

BIOLOGIE - SANTÉ

Semestre 1



UNIVERSITÉ DE NANTES

U.F.R. des Sciences
et des TechniquesS.E.V.E.
Bureau des Examens

Nom de l'U.E. :

Recherche en cancérologie et en immunologie

Code de l'U.E. :

X7BB050 (Ex. CM)

Code de l'E.C. :

Date de l'examen :

16 décembre 2014

Durée :

1h30

Documents autorisés :

Aucun

Calculatrice autorisée

 non

Type :

Sujet portant sur le Cours

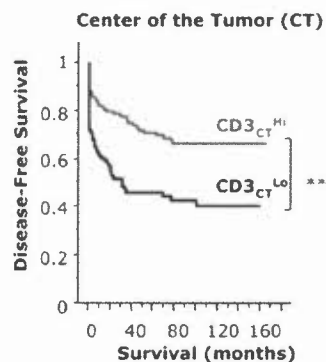
Répondre directement et précisément à toutes les questions posées sans introduire les sujets.

1/ L'angiogenèse tumorale

- 1a/ Qu'est-ce qui déclenche l'angiogenèse tumorale ? Quels sont les principaux facteurs impliqués ?
1b/ Définir le rôle possible de P53 et de l'IFN- α dans l'angiogenèse.

2/ Le concept d'immunosurveillance des cancers

- 2a/ Ce concept a été défini en 1957 par Burnet et Thomas. Quel est-il ? (1 phrase)
Citer les différents arguments en faveur de ce concept.
Vous commenterez également la figure suivante en rapport avec l'un de ces arguments.



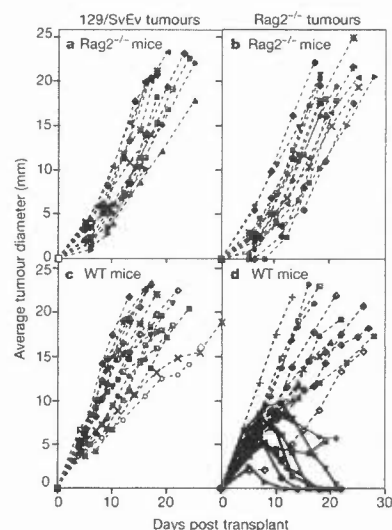
Courbes de survie sans rechute des patients, après ablation de leur tumeur, en fonction de l'abondance des lymphocytes T memoires (hi: high ; lo: low) (Galon et al., Science, 2006)

- 2b/ La théorie des trois séquences a été introduite en 2004 par Schreiber. Définissez cette théorie.

2c/ Définissez la notion d' « Immunoediting ». (1 phrase)

Des preuves de ce processus ont été apportées par les expériences suivantes.

Des tumeurs ont été induites par le MCA (MCA=Mucin-Like Carcinoma-associated Antigen) chez des souris sauvages et chez des souris immunodéficientes (Rag2^{-/-}). Ces tumeurs ont ensuite été transférées chez des souris RAG^{-/-} (a et b) ou sauvages (c et d) et leur croissance a été mesurée. Interprétez les résultats.



(Shankaran et al., Nature, 2001)

3/ L'échappement tumoral

La perte d'antigénicité et de sensibilité des tumeurs aux lymphocytes T cytotoxiques constitue l'un des mécanismes majeurs de l'échappement tumoral. Quelles sont les causes possibles de ce mécanisme.

Citez (sans détailler) les autres principaux mécanismes d'échappement d'origine tumorale.

4/ Les hémopathies malignes

4a/ Donnez la définition d'une hémopathie maligne.

4b/ Citez et expliquez les 3 critères permettant de classer les hémopathies malignes.

3c/ Remplissez le tableau suivant indiquant la classification des hémopathies (Indiquez seulement les 8 mots ou groupes de mots sur votre copie) :

	1	2
3	5	Syndromes Myéloprolifératifs Chroniques : - 6 - 7 - Polyglobulie primitive ou maladie de Vaquez - Splénomégalie myéloïde Et Syndromes Myélodysplasiques
4	Leucémies Aiguës Lymphoblastiques (LAL)	8



UNIVERSITÉ DE NANTES

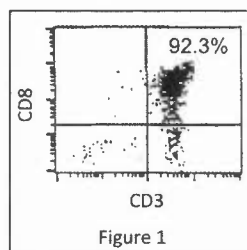
U.F.R. des Sciences
et des TechniquesS.E.V.E.
Bureau des Examens

Nom de l'U.E. : Recherche en cancérologie et en immunologie
 Code de l'U.E. : X7BB050 (Ex. TD/TP)
 Code de l'E.C. :
 Date de l'examen : Mardi 16 décembre 2014
 Durée : 1h
 Documents autorisés : Aucun
 Calculatrice autorisée : oui Type :

Partie A (/16 points)

Afin de mieux comprendre pourquoi les réponses immunes contre les antigènes tumoraux humains sont généralement inefficaces, une équipe de recherche s'intéresse aux mécanismes d'activation de lymphocytes T CD8+, isolés à partir d'un infiltrat tumoral provenant d'un patient, atteint d'un mélanome et exprimant le CMH-I : HLA-A*0201. En dépit de la présence de cet infiltrat lymphocytaire, la pathologie progresse chez ce patient.

1) Après 2 semaines de culture en présence d'IL-2 et d'IL-7, les lymphocytes T obtenus à partir de l'infiltrat tumoral (TIL) sont analysés par cytométrie de flux après un double marquage avec un anticorps (Ac) anti-CD3-PE et un Ac anti-CD8-FITC. Les résultats sont présentés en **figure 1**.

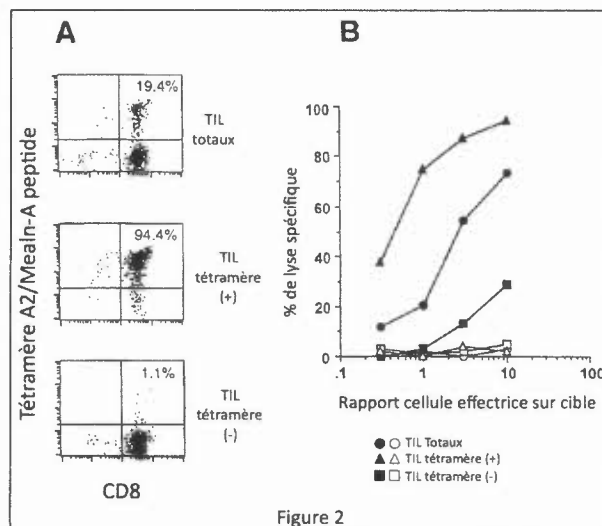


➤ Analyser et commenter les résultats de la figure 1.

2) Chez la majorité des patients atteints d'un mélanome, on détecte des lymphocytes T spécifiques du peptide tumoral naturel immunodominant Melan-A = AAGIGILTV, naturellement apprêté et présenté dans le contexte HLA-A*0201. Les TIL précédemment obtenus sont donc marqués à l'aide d'un tétramère A2/peptide Melan-A-PE et de l'Ac anti-CD8-FITC puis analysés à l'aide d'un cytomètre de flux équipé d'un module de tri. Après tri des différentes populations de TIL et culture *in vitro* pendant 15 jours pour obtenir suffisamment de cellules, un test de cytotoxicité est réalisé vis à vis de la lignée T2 (HLA-A2(+)).

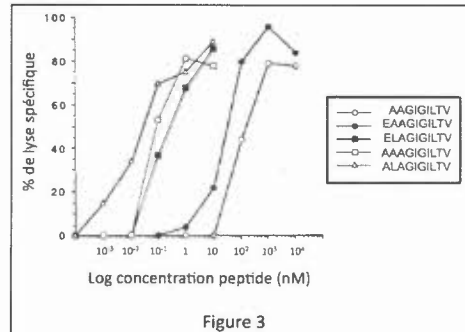
a- Les marquages des TIL avant et après tri et culture sont représentés en **figure 2A**.

b- Les résultats du test de cytotoxicité sont représentés en **figure 2B**. La lignée cible T2 chargée en peptide Melan-A correspond aux symboles noirs, la lignée cible T2 non chargée correspond aux symboles blancs.



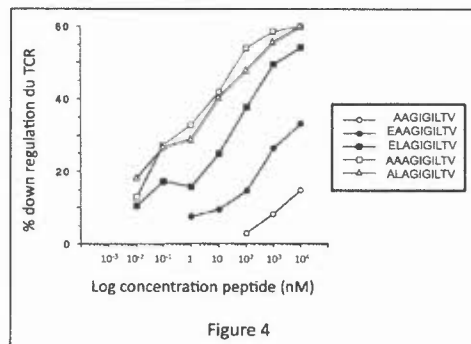
- Rappeler le principe du test de cytotoxicité
- Analyser et commenter les résultats présentés dans les figures 2A et 2B.

3) La spécificité antigénique fine des TIL tétramère (+) est ensuite analysée par test de cytotoxicité vis à vis de la lignée T2 chargée avec des concentrations croissantes du peptide naturel Melan-A ou de peptides analogues synthétiques, à un rapport cellule effectrice sur cible de 10/1. Les résultats sont présentés en **figure 3**.



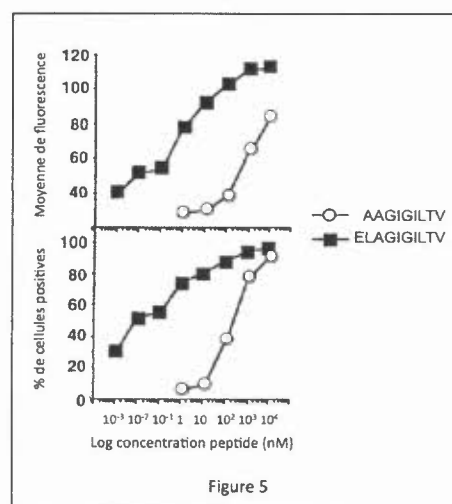
- Analyser et commenter les résultats présentés dans la figure 3.

4) Au cours du test de cytotoxicité réalisé en 3), l'expression de TCR à la surface des TIL tétramère (+) est aussi analysée. Les résultats de diminution de l'expression du TCR (down regulation) sont présentés en **figure 4**.



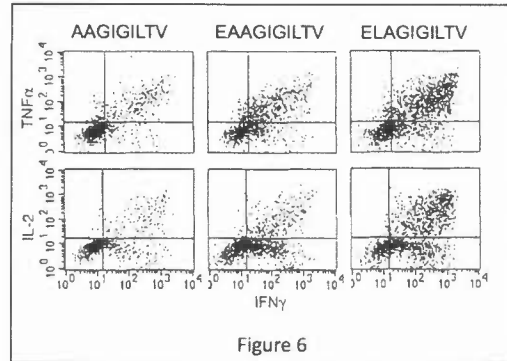
- Analyser et commenter les résultats présentés dans la figure 4.

5) Afin de compléter les résultats obtenus en 4) la mobilisation du calcium intracellulaire dans les TIL tétramère (+) est investiguée par un marquage spécifique du flux calcique après incubation pendant 1 min des TIL à un rapport 2/1 avec des cellules T2 chargées avec différentes concentration du peptide naturel Melan-A ou de l'analogue synthétique ELAGIGILTV. L'analyse est réalisée en cytométrie de flux, la moyenne de fluorescence reflétant l'intensité du flux calcique, et le % de cellules positives correspondant au % de TIL tétramère (+) présentant un flux calcique (**figure 5**).



- Analyser et commenter les résultats présentés dans la figure 5.

6) Le marquage intracellulaire des cytokines est une méthode très sensible pour déterminer la réponse cytokinique au niveau d'une seule cellule. Par cette approche, l'analyse de la sécrétion de $TNF\alpha$, d'IL-2 et d'IFN γ des TIL tétramère (+) est réalisée par double marquage après stimulation avec des cellules T2 chargées avec 10 μ M de chacun des 3 peptides naturel ou synthétiques. Les résultats sont présentés en figure 6.



- Analyser et commenter les résultats présentés dans la figure 6.
- En quoi les résultats de cette étude nous permettent-ils de comprendre pourquoi la progression tumorale est fréquente même si l'on détecte des TIL chez les patients ?
- Sur la base de ces résultats, quelle stratégie thérapeutique pourrait-on envisager pour améliorer la réponse immunitaire anti-tumorale?

Partie B (/4 points)

1) Au cours de vos travaux pratiques, vous avez dosé un anticorps par test colorimétrique utilisant le « Bio-Rad protein reagent ». Pour cela, vous avez réalisé en parallèle une gamme de BSA à partir d'une solution à 100 μ g/ml. Vous avez distribué dans les puits d'une plaque « 96 puits » les volumes suivants des différents réactifs et vous avez mesuré au lecteur de plaque ELISA la densité optique.

	Gamme de BSA							Ac
Ac (μ l)	0	0	0	0	0	0	0	80
BSA (μ l)	0	10	20	40	60	80	100	0
PBS (μ l)	100	90	80	60	40	20	0	20
Biorad (μ l)	100	100	100	100	100	100	100	100
DO	0,3	0,35	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,7

Quelle est la concentration en mg/ml de votre solution d'anticorps ? (1 point)

2) Vous voulez charger 1 μ g de votre solution d'anticorps sur un gel de polyacrylamide. Vous devez ajouter du tampon de Laemmli à votre échantillon. Ce tampon est 12 fois concentré et vous devez l'amener à une dilution finale de 4 fois. Quels volumes devez-vous prélever de votre solution d'anticorps et de votre tampon de Laemmli ? (1 point)

3) Vous comptez 50 cellules sur 20 carreaux. Vous avez préalablement dilué au 1/2 dans l'éosine votre suspension cellulaire. Quelle est la concentration de votre suspension cellulaire en cellule par ml ? (1 point)

4) A partir de cette suspension cellulaire vous voulez préparer 1 ml d'une solution à 1000 cellules par ml. Comment allez-vous procéder ? (1 point)