

Pour découvrir les mécanismes moléculaires associés à la sénescence impliqués dans l'initiation tumorale, nous avons profité de la comparaison de deux types de cellules différents dans leur capacité à échapper spontanément à la sénescence et à générer des cellules néoplasiques : les fibroblastes humains normaux (NHDFs) et les kératinocytes épidermiques humains normaux (NHEKs).

L'ensemble des expériences a été réalisé de façon comparative sur des couples de NHEKs et NHDFs issus d'un même prélèvement, c'est-à-dire isogéniques, afin d'éviter tout biais résultant de polymorphismes éventuels.

Les cellules ont été cultivées à tension atmosphérique d'O₂ qui est presque normotoxique pour l'épiderme et partiellement hyperoxique pour le derme. Les résultats de cette expérience sont présentés dans les documents suivants.

Figure 1: Growth curve and characteristics of NHEKs and NHDFs.

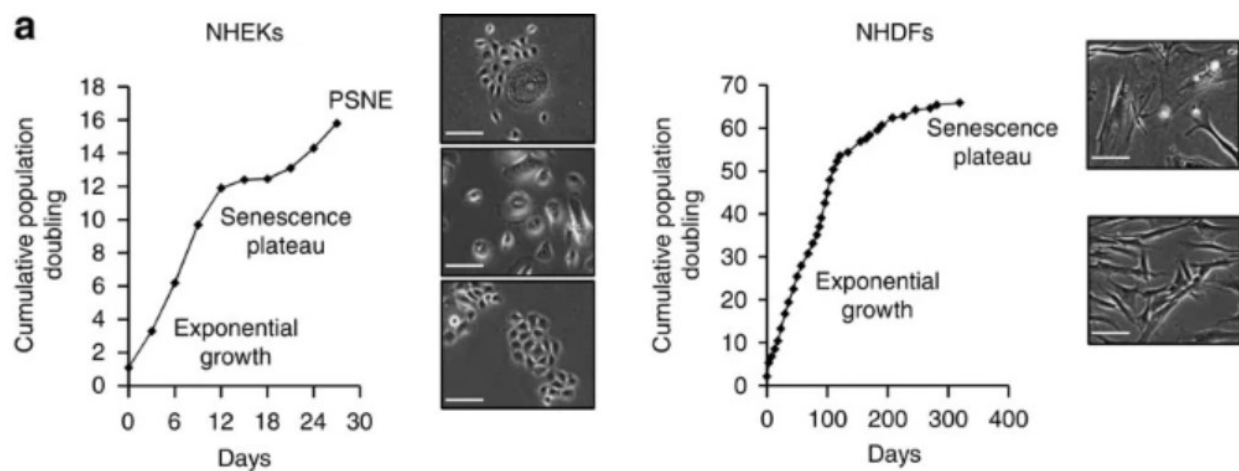
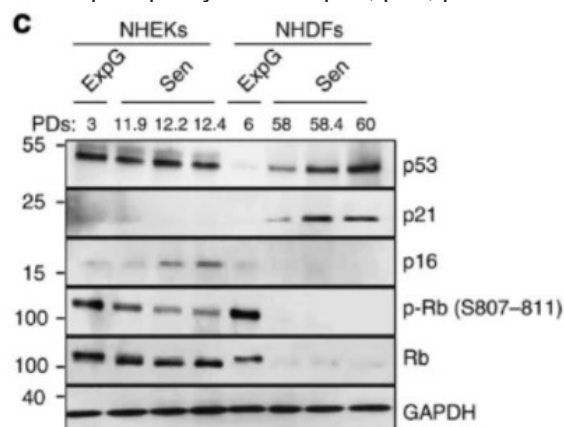


Figure 1a : courbe de croissance des NHEKs et des NHDFs avec des micrographes représentatifs de chaque étape de croissance et des images au microscope représentant les cellules dans chaque étape.

Figure 1c : Analyse par Western blot de la phosphorylation de p53, p21, p16 et Rb



QCM 1 : A propos des document 1a et 1c, indiquez la ou les proposition(s) exacte(s) :

- A) Les fibroblastes humains normaux atteignent la sénescence après une phase de croissance exponentielle pendant laquelle le nombre de cellules est environ multiplié par 16
- B) Le plateau de sénescence est accompagné morphologiquement d'un élargissement et d'un aplatissement des cellules NHEKs
- C) Les kératinocytes épidermiques humains normaux ont encore un potentiel de doublement lorsqu'ils atteignent le plateau de sénescence
- D) A l'état PSNE, on retrouve à la fois des kératinocytes normaux et des kératinocytes sénescents
- E) Les propositions A, B, C, et D sont fausses.

QCM 2 : A propos des documents 1a et 1c, indiquez la (les) proposition(s) exacte(s) :

- A) p53 et p21 sont recrutés dans les deux types cellulaires
- B) Les conséquences morphologiques des cellules NHDFs sont liées à l'activation de p21 et p16
- C) Rb, que l'on retrouve au sein du cycle cellulaire, est présent chez les kératinocytes normaux et permet d'arrêter le cycle cellulaire
- D) Les cellules au stade PSNE peuvent potentiellement être cancérogène
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

Nous essayons de savoir pourquoi on observe cette différence entre ces deux types cellulaires. Pour se faire, on réalise un Western Blot présenté dans le document 1d.

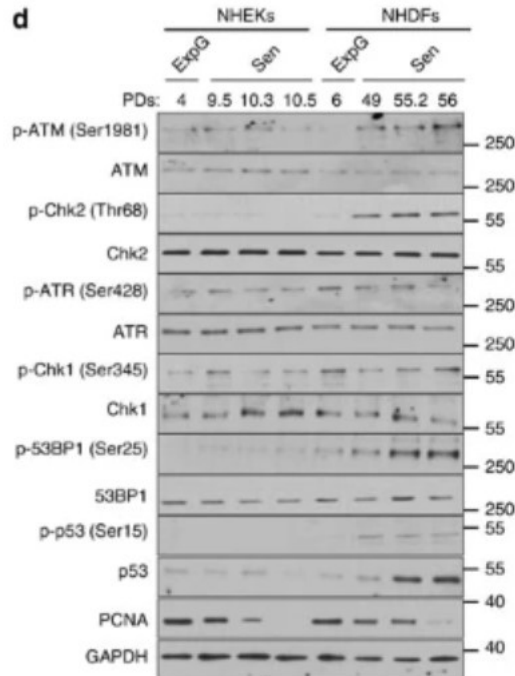


Figure 1d : Analyse par Western Blot de l'activation de la voie de réparation aux dommages de l'ADN avec les cellules NHEKs et NHDFs. PCNA a été utilisé comme index prolifératif et GAPDH comme contrôle.

QCM 3 : A partir de vos connaissances et des documents présentés dans l'expérience, indiquez la ou les proposition(s) exacte(s) :

- A) On pourra colorer les cellules sénescences NHDFs avec le marqueur de la caspase 3 et on observerait donc une coloration bleutée
- B) p53 a été activé car les télomères étaient trop raccourcis
- C) On remarque une activation de Chk2, ATM et 53BP1 chez les fibroblastes
- D) On peut donc en déduire que ces protéines permettent de repérer les lésions des télomères
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

Nous avons ensuite examiné si les NHEKs et les NHDFs accumulent des dommages simples à l'ADN et s'ils activent la voie de réparation des dommages de l'ADN. Pour cela, nous avons comparé les cellules saines et les cellules en phase de sénescence. Nous avons quantifié les lésions simple brin à l'aide d'essais de comètes neutres en tandem (pH 8) et alcalines (pH 12,3), qui indiquent respectivement les lésions double brin et des lésions simple brin. Les résultats ont été analysés en calculant les moments de queue, qui reflètent l'importance des ruptures d'ADN par cellule comète positive. Les résultats sont exposés dans le document ci-dessous.

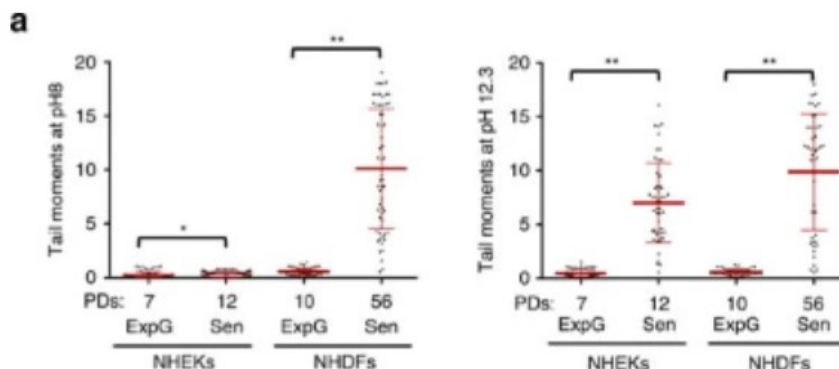


Figure 2a : Des essais de comètes neutres (pH 8; gauche) et alcalins (pH 12,3; droite) ont été effectués en tandem sur des NHEK et des NHDF à croissance exponentielle et sénescence. Les moments de queue de 30 à 50 cellules comètes positives ont été quantifiés.

QCM 4 : A propos du document 2a, indiquez la (les) proposition(s) exacte(s) :

- A) On remarque que, pendant la sénescence avec un pH à 12,3, les cellules NHEKs présentent des dommages à l'ADN
- B) Les NHDFs accumulent uniquement des lésions double-brin
- C) Les NHEKs accumulent à la sénescence seulement des lésions simple brin
- D) p53 n'étant plus activé chez les NHDFs, cela signifie que les lésions ne sont pas détectées et ne seront donc pas réparées
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses.

Nous avons étudié les capacités de réparation des cellules NHDFs et NHEKs. Nous avons examiné l'expression de PARP1. La voie réparation aux lésions simples de l'ADN implique d'abord une ribose-polymérase poly (ADP) (PARP), principalement PARP1, qui se lie à l'ADN cassé. Cette liaison améliore son activité de polyrification (PAR) de ribose (ADP). Les RPAR accumulés servent au recrutement de XRCC1, une protéine d'échafaudage, qui à son tour recrute les enzymes de réparation en aval. On considérera ici que la protéine-clé PARP1 fonctionne de la même façon que dans l'apoptose.

QCM 5 : Donner la (les) proposition(s) exacte(s) :

- A) Si le mécanisme de PARP1 dans la sénescence est le même que dans l'apoptose, on remarquerait un clivage de PARP1 si la cellule ne présente pas de dommages, signe que le cycle peut se poursuivre
- B) On peut donc en déduire que les cellules NHEKs présentent une augmentation des foyers XRCC1
- C) Non, ce sont les fibroblastes sénescents qui présenteront une augmentation des foyers XRCC1
- D) Malgré la présence de PARP1, les fibroblastes sénescents auront une réparation des dommages moins importante que les kératinocytes sénescents
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses