti-GAPDH antibody is used. Detection of GAPDH is used for normalization because it is an "housekeeping protein". The substrate used is DAB (3,3'Diaminobenzidine). In the presence of peroxidase, DAB produces a brown precipitate.

Results:



D'après Asgarova A. (2015). La TEM régule l'expression de PD-L1 dans le cancer du poumon, non à petites cellules : un rôle pour IKK. [Thèse de doctorat – Spécialité Médecine humaine et pathologie – Université de Franche-Comté]. NNT : 2015BESA3007

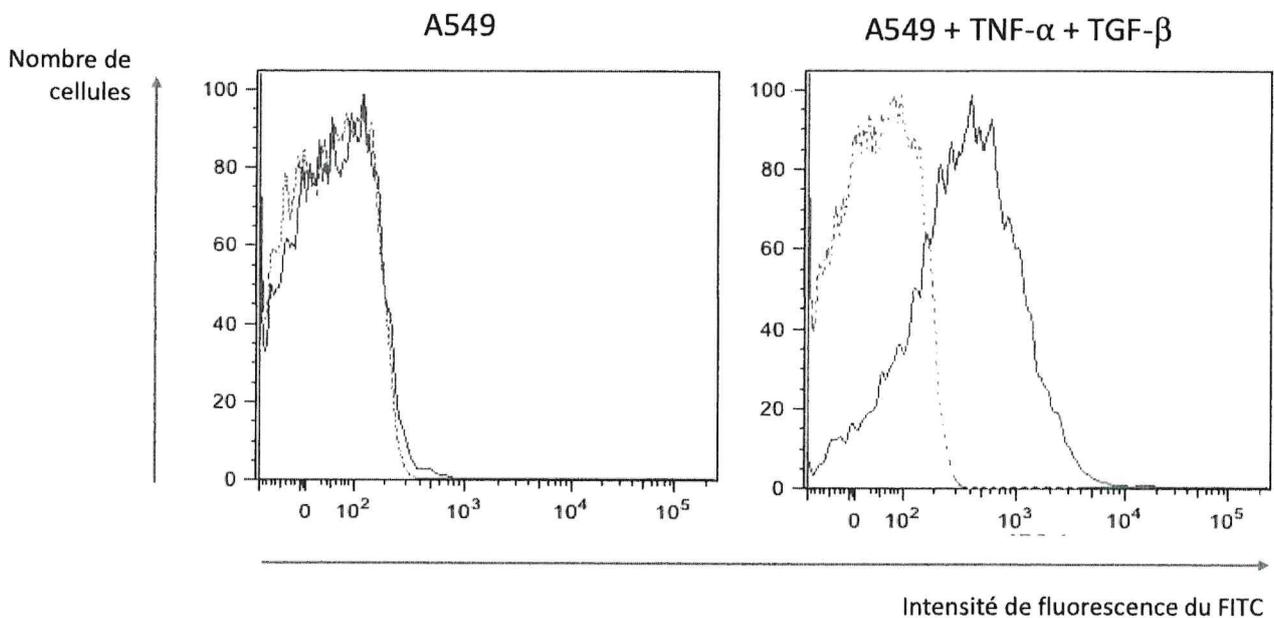
Document 5. Etude de l'expression de PD-L1 dans les cellules A549 exposées au TNF- α et au TGF- β

Protocol:

For membrane staining, cells were incubated with corresponding antibody for 30 min at 4°C, then washed with PBS (phosphate buffered saline) and centrifugated for 10 minutes at 300 g. Ten thousand cells from each sample were evaluated for fluorescence detection using cytometer.

Antibody used for Flow Cytometer are FITC-conjugated IgG anti-PD-L1 antibody for PD-L1 detection and a non-specific FITC-conjugated IgG for non-specific detection. Each sample of cells is stained either by the anti-PD-L1 antibody or by the non-specific antibody. Then the two results are overlaid.

Results:

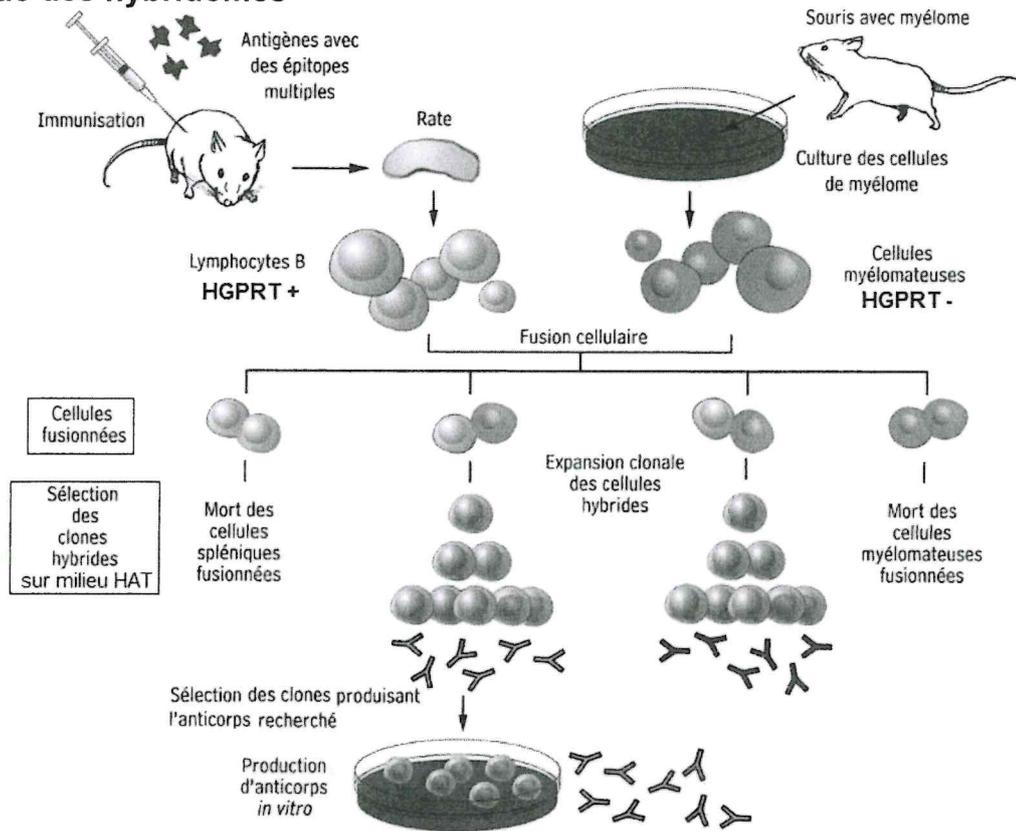


Courbe en pointillé : marquage avec l'anticorps non spécifique
Courbe en trait plein : marquage avec l'anticorps anti-PD-L1

D'après Asgarova A. (2015). La TEM régule l'expression de PD-L1 dans le cancer du poumon, non à petites cellules : un rôle pour IKK. [Thèse de doctorat – Spécialité Médecine humaine et pathologie – Université de Franche-Comté]. NNT : 2015BESA3007

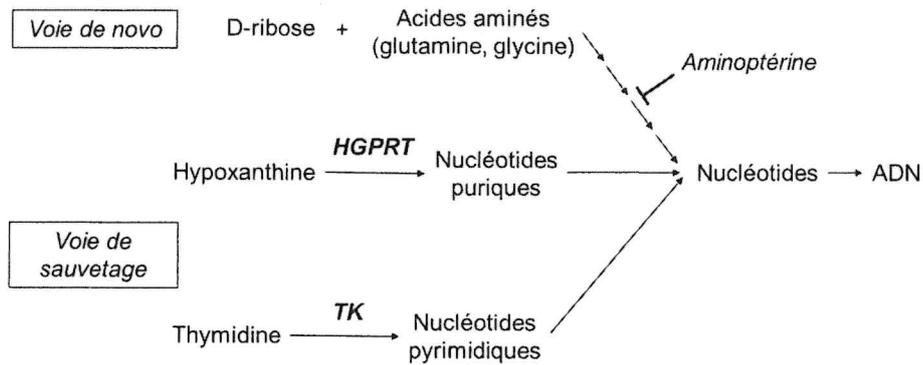
Document 6. Production d'anticorps monoclonaux par la technique des hybridomes

Technique des hybridomes



HGPRT : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
 Milieu HAT : Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine

Voies de synthèse des nucléotides



HGPRT : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
 TK : Thymidine kinase
 HAT : Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine
 —| : inhibition

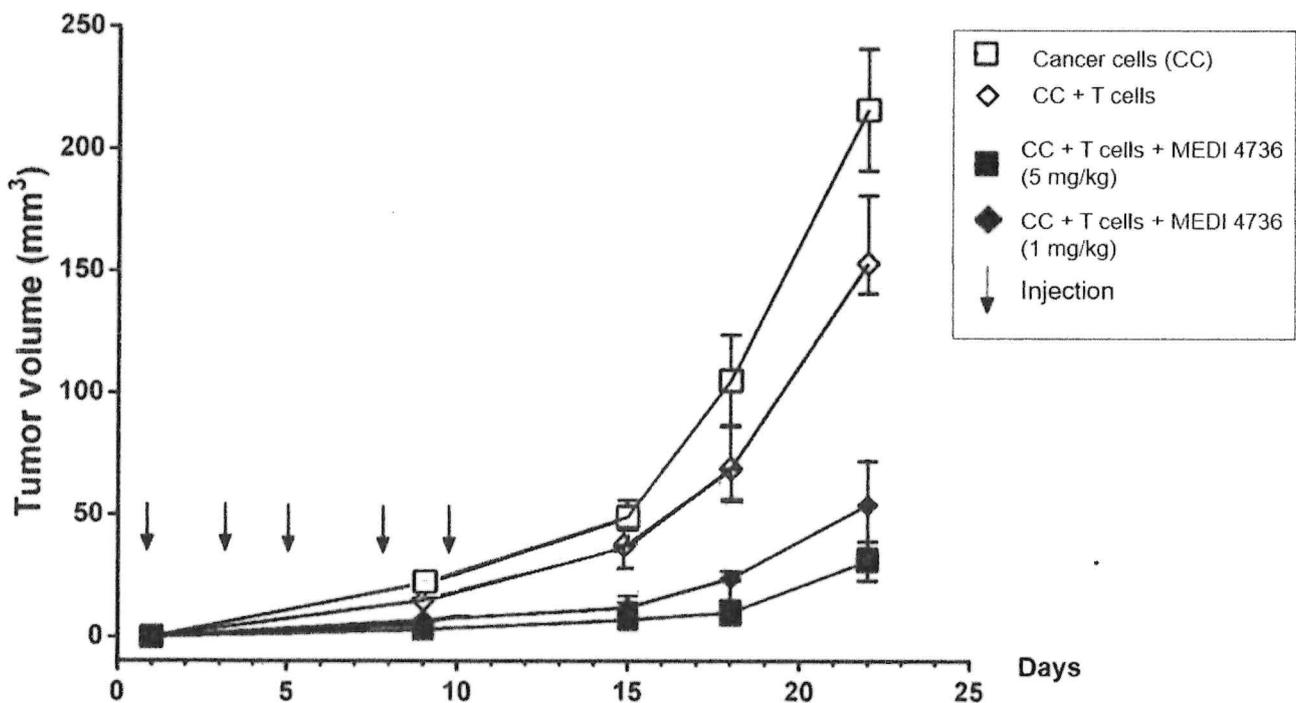
D'après Roselyne L'ITALIEN, Benoît LEBLANC. Immunohématologie. Chenelière Education, 2008 (Chapitre 2, p53). 568 pages. ISBN 978-2-89470-239-0.

Document 7. Étude de l'évolution de tumeurs humaines traitées au MEDI4736

Method:

Tumor reactive T cells were mixed with cancer cells at a 1:6 ratio. Cell mixtures were implanted by subcutaneous injection of 2.5×10^6 cells into the left flank of NOD/SCID mice. Antibodies (MEDI4736) were administered by intraperitoneal injection 1 hour after implantation and on days 3, 5, 8, and 10 at the doses indicated. Tumor growth was measured in two dimensions, and tumor volume (mm^3) was calculated using the formula $(\text{width}^2 \times \text{length})/2$.

Results:



D'après Stewart R et al., Identification and Characterization of MEDI4736, an Antagonistic Anti-PD-L1 Monoclonal Antibody. *Cancer Immunol Res.* 2015 Sep;3(9):1052-62.