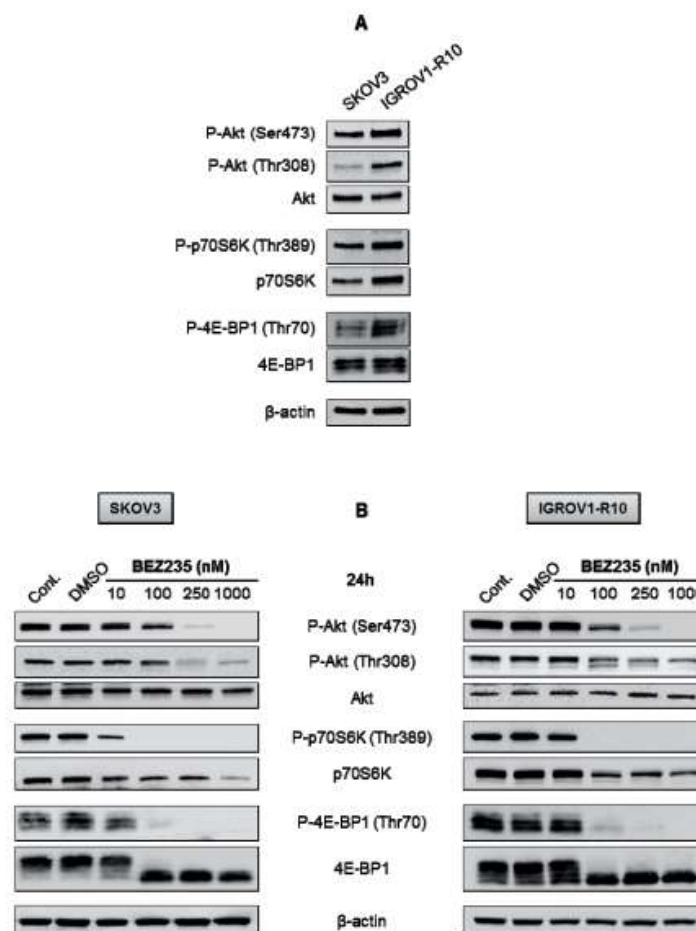


Le cancer de l'ovaire, première cause de décès par cancer gynécologique, est une pathologie complexe, tant du point de vue de ses formes histologiques que de ses caractéristiques moléculaires. Asymptomatique, il est souvent diagnostiqué tardivement. Ce diagnostic tardif et la récurrence fréquente, associée à l'acquisition d'une résistance à la chimiothérapie conventionnelle, explique la faible survie à 5 ans des patientes, actuellement en dessous de 30%. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques représente donc un enjeu majeur pour améliorer prise en charge de ces patientes. L'altération de l'apoptose est l'une des caractéristiques principales des cellules cancéreuses. Elle résulte fréquemment d'un déséquilibre entre les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, principalement due à une surexpression des protéines anti-apoptotiques. Dans les cancers de l'ovaire, nous avons démontré que les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1 coopèrent pour protéger les cellules tumorales contre la mort cellulaire, et que leur inhibition concomitante suffit à induire l'apoptose. De plus, leur partenaire pro-apoptotique BH3-only Bim semble jouer un rôle crucial dans l'induction de cette apoptose. Ces observations ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques puisqu'elles suggèrent que l'apoptose des cellules cancéreuses ovariennes peut être provoquée en inhibant Bcl-xL et Mcl-1 et/ou en induisant leurs partenaires BH3-only, en particulier Bim. La réduction du ratio protéique [Bcl-xL et Mcl-1] / BH3-only pourrait ainsi permettre aux protéines BH3-only de saturer les protéines anti-apoptotiques et de libérer/activer les protéines pro-apoptotiques multidomaines afin d'induire l'apoptose. Notre objectif est donc d'identifier des outils pharmacologiques capables d'inhiber Mcl-1 et/ou d'induire ses partenaires BH3-only, en particulier Bim et Puma, pour sensibiliser les cellules de cancer de l'ovaire à l'ABT-737. L'analyse bibliographique montre que l'expression et l'activité de ces protéines sont régulées de façon coordonnée par les voies de signalisation de survie, en particulier les voies PI3K/Akt/mTOR et MAPK/ERK. Ces voies sont par ailleurs fréquemment dérégulées dans les cancers de l'ovaire.

Pour tenter d'inhiber Mcl-1 et de promouvoir ses partenaires pro-apoptotiques BH3-only, nous avons tout d'abord ciblé la voie PI3K/Akt/mTOR en utilisant un double inhibiteur PI3K/mTOR, le NVP-BEZ235 (BEZ235). En effet, cette inhibe efficacement à la fois PI3K et mTOR (au sein de ses deux complexes mTORC1 et mTORC2) et permet ainsi de réprimer la voie PI3K/Akt/mTOR en amont et en aval. Ceci évite la réactivation de la voie suite à la levée de boucles de rétrocontrôle négatif. Le BEZ235 présente un effet anti-prolifératif dans de nombreux modèles de cancer, dont le cancer de l'ovaire, à la fois in vitro et in vivo. Nous avons étudié l'effet du BEZ235 sur l'expression de ces protéines dans les lignées chimiorésistantes IGROV1-R10 et SKOV3.



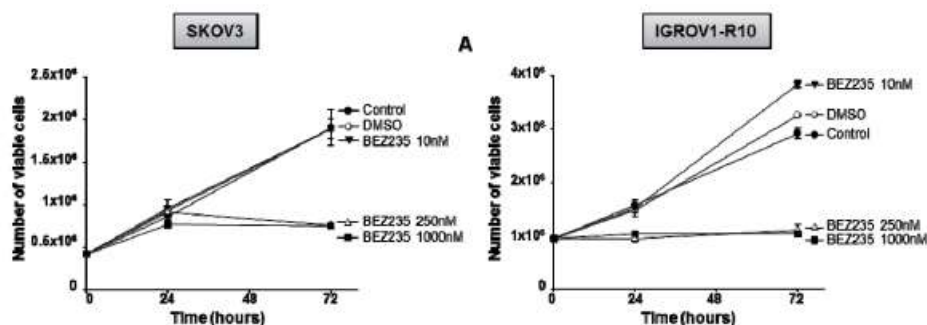
**Figure 1** : Le BEZ235 inhibe l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR dans les lignées tumorales ovariennes chimiorésistantes SKOV3 et IGROV1-R10. L'analyse de l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR a été effectuée par étude de l'expression des protéines P-Akt (Ser473 et Thr308) et Akt totale, P-p70S6K et p70S6K totale et P-4E-BP1 (Thr70) et 4EBP1 totale par western-blot dans les lignées SKOV3 et IGROV1-R10, à l'état basal (A) ou après 24h de traitement avec des concentrations croissantes de BEZ235 (B). L'expression de la  $\beta$ -actine est présentée comme contrôle de dépôt. Les Westernblots présentés sont représentatifs d'au moins trois expériences et lysats indépendants

**QCM 1** : A propos de la figure 1, indiquez-la (les) réponse(s) exacte(s) :

- A) La voie PIP3/Akt/mTOR est une importante voie de la signalisation, appartenant à la voie de la phospholipase C
- B) La phosphorylation de ces protéines démontre leur activation
- C) Dans la figure 1b, DMSO est un témoin de l'expérience
- D) La figure 1a nous permet de démontrer que les lignées cellulaires SKOV3 et IGROV1GR10 sont équivalentes
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

**QCM 2** : A propos de la figure 1, indiquez-la (les) réponse(s) exacte(s) :

- A) On remarque une importante phosphorylation d'Akt, p70S6K et 4EBP1 chez les lignées cellulaires SKOV3 et IGROV1GR10 en absence de BEZ235
- B) Cela suggère une activation de cette voie de signalisation nous permettant de supposer qu'elle est activée chez les cellules cancéreuses
- C) On observe une diminution de la phosphorylation d'Akt, p70S6K et 4EBP1 quand les doses de BEZ235 augmentent
- D) BEZ235, s'il est utilisé comme traitement, semblerait permettre de lutter activement contre le cancer de l'ovaire
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

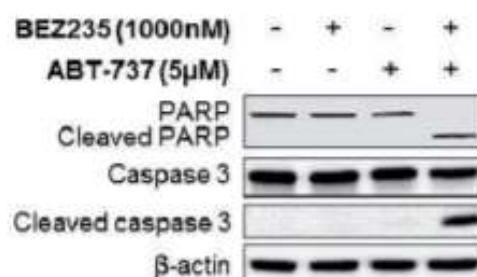


**Figure 2a** : Le BEZ235 inhibe la prolifération des lignées cellulaires SKOV3 et IGROV1-R10 sans induire l'apoptose. L'effet du BEZ235 (10-1000 nM) sur la prolifération et l'apoptose des lignées SKOV3 (colonne de gauche) et IGROV1-R10 (colonne de droite) a été investigué par établissement de courbes de croissance.

**QCM 3** : A propos de BEZ235, indiquez-la (les) proposition(s) exacte(s) :

- A) BEZ235 augmente le nombre de cellule viables dans la lignée cellulaires SKOV3
- B) Peu importe la concentration de BEZ235, on obtiendra toujours des résultats positifs
- C) Les lignées cellulaires SKOV3 et IGROV1-R10 semblent s'arrêter en cours de cycle lorsqu'on les met en présence de BEZ235
- D) BEZ235 n'est pas soumis à une variabilité inter-individuelle
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

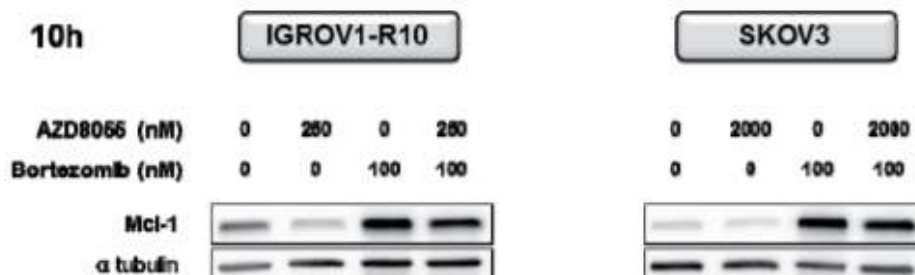
L'apoptose est une mort cellulaire régulée, notamment par des facteurs déclenchants, comme les caspases initiateurs capables de rendre active par clivage des caspases effectrices (caspases 3, 6 ou encore 7), ou encore grâce à des facteurs pro-apoptotiques (par exemple : BH3-only Bim, Puma et Noxa), ou des facteurs inhibiteurs, comme les protéines anti-apoptotiques (par exemple : Mcl-1, Bcl-xL, Bcl-2).



**Figure 3** : Etude de cellules de la lignée IGROV-1 suite à l'ajout ou non de BEZ235 (1000 nM) et/ou de ABT-737 (5  $\mu$ M) et de la présence de PARP, clivée ou non, de caspase, clivée ou non et de B-actine.

**QCM 4 : A propos de la figure ci-dessus, indiquez-la (les) réponse(s) exacte(s) :**

- A) Elle suggère que BEZ235 seul permet l'apoptose cellulaire
- B) Elle suggère que BEZ235 et ABT-737 doivent être présents pour cliver la caspase 3
- C) La dernière colonne du WB nous sert de témoin
- D) L'association du BEZ235 et de l'ABP-737 semble être une thérapeutique envisageable dans le traitement des cancers des ovaires.
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

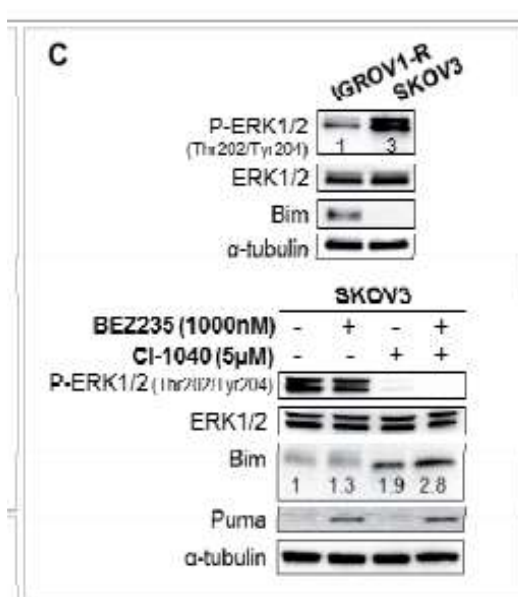


**Figure 4 :** Les cellules IGROV1-R10 (colonne de gauche) et SKOV3 (colonne de droite) ont été traitées pendant 10h avec l'inhibiteur du protéasome, le Bortezomib (100 nM) ± l'AZD8055. L'effet de ce traitement sur l'expression de la protéine Mcl-1 a été étudié par Western-blot. L'α-tubuline est utilisée comme témoin de dépôt.

**QCM 5 : A propos de la figure ci-dessus :**

- A) On remarque que les conséquences du AZD8055 et du Bortezomib sont les mêmes dans les 2 types de cellules étudiés
- B) Elle suggère que l'association de AZD8055 et du Bortezomib bloque l'apoptose
- C) Elle suggère que l'association de AZD8055 et du Bortezomib démarre l'apoptose
- D) L'association de AZD8055 et du Bortezomib a un rôle inverse à l'association du BEZ235 et de l'ABP-737.
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

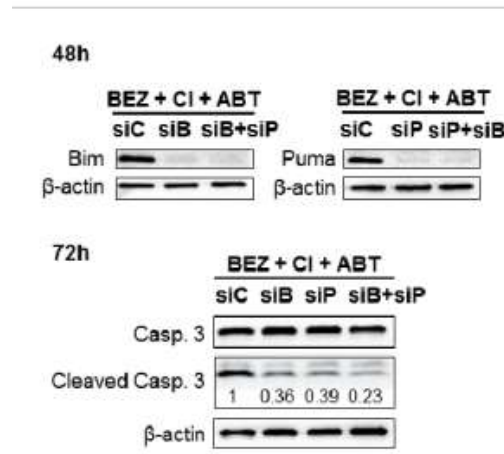
Dans la lignée SKOV3, la combinaison du BEZ235 avec l'inhibition de Bcl-xL par stratégie ARN interférence ou par utilisation d'ABT-737 n'induit en revanche pas une apoptose importante. Nous avons émis l'hypothèse que l'inefficacité de cette combinaison pouvait être due au fait que le BEZ235 n'augmente pas l'expression de Bim dans cette lignée, qui apparaît quasi-nulle. Pour la vérifier, nous avons observé à l'état basal le niveau d'expression de Bim dans les 2 lignées cellulaires chimiorésistantes IGROV1-R10 et SKOV3. Nous nous sommes ensuite penchés sur l'expression de Bim après traitement par le BEZ235 et le CI-1040 sur la lignée SKOV3.



**Figure 5c :** Les cellules SKOV3 ont été traitées par le BEZ235 (1000 nM) et/ou le CI-1040 (5 μM) pendant 24h. L'expression des protéines P-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), ERK1/2 totale et Bim a été analysée par western-blot à l'état basal dans les cellules SKOV3 et IGROV1-R10 (haut), et en réponse au traitement dans les cellules SKOV3 (bas). L'expression de Puma a également été analysée par western-blot en réponse au traitement dans les cellules SKOV3 (bas). Les niveaux d'expression de P-ERK1/2, ERK1/2 et Bim ont été quantifiés à l'aide du logiciel ImageJ®. Le ratio P-ERK/ERK a été calculé et le niveau d'expression de Bim a été normalisé par rapport à la β-actine. Les valeurs obtenues dans les cellules traitées ont été rapportées à celles obtenues dans les cellules témoin.

**QCM 6 : A propos de la figure 5c, indiquez-la (les) réponse(s) exacte(s) :**

- A) A l'état basal, on remarque une activation de ERK trois fois plus élevée dans la lignée SKOV3 par rapport à la lignée IGROV1-R10
- B) On peut donc émettre l'hypothèse que la phosphorylation de ERK favoriserait la dégradation de Bim dans la lignée SKOV3
- C) Cependant, après traitement au BEZ235 la dégradation de Bim est totalement inhibée, on retrouve alors Bim en grande quantité
- D) Le traitement avec un inhibiteur de MEK, le CI-1040 permet d'induire fortement l'expression de Bim sous forme phosphorylée
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses



**Figure 5e** : L'efficacité de l'inhibition de Bim et de Puma a été évaluée par western-blot 48h après transfection (en haut à droite). La capacité de siBim et/ou de siPuma à protéger contre l'apoptose induite par la combinaison BEZ235/CI-1040/ABT-737 a été évaluée à 72h par étude de la morphologie cellulaire et estimation du pic sub-G1 par cytométrie en flux (colonne de gauche), et par analyse du clivage de la caspase-3 par Westernblot (en bas à droite). Le niveau d'expression de la caspase-3 clivée a été quantifié par utilisation du logiciel ImageJ® et normalisé par rapport à la β-actine. Le niveau d'expression de la caspase-3 clivée dans les cellules traitées a été rapporté à celui des cellules témoin.

**QCM 7 : A propos de la figure 5e, indiquez-la (les) réponse(s) exacte(s) :**

- A) Au bout de 48h après transfection des siRNAs, on effectue un Westernblot de contrôle afin de vérifier que l'inhibition de Bim et de Puma soit bien réalisée
- B) La colonne témoin siC nous montre que la combinaison BEZ + CI + ABT inhibe le clivage de la caspase 3
- C) Les résultats après 72h nous montrent que Bim et Puma protègent les cellules contre l'apoptose
- D) L'action coopérative de Bim et Puma est une piste thérapeutique intéressante dans l'induction apoptotique des cellules cancéreuses
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

*Voilà ! C'est ici que s'arrête le DM, que l'on corrigera ensemble à la SDA du 05/11/20 ! On a tout donné pour que ce soit le plus représentatif possible en s'inspirant des annales. Vous l'aurez compris Gilson adooooore les WB, donc ça faut gérer sur les bouts des phalanges distales*

*Là, on entre dans le mois de novembre donc dans tous les cas c'est à ce moment que ça commence à faire beaucoup de travail et à être vraiment d'ûr, avec le confinement en plus, ça n'arrange rien, mais accrochez vous pour le graal de la P2 !*