



Etude de la transition épithélio-mésenchymateuse
(TEM) au cours de la trisomie 21:
étude d'une lignée de carcinome mammaire

Wiem Ayed

MASTER II Génétique et Physiologie

Maître de stage : Dr Laetitia GOUAS

ERTICa EA4677 (Pr. Frédérique Penault-Llorca)

Service de Cytogénétique Médicale - (Pr. Philippe Vago)

INTRODUCTION

- Cancer du sein

- ❖ Le plus fréquent chez la femme (23%)

- ❖ Trisomie 21 : très rare (Hasle *et al* 2000 ; Patja *et al* 2001)

- ➡ Enquête INSERM : 5 cas décès / cancer du sein (France, 24 ans)

- ➡ Enquêtes épidémiologiques patients T21 (> 2000) = 0 cas



INTRODUCTION

« Effet protecteur de la T21 »

Hypothèses avancées

- Diminution de l'angiogenèse tumorale

COL18A1, DSCR1, DYRK1A, ADAMTS1, ERG, JAM-B, PTTG1IP

- Effet dose de gènes suppresseurs de tumeurs

SIM2s, BTG3, ETS2

- Apoptose cellulaire

SOD-1 : CuZnSOD ↑ -> radicaux libres ↑

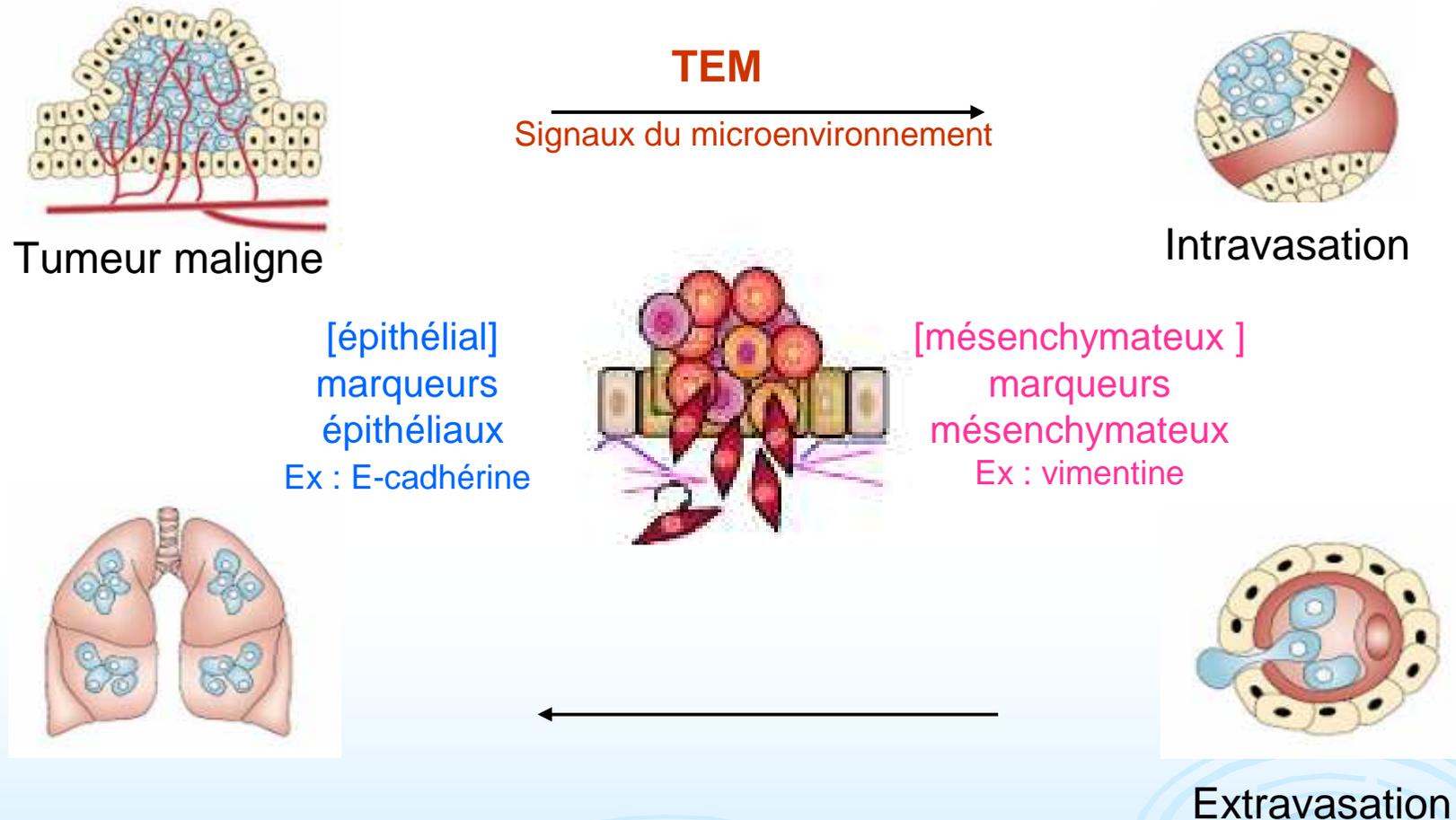
- Rôle protecteur du stroma T21, en particulier Matrice extracellulaire (MEC)

Composition MEC T21 : différente

In vitro : Inhibition de la prolifération de
MDA-MB 431 sur MEC T21 (*Bénard et al, 2005*)

BUT ET OBJECTIFS

« Effet protecteur de la T21 »
Notre hypothèse



➤ Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) des cellules tumorales mammaires TN **altérée** dans un environnement T21 ?

BUT ET OBJECTIFS

Etudier la TEM d'une lignée cellulaire de carcinome mammaire TN en contact d'une MEC sécrétée par fibroblastes T21

1- Production MEC sécrétée par fibroblastes en culture

2- Etude TEM cellules cancéreuses ensemencées sur MEC

➤ Aspect morphologique des cellules

➤ Expression

- Marqueurs épithéiaux : E-cadhérine (*CDH1*), claudine-1 (*CLDN1*), occludine (*OCLN*)
- Marqueurs mésenchymateux : N-cadhérine (*CDH2*), vimentine (*VIM*), fibronectine (*FN1*)

MATERIELS ET METHODES

1 - Matériel biologique

Lignée cellulaire adénocarcinome mammaire triple négative MDA-MB 468

Fibroblastes : euploïdes (F-EUP) et T21 (F-T21)

2 – Méthodes

1- Production MEC sécrétée par fibroblastes en culture

a- Culture cellulaire des F-EUP et F-T21

Confluence 4j, 5j, 6j et 7j \pm L-acide ascorbique

b- Lyse cellulaire (triton, ammoniacque)

c- Immunofluorescence indirecte (IFI) anti-COLVIA1

MATERIELS ET METHODES

2- Aspect morphologique des cellules MDA-MB 468

- a- Ensemencement MDA-MB 468 (MEC F-EUP, MEC F-T21, plastique)
- b- Traitement par TGF α
 - avec TGF α (induction TEM)
 - sans TGF α (contrôle)
- c- IFI anti-VIM

Comptage cell. fusiformes / nbr total (logiciel MétaMorph v6.2)

J1, J2, J3, J4 et J5 (3 champs / lamelle et 2 lamelles / condition)

Analyses statistiques (Dr Bruno Pereira, logiciel STATA 10.0)

3- Expression des marqueurs épithéiaux et mésenchymateux

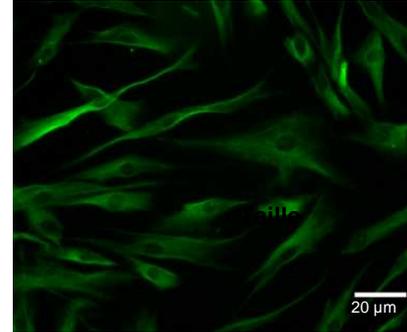
- Des protéines : mise au point IFI anti-E-Cadh et anti-VIM
- Des transcrits : mise au point des qPCR en temps réel
spécificité et efficacité des amplifications

RESULTATS

1- Mise au point

➤ IFI

- ❖ VIM → Ac I^{aire} 1/200 , Ac II^{aire} 1/500



IFI F-EUP marqués par l'Ac I^{aire} anti-VIM et Ac II^{aire}-IgG-FITC (x20).

- ❖ E-CADH : marquage obtenu sans Ac I^{aire} (non spécifique)

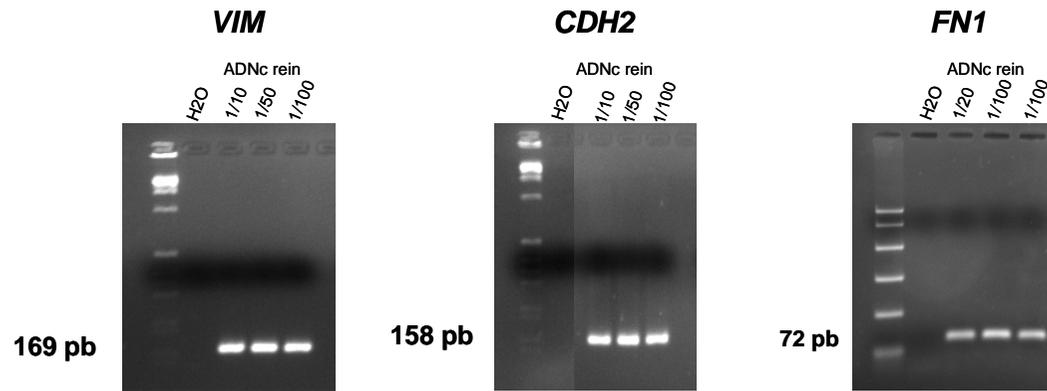
- ❖ COLVIA1 → Ac I^{aire} 1/250 , Ac II^{aire} 1/100

RESULTATS

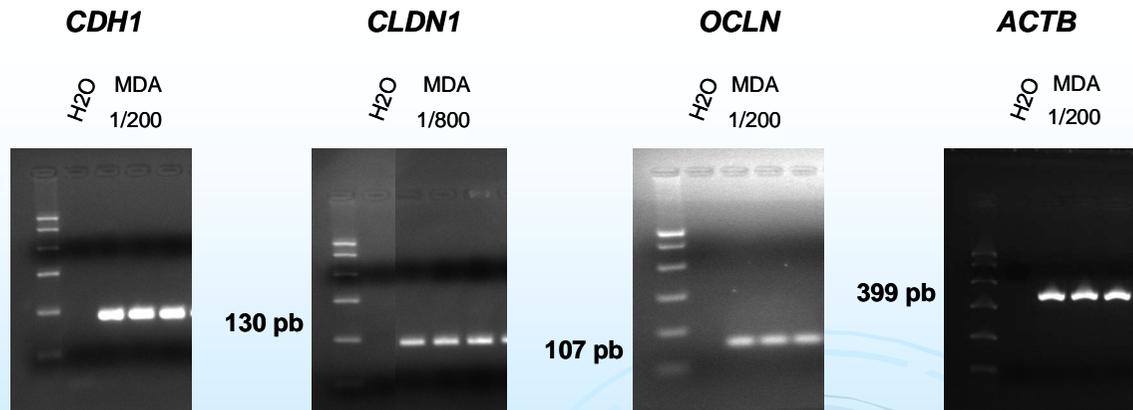
➤ qPCR en temps réel

1) Spécificité

Marqueurs mésenchymateux



Marqueurs épithéiaux



2) Efficacité

ViM	1,94
CDH2	1,86
FN1	2
CDH1	1,82
CLDN1	1,86
OCLN	2
ACTB	1,80

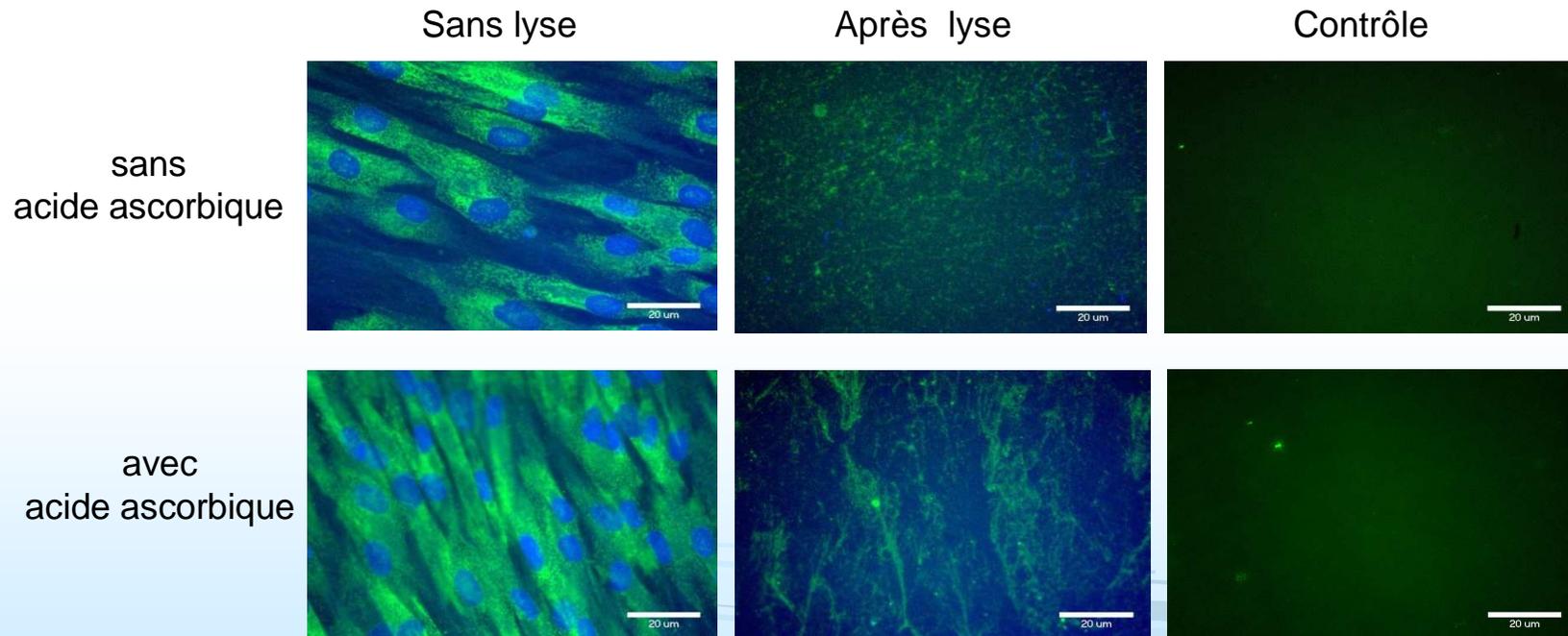
RESULTATS

2- Production de la MEC

4j de confluence : faible marquage, éparses sur lamelle

≥ 5j de confluence + acide ascorbique : MEC+++

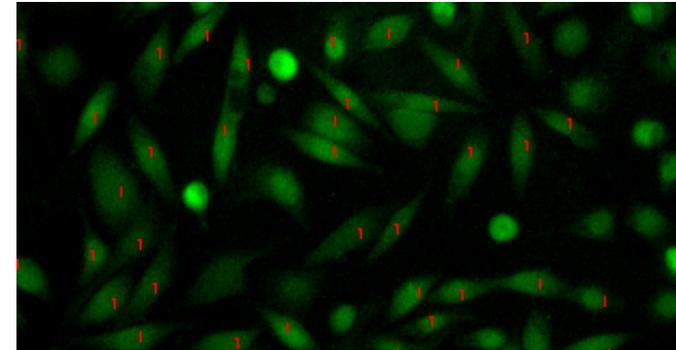
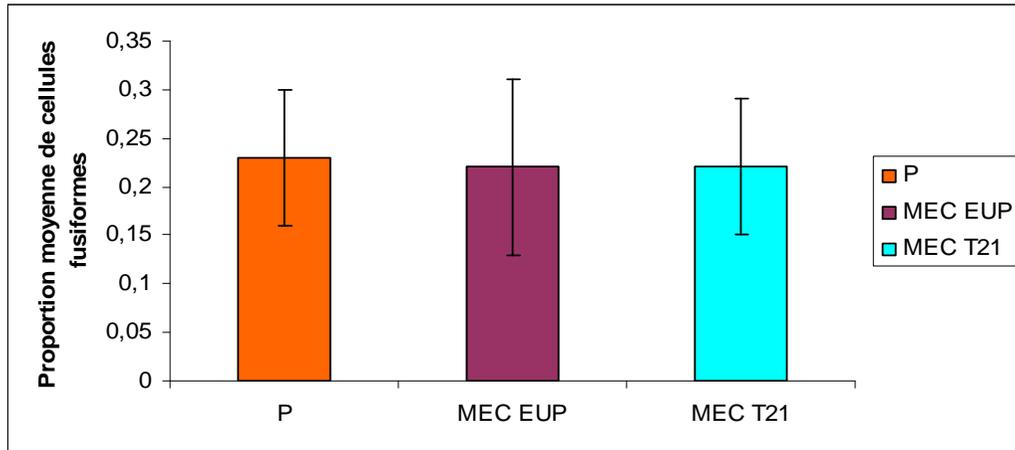
Ex : 7 j de confluence



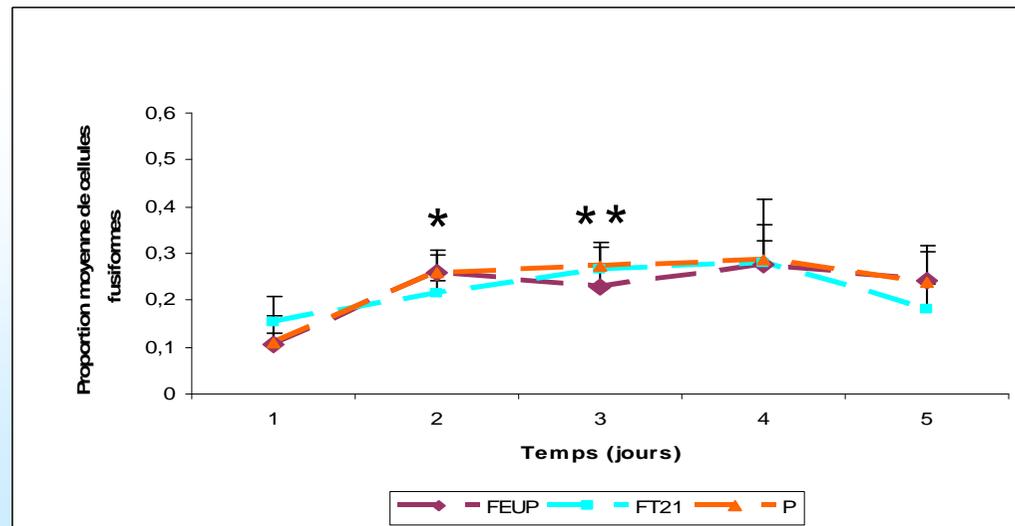
RESULTATS

3- TEM spontanée : Proportion moyenne de cellules MDA-MB 468 fusiformes

Sans TGF α



Pas de différence significative



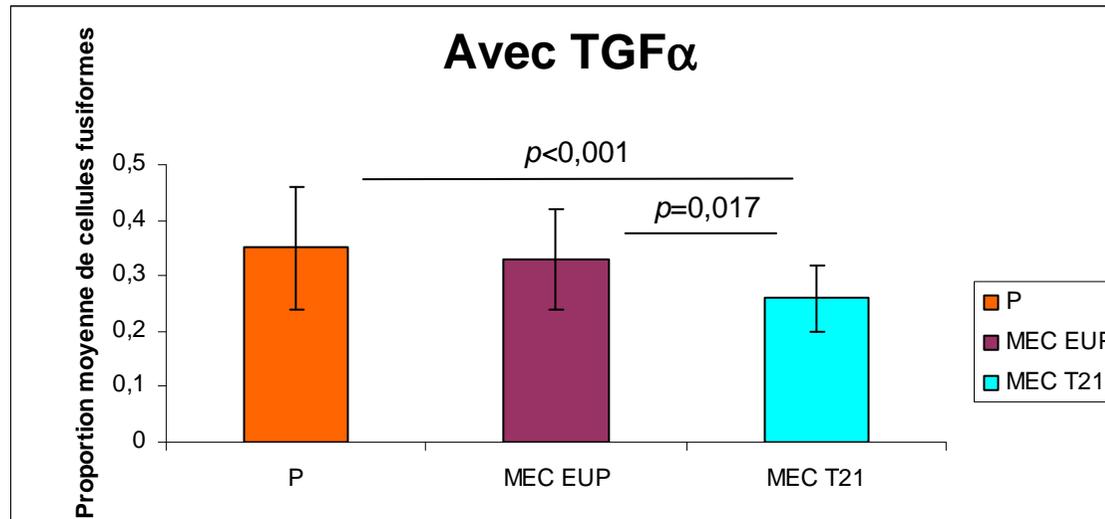
J2 – J5 : TEM sur s. plastique (* p=0,001)

J3 : TEM sur MEC F-T21 (** p<0,005)

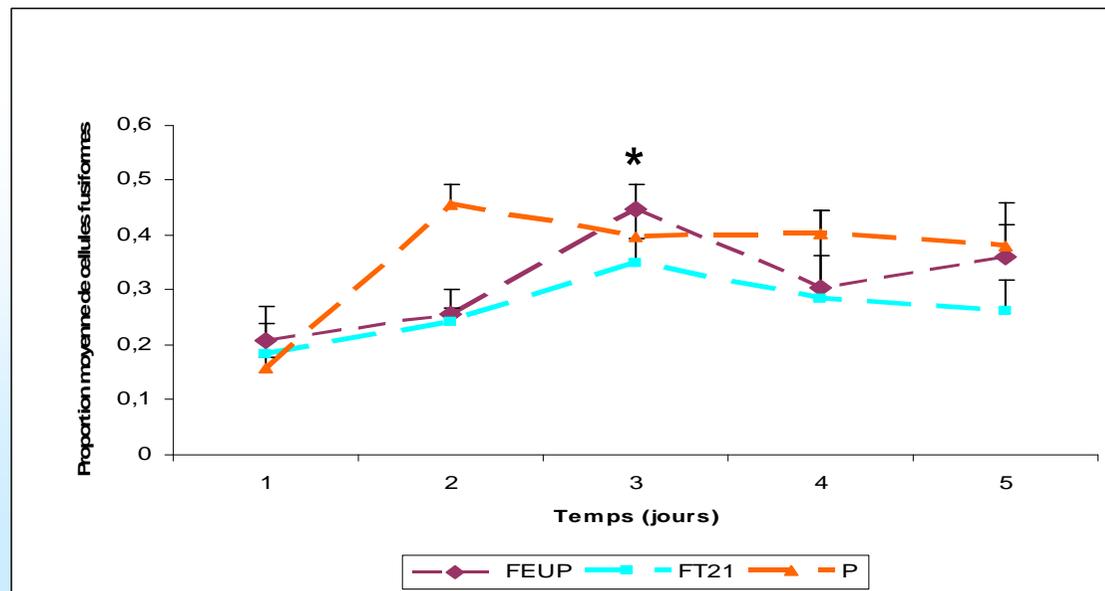
Sur MEC F-T21 -> TEM spontanée
retardée

RESULTATS

3- TEM après induction : Proportion moyenne de cellules MDA-MB 468 fusiformes



Sur MEC T21 :
diminution significative



J2 : TEM sur s. plastique

J3 : TEM sur matrice euploïde et T21

Mais cell. fusiformes sur
MEC T21 <<< MEC euploïde
(* p=0,008)

J4 : prop. cell. fusiformes **diminue**
significativement sur MEC euploïde

J5 : idem sur matrice T21

TME ralentie sur MEC T21 (vs
MEC euploïde)

CONCLUSION

- + TGF α , J3 : prop. cellules fusiformes inférieure sur MEC T21 vs MEC EUP
- J4 diminution nbre cellules fusiformes sur MEC EUP vs J5 pour MEC T21

Sur matrice T21

Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) : diminuée
Transition mésenchymo-épithéliale (TME) : ralentie

- Effet direct de la matrice +++
- ❖ *In vitro* : inhibition prolifération des MDA-MB 431 sur MEC F-T21 (*Bénard et al, 2005*)
- ❖ *TEM jamais étudiée dans contexte T21*

➤ **TEM des cellules cancéreuses TN dans contexte T21 comme piste de recherche de nouvelles cibles thérapeutiques ?**

Remerciements

- Dr Laetitia Gouas
- Pr Philippe Vago
- Pr Frédérique Penault-Illorca
- Equipe du Service de Cytogénétique Médicale
- ERTICa
- Centre Imagerie Cellulaire Santé, Université d'Auvergne
- CBRV

- Dr Bruno Pereira - Délégation Recherche Clinique et Innovations, CHU de Clermont-Ferrand

- Association des Morphologistes
- Club des kiwanis de Chamalières (Puy-de-Dôme, France)
- Club Soroptimist d'Issoire (Puy-de-Dôme, France)





PERSPECTIVES

- Confirmer ces résultats sur MDA-MB 468 + autres lignées TN
 - > comptage 2 opérateurs indépendants, en aveugle

- Étude de la TEM à intervalles courts 1h, 2h, 3h...
 - ❖ *Brown et al, 2004* : HMEC-1012 et -1016 TEM J2 après TGF- β

 - ❖ *Lo et al, 2007* : MDA-MB 468, cancer pancréatique et épidermoïde TEM à J5 après TGF α
 - Surexpression de *TWIST* (FT qui réprime l'expression de E-Cadh) après 2h d'induction !

- Etude des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux
 - Quantification des transcrits par RT- qPCR

 - Quantification des protéines par *western blot*